

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université SAAD DAHLEB Blida 1



Faculté des sciences de la nature et de la vie

Département de biologie physiologie cellulaire

Laboratoire d'attachement : Biotechnologie, Environnement et Santé



Option génétique

Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Master

**Application de la cytogénétique conventionnelle et
moléculaire (Caryotype et FISH) dans la leucémie aigüe
promyélocytaire**

Présenté par :

Balhia Keira Eddine

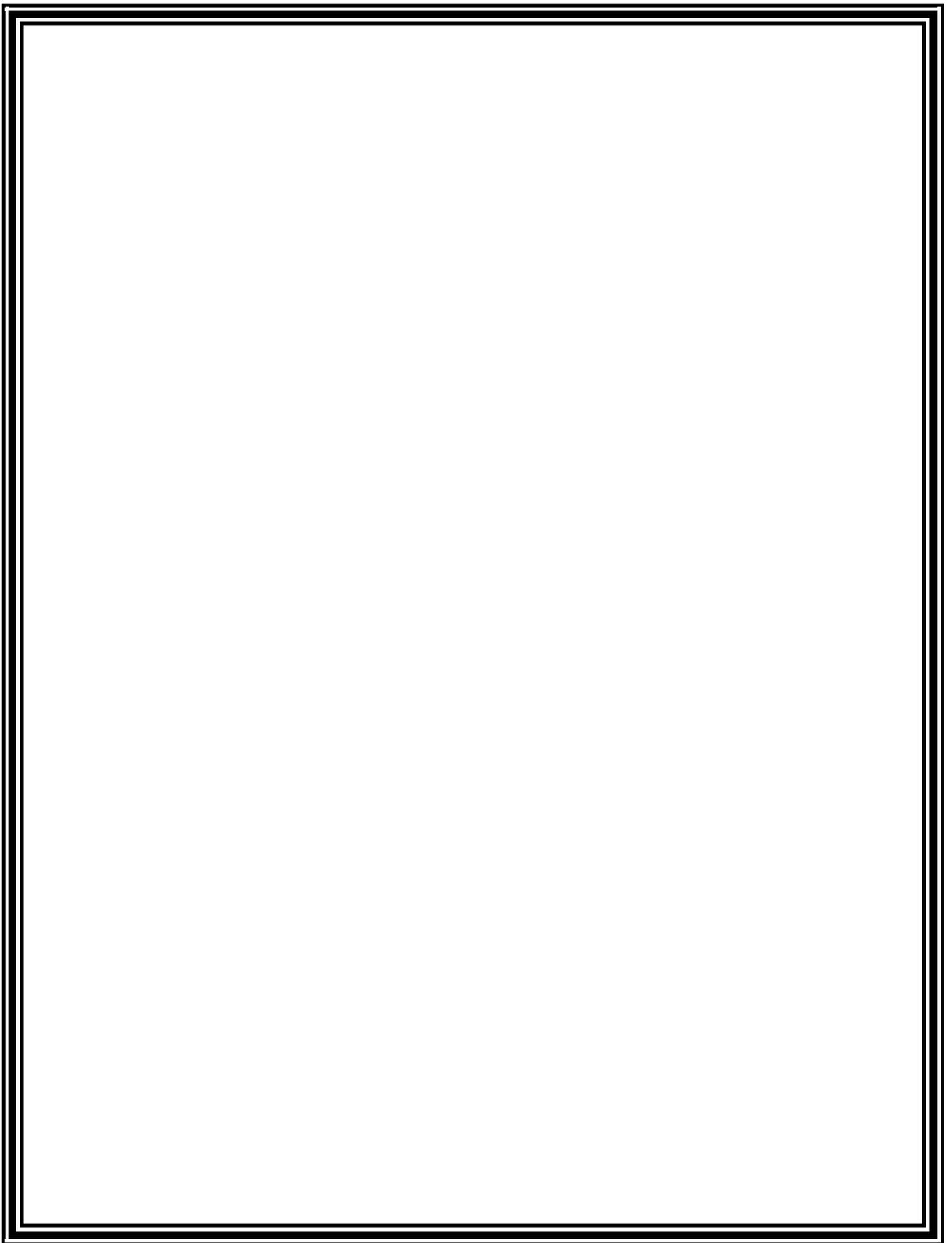
Soutenue le 01/07/2018

Mahmoud Hamza

Composition du jury :

Mme BEN AZZOUZ.F	MAA	USDB1	Présidente
Mme KHALDOUN H	MCB	USDB1	Examinatrice
Mme TAOUSSI. S	MCA	EHS ELCC	promotrice
Mme ABUUL HOUSSAIN A.S	MCB	USDB1	Co-Promotrice

Promotion : 2017-2018





REMERCIEMENTS



La première personne que nous tenons à remercier est notre encadrante Pr. Taoussi Souad, pour l'orientation, la confiance, la patience qui a constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port. Qu'il trouve dans ce travail un hommage vivant à sa haute personnalité.

Ce mémoire n'aurait pas été possible sans l'intervention, consciente de Pr Abade et son étroite collaboration, sa patience et sa pédagogie dans la rédaction de ce mémoire.

Nos remerciements s'étendent également à Madame Abdelhussien Alia pour ses bonnes explications qui nous ont éclairé le chemin de la recherche et sa collaboration avec nous dans l'accomplissement de ce travail.

Nous tenons à remercier très chaleureusement Pr Bouchakour et tout l'équipe de laboratoire cytogénétique C.A.C. Blida se sont toujours montrés à l'écoute et très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury Mme Ben Azzouz Pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant de présider ce jury, ainsi que Mme Khaldoun d'avoir accepté d'examiner et discuter notre travail.

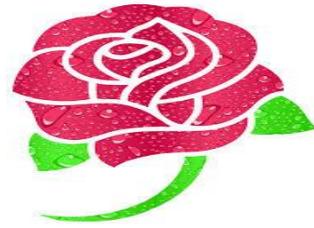
Enfin, nous adressons nos sincères remerciements à tous nos proches et amis, qui nous encouragée au cours de la réalisation de ce mémoire.

Merci à tous et à toutes



Dédicaces

✂ Je dédie ce mémoire à.... ✍



MA TRÈS CHÈRE MÈRE : Cherifa

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.

MON TRÈS CHER PÈRE : Amar

Autant de phrases et d'expressions aussi éloquents soit-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir que Dieu le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tout mal.

Mon cher frère Abdenour, présent dans tous mes moments d'examens par son soutien moral et ses belles surprises sucrées. Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité. Je t'exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour.

Mon cher binôme Hamaza, pour tous les souvenirs et l'amitié au cours de nos deux dernières années.

Ma meilleure amie Norhane, Tu es la personne que je suis toujours heureux-se de voir parce que tu sais démontrer l'affection que tu portes aux gens. Je te souhaite tout le bonheur et la lumière du monde.

Tous mes chers amis et mes collègues de l'Université de Blida.

*Tous ceux ou celles qui me sont chers et que j'ai omis involontairement de citer
Tous mes enseignants tout au long de mes études.*

Dédicaces

*Je dédie ce
Mémoire... *



À MES CHERS PARENTS FASSIHA ET MOHAMED

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consenti pour mon instruction et mon bien être. Je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

A mes deux chers frères Abdel Latif et Abdel Halim que j'aime tant.

A mon cher ami Khiereddine, mon binôme, En témoignage de l'amitié qui nous uni et des souvenirs de tous les moments que nous avons passé ensemble et pour le support durant ces deux dernières années.

Et à toute personne m'ayant aidé de près ou de loin, trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Résumé

La leucémie aiguë promyélocytaire (LAP) est un sous-type des leucémies aiguës non lymphoblastiques (ou leucémies aiguës myéloblastiques (LAM)) dénommé variant M3 dans la classification internationale FAB (France, Amérique, Grande-Bretagne). Les LAP sont caractérisés par une translocation réciproque et spécifique entre les chromosomes 15 et 17. Ce remaniement chromosomique entraîne un blocage de la maturation de granuleux au stade promyélocyte.

Nous avons effectué une étude rétrospective sur 33 patients adressés au service de cytogénétique hématologique du laboratoire hématologie CAC Blida pour suspicion de LAP, parmi les 33 patients nous avons choisi 6 cas pour l'étude prospective. Au moment de diagnostic nous avons utilisé la mise en culture de cellules médullaires (pendant 24h) avec synchronisation, réalisation d'une colchicine, choc hypotonique, fixation du culot cellulaire, étalement pour établir le caryotype en bandes R et la FISH pour la mise en évidence de la translocation t(15;17). Dans chaque méthode on utilise plusieurs matériels: Equipment, réactifs, milieux et solutions et des consommables.

Le diagnostic des 6 cas repose sur des méthodes cytogénétiques (caryotype et FISH), le caryotype a permis d'identifier les t(15;17)(q22;q12-21) et la FISH permet la détection des translocations entre 15 et 17 non visualisés par le caryotype.

L'objectif de notre étude est de réaliser différentes techniques diagnostiques de cytogénétique : caryotype et Hybridation in situ fluorescente (FISH) chez des patients atteints de leucémie aiguë promyélocytaire évoquée cytologiquement, pour le diagnostic de certitude de la forme classique ou variante de LAP.

Mots clés : leucémie aiguë, promyélocytaire, LAP, PML-RARA.

Abstract

Acute promyelocytic leukemia (APL) is a subtype of acute non-lymphoblastic leukemia (AML), referred to as the M3 variant in the International FAB Classification (France, America, Great Britain). The LAPs are characterized by a reciprocal and specific translocation between chromosomes 15 and 17. This chromosomal rearrangement causes a blockage of granular maturation at the promyelocyte stage.

We performed a retrospective study of 33 patients referred to the hematologic cytogenetics department of the hematology laboratory CAC Blida for suspicion of LAP, among the 33 patients we chose 6 cases for the prospective study. At the time of diagnosis we used medullary cell culture (during 24 hours) with synchronization, colchicine production, hypotonic shock, cell pellet fixation, staging to establish the R-band karyotype and FISH for the demonstration of translocation t (15; 17). In each method we use several materials: Equipment, reagents, media and solutions and consumables.

The diagnosis of the 6 cases is based on cytogenetic methods (karyotype and FISH), the karyotype has identified t (15; 17) (q22; q12-21) and FISH allows the detection of translocations between 15 and 17 no visualized by the karyotype.

The objective of our study is to perform various cytogenetic diagnostic techniques: karyotype and Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) in patients with cytologically evoked promyelocytic acute leukemia, for the definitive diagnosis of the classical or variant form of LAP.

Key words: acute leukemia, promyelocytic, APL, PML-RARA.

ملخص

ابيضاض سلانف النقويات الحاد (APL) هو نوع فرعي من سرطان الدم الحاد غير الليمفاوي (AML)، ويشار إليه على أنه النوع M3 في تصنيف FAB الدولي (فرنسا، أمريكا، بريطانيا العظمى). تتميز LAPs بنقل متبادل ومحدّد بين الصبغيات 15 و17. يؤدي إعادة ترتيب الصبغيات هذه إلى انسداد النضج الحبيبي في مرحلة برومليوسيت.

جرينا دراسة استعادية من 33 مريضا أشار إلى قسم علم الوراثة الخلوية الدموية في مختبر أمراض الدم CAC البلدية للاشتباه في LAP، من بين 33 مريضا اخترنا 6 حالات للدراسة المستقبلية. في وقت التشخيص استخدمنا استزراع الخلايا النخاعي (خلال 24 ساعة) مع التزامن، إنتاج الكوليشسين، صدمة هبوط التوتر، تثبيت الحبيبات الخلوية، التدرج لإنشاء النمطية R-band وFISH لتوضيح نقل t (15؛ 17). في كل طريقة نستخدم العديد من المواد: المعدات والكواشف والوسائط والحلول والمواد الاستهلاكية.

يعتمد تشخيص الحالات الست على الطرق الوراثة الخلوية (النمط النووي وFISH)، وقد حدد النمط النووي t (15؛ 17) (q22؛ q12-21) وFISH يسمح بالكشف عن الانتقالات بين 15 و17 لا يتصورها النمط النووي.

الهدف من دراستنا هو تنفيذ تقنيات التشخيص الخلوي المختلفة: النمط النووي والتهجين الفلوري في الموقع (FISH) في المرضى الذين يعانون من سرطان الدم الحاد النخاعي المستحث خلويًا، من أجل التشخيص النهائي للصيغة الكلاسيكية أو المتنوعة من LAP.

الكلمات المفتاحية: اللوكيميا الحادة، النخاع، LAP، PML-RARA.

Liste des figures :

Figure	Titre	Page
1	Morphologie du chromosome métaphasique.	3
2	Différent types de chromosomes humains.	3
3	Caryotype de type homme normal, (46, XY), préparé et classé selon la méthode classique, basée sur la longueur des bras et la position du centromère	4
4	Différents types de bandes chromosomiques.	5
5	Schéma représente le brin d'ADN matrice dénaturé, est hybridé à la sonde.	7
6	Les différents types de sondes utilisées en hybridation in situ.	8
7	Schéma général de l'affiliation des éléments des différents compartiments de l'hématopoïèse normale chez l'homme.	9
8	Mécanisme de la leucémogénèse	10
9	Origine de la leucémogénèse.	10
10	Blocage de la différenciation au stade promyélocyte suite à la translocation chromosomique t (15;17).	13
11	Localisation de gène <i>RARα</i> (Ch;17) et de gène PML (Ch;15).	15
12	Structure des protéines PML et <i>RARα</i> natives et des deux types de protéines de fusion PML- <i>RARα</i> engendrées par la translocation t(15;17).	16
13	Variantes moléculaires du transcrit de fusion PML- <i>RARα</i> .	17
14	Spécificité de liaison des récepteurs nucléaires à leurs cibles.	18

15	Exemple d'hémogramme d'un patient atteint de la Leucémie aigüe promyélocytaire.	19
16	Les deux types morphologiques de la Leucémie aigüe promyélocytaire.	20
17	Représentation schématique de la translocation réciproque équilibrée t(15;17).	22
18	Caryotype d'un patient atteint de Leucémie aigüe promyélocytaire.	22
19	FISH, mise en évidence du signal de fusion PML-RAR α (sonde RAR α en vert, sonde PML en rouge, et fusion PML-RAR α en jaune).	23
20	Ponction de la moelle osseuse.	27
21	Exemple de caryotype bande R chez un sujet atteint de LAP.	30
22	Observation au faible fronissement (20) pour apprécier la qualité de l'étalement, la mitose en nombre, la qualité de coloration	31
23	Prétraitement des lames.	32
24	Schéma explicatif du dépôt de sondes et la fixation de la lamelle avec rubber cement ou fixo-gum et laisser sécher	33
25	le ThermoBrite	33
26	La microscopie en fluorescence.	35
27	Répartition des patients selon le sexe.	36
28	Histogramme montrant la répartition des patients en fonction de l'âge.	37
29	Le caryotype (bandes R) du patient Gh Ama: 46 XY t(15;17) (q22; q12).	39
30	Résultats de la FISH du patient Gh Ama.	40
31	Le caryotype (bandes R) du patient Ko Sif: 46 XY t(15;17) (q22; q12).	41

32	Résultats de la FISH du patient Ko Sif.	42
33	Le caryotype (bandes R) du patient A K : 46 XY t(15; 17) (q22;q12).	43
34	Résultats de la FISH du patient A k	44
35	Le caryotype (bandes R) du patient Sa Hal : 46 XX t(15;17) (q22;q12).	45
36	Résultats de la FISH du patient Sa Hal.	46
37	Le caryotype (bandes R) du patient Lam Kh: 46 XX t(15;17) (q22;12).	47
38	Résultats de la FISH du patient Lam Kh.	48
39	Le caryotype (bandes R) du patient Lek Mh Ah: 46 XX t(15; 17) (q22;12).	49
40	Résultats de la FISH du patient Lek Mh Ah.	50

Liste des tableaux :

Tableau	Titre	Page
Tableau I	Les deux grands types de leucémies aiguës.	11
Tableau II	cytologie de leucémies aiguës myéloblastique (LAM), classification francoaméricano-britannique « FAB».	12
Tableau III	Taux d'incidence selon l'année (standardisés monde pour 100 000 personnes-années) - Leucémie aiguë promyélocytaire.	14
Tableau IV	Principaux marqueurs exprimés dans la Leucémie aiguë promyélocytaire.	21
Tableau V	caractéristique de la population étudiée.	26
Tableau VI	Présentation des cas.	38
Tableau VII	Les valeurs moyennes de l'hémogramme	51

Glossaire

Anémie microcytaire hypochrome arégénérative : anémie modéré à VGM < 80fl, TCMH < 27pg et le réticulocyte < 150g / l.

Anémies normocytaires normochromes arégénérative : anémies définissent par un taux d'hémoglobine circulante abaissé avec une TCMH et un VGM normaux et les réticulocytes ne sont plus produits ce qui signe une anémie centrale.

Anémie réfractaire avec excès de blastes (AREB) : Elle se manifeste par une pancytopenie (Diminution du nombre des globules rouges, des globules blancs et des plaquettes en présence d'une pathologie sanguine associée) sévère. La blastose sanguine est < 5 % et la blastose médullaire est comprise entre 6 et 20 %.

Cellules souches totipotentes : ce sont des cellules souches capables de former tous les types cellulaires et de ce fait peuvent former un organisme entier multicellulaire. Ce sont des cellules qui se retrouvent dans les ovocytes fécondés jusqu'au quatrième jour (stade morula de 2 à 8 cellules).

Corps d'Auer: est formé par la coalescence de lysosomes réalisant un fin bâtonnet de 2 à 3 µm azurophile, c'est un signe cytologique de différenciation myéloïde.

Fluorochromes : sont des molécules capables d'être excitées (accumulation d'énergie) par une longueur d'onde d'excitation et de longueur d'onde d'émission.

Leucoblaste : est une cellule jeune hématopoïétique c'est-à-dire participant à la formation des globules blancs du sang, indépendamment de son origine.

Marquage : C'est l'étape qui permet d'introduire des fluorochromes dans un fragment d'ADN.

Myéloperoxydase (MPO) : est une enzyme spécifique des granulations primaires des cellules de la lignée granulomonocytaire. La présence de myéloperoxydase est principalement recherchée dans des blastes de leucémie aiguë afin de distinguer les blastes d'origine myéloïde des blastes d'origine lymphoïde.

Neutropénie : est un trouble hématologique caractérisé par un taux bas de granulocytes (ou polynucléaires) neutrophiles dans le sang.

Syndrome myéloprolifératif : est une maladie caractérisée par une production anormale, d'allure cancéreuse, de certains types de cellules sanguines dans la moelle osseuse.

Syndromes myélodysplasiques (SMD) : forment un ensemble de maladies caractérisées par la production insuffisante de cellules sanguines matures saines par la moelle osseuse.

Thrombopénie ou **thrombocytopénie** : est une diminution du nombre de plaquettes sanguines en dessous du seuil de 150 000 plaquettes par mm³.

Liste d'Abréviations

ATO : l'arsenic trioxyde.

ATRA : l'acide trans-rétinoïque.

BCR1 : breaking cluster region 1.

BCR2 : breaking cluster region 2.

BCR3 : breaking cluster region 3.

CCMH : La concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine.

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques.

DAPI : 4',6-Diamidino-2-Phénylindole.

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique.

FAB : la classification internationale (France, Amérique, Grande-Bretagne).

FISH : Fluorescent in situ hybridization.

Kcl : Chlorure de potassium.

LAL : Leucémie aiguë lymphoblastique .

LAM : leucémies aiguës myéloblastiques.

LAP : leucémie aiguë promyélocytaire.

NaCl : Chlorure de sodium.

NaOH : Hydroxyde de sodium.

PML : promyelocytic leukemia.

RARA : Récepteur de l'acide rétinoïque a.

RPMI : Le Roswell Park Memorial Institute medium.

RXR : récepteur de l'acide rétinoïque 9-cis.

T : Translocation.

TGMH : La teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine.

TR : récepteur de l'hormone thyroïdienne T3.

VDR : récepteur de la vitamine D3.

VGM : Le volume globulaire moyen.

Sommaire

Introduction	1
Chapitre I : Partie bibliographique	/
I La cytogénétique	2
I.1. Historique	2
I.2 Définition	2
I.3 La cytogénétique conventionnelle (caryotype)	2
I.3.1 Cycle cellulaire	2
I.3.2 Les chromosomes	3
I.4 Anomalies du caryotype	5
I.5 La Cytogénétique moléculaire (FISH)	6
I.5.1 Principe	6
I.5.2 Technique	7
II. Physiopathologie du sang et du system hématopoïétique	8
II.1 Hématopoïèse	8
II.2 La cancérogène des leucémies	9
III. La leucémie aigüe	11
III.1 Définition	11
III.2 La leucémie aigüe myéloïde (LAM)	11
III. 2.1 Définition	11
III. 2.2 Classification	11
III.3 La leucémie aigüe promyélocytaire (LAP)	13

III. 3.1 Définition	13
III. 3.2 Historique	13
III. 3.3 Epidémiologie	14
III.4 Physiopathologie de la LAP :	14
III.4.1 Chromosome 17 et 15	14
III.4.2 Gène PML/ RAR α et sa protéine	15
III. 4.3 Rôle de PML	16
III.4.4 Variantes moléculaires de PML- RAR α	16
III.4.5 L'acide rétinoïque (AR) et son récepteur α (RAR α)	17
III.4.6 Structure du récepteur α de l'acide rétinoïque	18
III.4.7 Mécanismes de pathogénèse de PML-RAR α	18
IV. Signes cliniques	19
V. Le diagnostic de LAP	19
V.1 Hémogramme	19
V.2 Myélogramme	20
V.3 Immunophénotype par cytométrie en flux	21
V.4 Examen cytogénétique	22
V.4.1 Caryotype	22
V.4.2 FISH	23
V.5 Autre examen	23
VI. Prise en charge de la leucémie aigüe promyélocytaire	24
Chapitre II : Matériels et méthodes	/
I. Patients	26

II. Matériels	26
III. Méthodes :	26
III.1 Prélèvement (ponction de moelle)	26
III.2 Mise en culture cellulaire	27
III.3 Sortie de culture	27
III.4 Le protocole de cytogénétique conventionnelle caryotype (Bandes R)	30
III.5 Protocole de la cytogénétique moléculaire FISH	31
Chapitre III : Résultats et discussion	36
Conclusion	54
Références bibliographiques	55
Annexe	/

INTRODUCTION

Introduction

La leucémie est une affection maligne qui se caractérise par une prolifération de cellules immatures dites blastiques de la moelle osseuse associées à un blocage de la prolifération de cellules normales, elle est cliniquement et pathologiquement scindée en deux: leucémie aiguë et chronique. Elle est aussi scindée en fonction de l'origine des cellules tumorales: cellules lymphoïdes et cellules myéloïdes (**Arock et al, 2008**) (**Burke, 2008**).

La leucémie aiguë promyélocytaire (LAP) est un sous-type des leucémies aiguës non lymphoblastiques (ou leucémies aiguës myéloblastiques (LAM)) dénommée variant M3 dans la classification internationale FAB (France, Amérique, Grande-Bretagne) (**Amparo, 2003**).

La leucémie aiguë promyélocytaire est une maladie rare. Elle est caractérisée par une translocation réciproque entre les chromosomes 15 et 17. Cette anomalie chromosomique est responsable de la fusion du gène PML (leucémie promyélocytaire) avec le gène tronqué RARA (récepteur α à l'acide rétinoïque) entraînant la synthèse d'un récepteur à l'acide rétinoïque anormal (protéine PML/RARA), qui bloque la différenciation des promyélocytes (**John, 2014**).

Les analyses de cytogénétiques ont pour but de détecter l'anomalie chromosomique de La leucémie aiguë promyélocytaire grâce à des techniques microscopiques (caryotype et FISH) afin d'établir un diagnostic biologique (**Cytogénétique Oncologique, 2013**).

Le pronostic des LAP a été transformé suite à l'introduction de thérapeutiques ciblées telles que l'acide trans-rétinoïque (ATRA) et plus récemment l'arsenic trioxyde (ATO), actives respectivement sur la partie RARA et la partie PML de la protéine de fusion PML/RARA (**John, 2014**).

L'objectif de notre étude est de réaliser différentes techniques cytogénétiques ; caryotype et Hybridation fluorescente in situ (FISH), pour des patients atteints de la leucémie aiguë promyélocytaire au sein du laboratoire de cytogénétique, service hématologie, Centre Anti Cancer (CAC) Frantz fanon, pour le diagnostic la leucémie aiguë promyélocytaire.

CHAPITRE I

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. La cytogénétique

I.1 Historique (Annexe)

La cytogénétique, pratiquement née avec le vingtième siècle, est une discipline jeune. Les progrès les plus récents ont amené la transformation des méthodes et l'élargissement des applications. La connaissance de l'organisation des chromosomes a permis de rendre compte des particularités et des variations de l'ADN constitutif. A l'heure actuelle, l'apport cytogénétique est devenu indispensable à plusieurs pathologies humaines (**Springer, 1979**) (**Rabineau et Dupont, 2001**) (**Berger, 2007**) (**Vago, 2009**) (**Achouria, 2012**).

I.2 Définition

La cytogénétique est une science récente. Elle s'intéresse à l'étude des chromosomes normaux et anormaux. La cytogénétique se base sur l'observation du noyau cellulaire en interphase, ainsi que des chromosomes en métaphase. En général la cytogénétique a pour objet :

- Etudes des anomalies chromosomiques constitutionnelles.
- Analyse des anomalies chromosomiques acquises.
- Etablir un diagnostic biologique et d'assurer un conseil génétique.

Ces anomalies peuvent être de nombre (plus ou moins de 46 chromosomes), de structure (modification dans la succession de plusieurs locus) ou de réparation (cassures chromosomiques) (**Abdelali, 2015**).

I.3 La cytogénétique conventionnelle (caryotype)

Le caryotype est une technique qui permet l'étude des chromosomes d'un individu. Cette technique permet d'obtenir une image, en microscopie optique, des chromosomes d'une cellule au cours de la métaphase ou de la prométaphase de la mitose. En génétique médicale, le caryotype contribue à la mise en évidence de remaniements chromosomiques équilibrés ou déséquilibrés. La résolution d'un caryotype standard est celle d'une bande chromosomique, soit environ 5 à 10 millions de paires de bases (**Cédric, 2010**).

I.3.1 Cycle cellulaire

Le cycle cellulaire couvre la totalité de la période qui s'écoule entre deux divisions cellulaires. Durant cette période le noyau de la cellule somatique passe par quatre phases successives :

- LA PHASE G1 : phase de croissance cellulaire et d'activités métaboliques normales.
- LA PHASE S : phase de la réplication de l'ADN (la quantité d'ADN est doublée en vue de la mitose).
- LA PHASE G2 : phase préparant la mitose (synthèses d'enzymes, d'organites...).

Ces 3 phases constituent ce que l'on appelle, l'interphase.

- LA MITOSE : division du noyau en deux parties identiques (Turner, 2002).

Pour le caryotype on doit avoir des cellules en métaphase (c'est le seul moment où les chromosomes vont être individualisables) (Abdelali, 2015).

I.3.2. Les chromosomes

I.3.2.a Morphologie du chromosome métaphasique

Le chromosome métaphasique est constitué de deux chromatides attachées par le centromère. Le centromère est la constriction primaire qui permet de séparer le chromosome en deux régions principales : un bras court P (par convention situé au-dessus du centromère) et un bras long q (en-dessous du centromère). Les extrémités des bras chromosomiques sont des régions appelées télomère (Dupont, 2008).

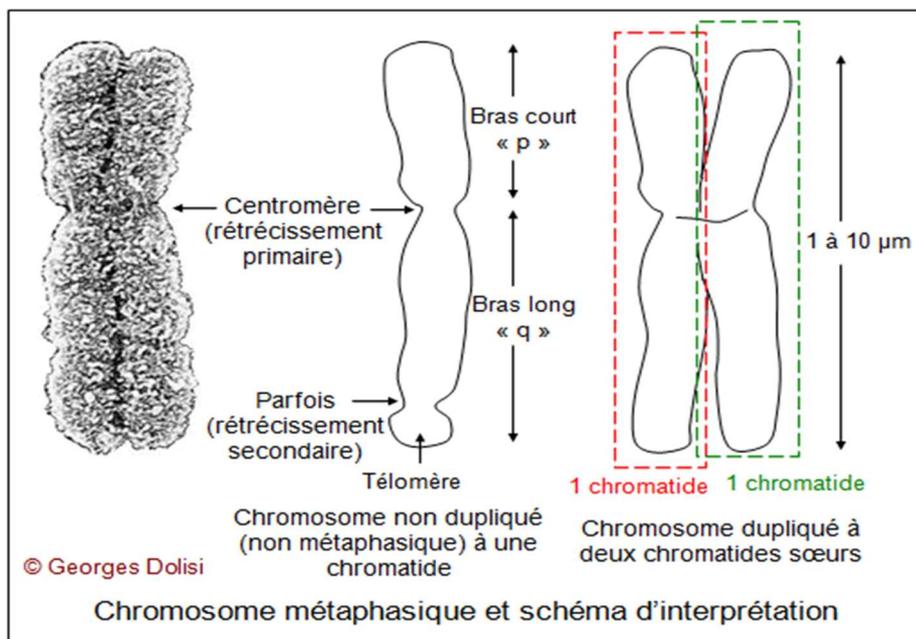


Figure 1 : morphologie du chromosome métaphasique (Dupont, 2008).

Les chromosomes de métaphase diffèrent par la taille, la dispositions du centromère et la présence de satellites (Figure 2).

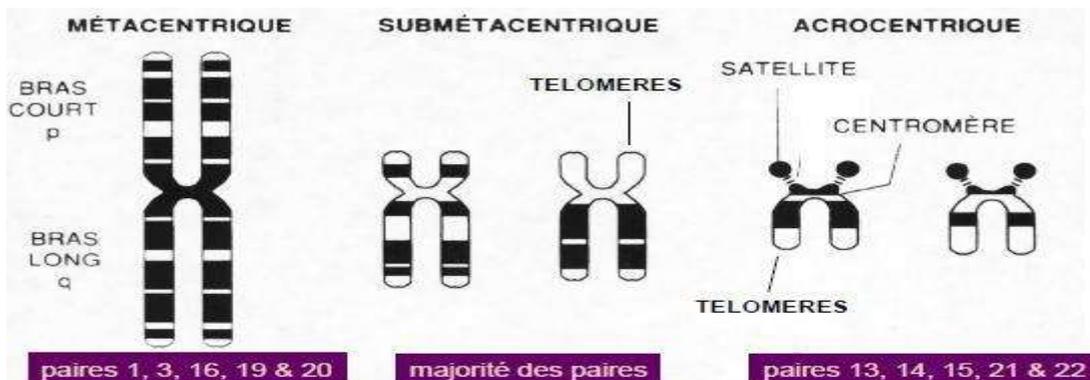


Figure 2 : différents types de chromosomes humains (Docplayer, 2015).

En fonction de la position du centromère, on reconnaît trois groupes morphologiques de chromosomes :

- **Métacentrique**: bras court = bras long
- **Submétacentrique**: bras court plus petit que bras long
- **Acrocentrique**: Bras courts, très petits fabriqués de satellite (emballage) au bout desquels on retrouve l'ADN codant pour les ribosomes.

Sur chaque chromosome, on définit différentes parties (région) :

- Ces régions sont subdivisées en divers bandes.
- Ces bandes sont subdivisées en plusieurs sous-bandes, et ceci permet de nommer chaque portion du chromosome (**Rumpler, 2000**).

1.3.2.b Classification des chromosomes :

En fonction de la taille et de la position du centromère, les chromosomes sont classés en 7 groupes (**Figure 3**) :

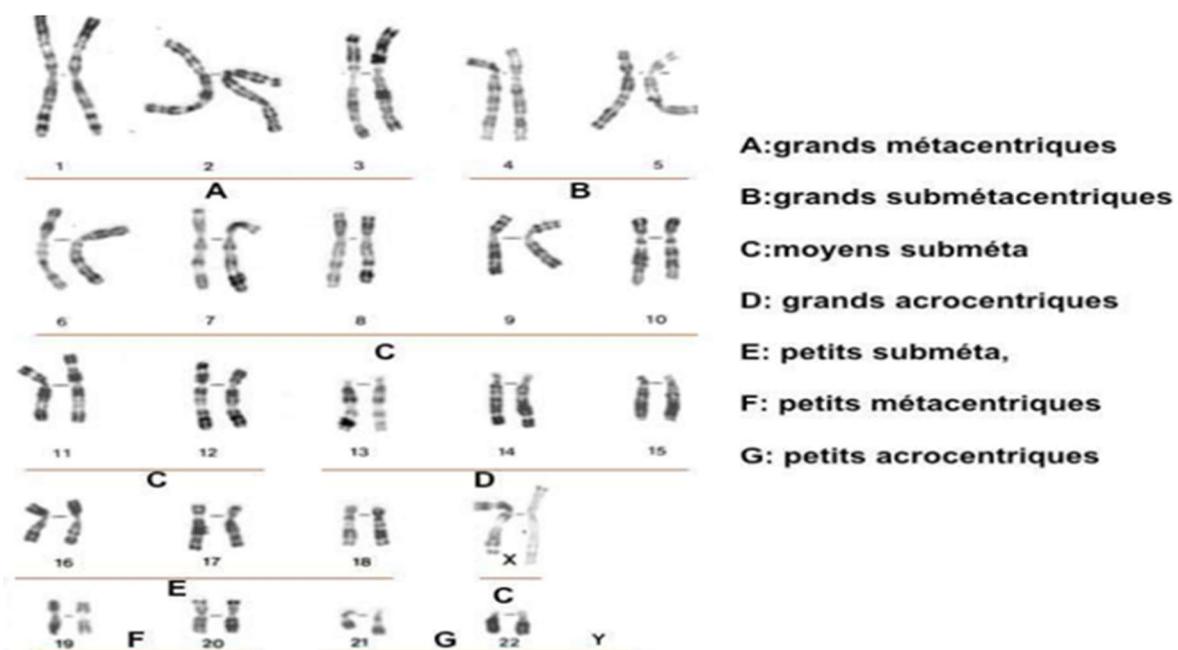


Figure 3 : Caryotype de type homme normal, (46, XY), préparé et classé selon la méthode classique, basée sur la longueur des bras et la position du centromère (**Abdelali, 2015**).

1.3.2.c Les bandes chromosomiques

Qui sont caractéristiques de chacune des paires. Le nombre de bandes visibles est variable d'une mitose à l'autre et dépend du niveau de condensation du chromosome.

Les différents types de bandes chromosomiques :

- **Les bandes G (Giemsa)** : obtenues par digestion trypsinique modérée des chromosomes suivie d'une coloration au Giemsa. Elles sont les plus utilisées en raison de leur facilité d'obtention.

- **Les bandes Q (Quinacrine):** obtenues après coloration par la moutarde de Quinacrine. Sous UV les chromosomes présentent des bandes fluorescentes, de même que les bandes G.
- **Les bandes R (Reverse) :** dénaturation thermique des chromosomes puis Giemsa..
- **Les bandes C :** cette technique colore les centromères des chromosomes 1,9 et 16 (Abdelali, 2015).

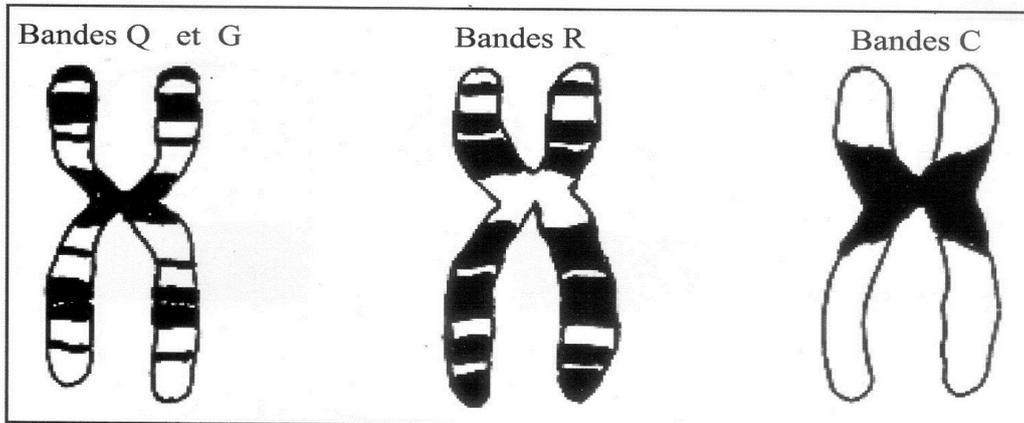


Figure 4 : différents types de bandes chromosomiques (Abdelali, 2015).

I.4 Anomalies du caryotype

- Anomalies chromosomiques **constitutionnelles** qui sont des anomalies chromosomiques survenues avant la fécondation, lors des premières divisions du zygote.
- Anomalies chromosomiques **acquises** qui vont apparaître chez l'individu au cours de sa vie et ne toucher qu'un seul organe (ne concernera pas la descendance).
- Anomalies chromosomiques **homogènes** quand toutes les cellules de l'individu présentent l'anomalie.
- Anomalies chromosomiques en **mosaïque** quand on a chez le même individu plusieurs populations de cellules (en général 2) avec des caryotypes différents.
- Anomalies chromosomiques **héritées**, dont on sait qu'elles ont déjà existé dans la famille et sont potentiellement transmissibles (Pascale, 2015).

➤ Anomalies du nombre

- **La polyploïdie :** Absence d'un chromosome ou la présence d'un Chromosome surnuméraire du lot haploïde, et elle est due à un accident de la fécondation
- **La trisomie :** Une trisomie correspond à la présence d'un chromosome supplémentaire. Le nombre de chromosomes est donc de 47 et non plus de 46
- **Les aneuploïdies:** Présence d'au moins 3 chromosomes de chaque Type (Julie, 2014).

➤ Anomalies de structure

1) Délétions : Les délétions résultent d'une cassure chromosomique avec perte du segment distal (délétion terminale), ou de deux cassures sur un même bras chromosomique avec perte du segment intercalaire (délétion intercalaire) (Nayazic, 2015).

2) Chromosomes en anneau : Les anneaux résultent d'une cassure à chaque extrémité d'un chromosome suivie par un recollement avec perte des segments distaux (Nayazic, 2015).

3) Inversions : Les inversions sont dues à deux cassures sur le même chromosome, suivies de recollement après inversion du segment intermédiaire. Elles sont dites péricentriques si le centromère est compris dans le segment intermédiaire (Nayazic, 2015).

Elles sont dites paracentriques si les deux cassures se sont produites sur le même bras chromosomique.

4) Isochromosomes : Un isochromosome est un chromosome anormal formé de deux bras longs ou de deux bras courts d'un même chromosome avec perte de l'autre bras (Nayazic, 2015).

5) La duplication: même des chromosomes normaux contiennent des séquences de gène qui se répètent de quelques dizaines à plusieurs milliers de fois (Briard, 2006).

6) Les translocations : Echanges de segments chromosomiques entre deux chromosomes. Il ya deux types :

- Réciproques: des segments de deux chromosomes différents sont échangés.
- Roberstonienne: un chromosome entier s'attache à un autre (Briard, 2006).

I.5 La Cytogénétique moléculaire (FISH)

I.5.1 PRINCIPE

La cytogénétique moléculaire se situe à mi-chemin entre la cytogénétique conventionnelle et la biologie moléculaire. Son outil principal est la méthode d'hybridation in situ fluorescente ou FISH qui a considérablement amélioré l'analyse cytogénétique des hémopathies malignes. Cette méthode repose sur l'utilisation d'une sonde moléculaire, c'est-à-dire une petite séquence d'ADN (ou ARN) dont l'emplacement normal est connu dans le génome. La sonde est marquée chimiquement de façon à pouvoir être repérée par la suite. la sonde va s'hybrider c'est-à-dire se fixer de façon spécifique au niveau de sa séquence ADN complémentaire cible (chromosomes ou noyaux d'une préparation cellulaire du patient). La position respective des sondes est ensuite visualisée Par microscope à fluorescence. Ceci permet la détection de séquences nucléotidiques recherchées sur l'ADN génomique (Abdelali, 2015).

I.5.2 Les cibles

Il existe deux types majeurs de cibles, les chromosomes métaphasiques et les noyaux interphasiques.

1) L'hybridation in situ fluorescente sur chromosomes métaphasiques

Technique qui repose de la préparation de noyaux et mitoses (résultat d'une culture cellulaire). Cette technique permet la mise en évidence des remaniements infracytogénétiques telles que les microdélétions, l'interprétation des remaniements de structure les plus complexes et l'identification des marqueurs chromosomiques non identifiables en cytogénétique conventionnelle.

2) L'hybridation in situ fluorescente sur noyaux interphasiques

Technique qui repose de la préparation de noyaux seulement (sans culture cellulaire ou échec de culture). Cette technique permet l'analyse rapide d'un grand nombre de cellules en évitant l'étape de culture préalable, ce qui permet des diagnostics directs avec des délais de réponses plus courts, particulièrement utiles dans le domaine du diagnostic prénatal. Il est possible de déterminer les anomalies de nombre (Mylène, 2005).

I.5.3 Les sondes

Les sondes sont réalisées selon divers protocoles, tous basés sur la reconstitution d'un brin d'ADN comportant des moyens de reconnaissance de la sonde. La sonde est couplée avec une molécule fluorescente, ou bien une molécule pouvant être reconnue par anticorps (Abdelali, 2015).

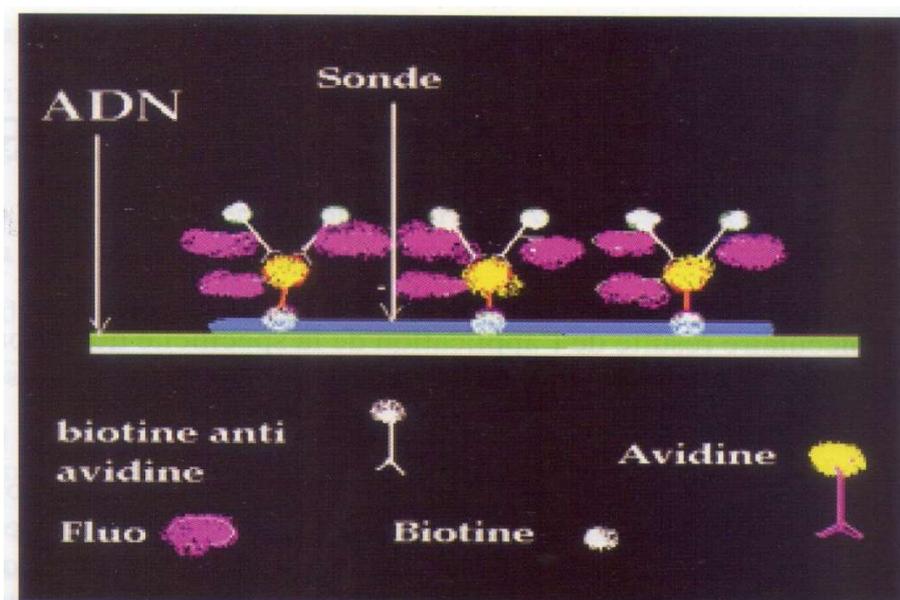


Figure 5: Schéma représente le brin d'ADN matrice dénaturé, est hybridé à la sonde (Abdelali, 2015).

Il existe différents types de sondes (**Figure 6**) :

- **Les sondes centromériques** : Reconnaisent des séquences répétitives spécifiques des régions centromériques. Elles sont utiles pour dénombrer les chromosomes, aussi bien en métaphase qu'en interphase et pour identifier l'origine de chromosomes marqueurs.
- **Les sondes de peinture chromosomique** : Spécifique d'un chromosome entier ou d'un bras court ou d'un bras long. Ces sondes sont utiles pour l'interprétation des translocations complexes, et d'identifier l'origine précise d'un fragment.
- **Les sondes spécifiques de locus** : Ce sont des sondes de petite taille, elles sont utilisées pour la mise en évidence rapide de remaniement impliquant une région chromosomique précise (microdélétion, translocation) (**Abdelali, 2015**).

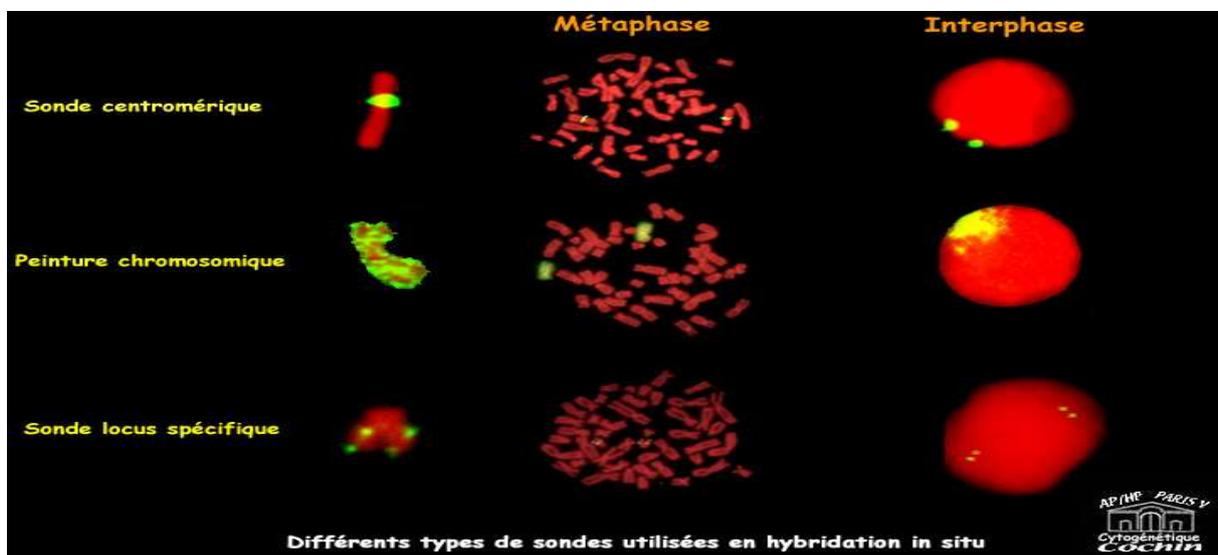


Figure 6 : Les différents types de sondes utilisées en hybridation in situ (**Dupont, 2008**).

II. Physiopathologie du sang et du system hématopoïétique

II.1 Hématopoïèse

L'hématopoïèse est un mot d'origine grecque, se composant de deux termes : hémato pour le sang et poïèse pour la création. Ce processus physiologique qui se déroule principalement dans la moelle osseuse permet la production, le développement et la maturation des cellules sanguines. Cette activité de production a pour origine une cellule souche commune totipotente qui va se différencier vers la voie myéloïde ou vers la voie lymphoïde. La CSH est doté d'un potentiel d'auto-renouveaulement (la capacité de donner naissance, en se divisant, à des cellules filles qui lui sont identique) et une capacité d'engagement en différenciation (orientation progressive vers une lignée spécialisée). L'hématopoïèse comprend respectivement, 4 compartiments cellulaires : les cellules souches pluripotentes, les progéniteurs, les précurseurs et les cellules matures (**Figure7**).

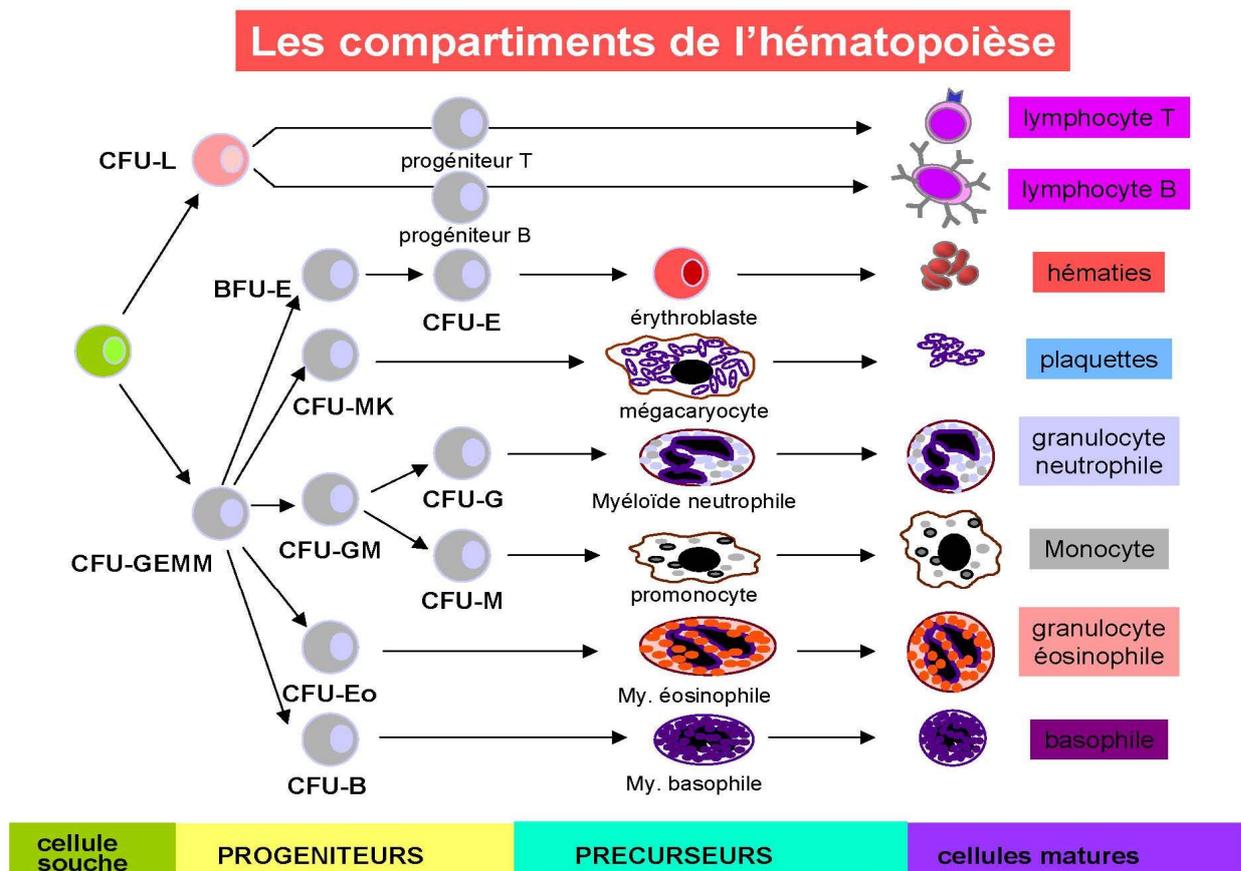


Figure 7 : Schéma général de l'affiliation des éléments des différents compartiments de l'hématopoïèse normale chez l'homme. (Lacombe, 2006).

II. 2 La cancérogènes des leucémies (leucémogénèse)

La leucémogénèse est l'ensemble des mécanismes responsables d'une prolifération cellulaire avec blocage de la maturation (**Figure 8**). Le processus leucémique est donc l'apparition d'un clone cellulaire provenant d'une cellule immature à un moment quelconque de sa Différenciation. Le type de leucémie aiguë est ainsi déterminé par l'origine de la lignée cellulaire dont provient le clone et par le degré de différenciation atteint au moment de la transformation maligne (**Figure 9**). Ces cellules malignes envahissent la moelle osseuse et peuvent passer dans le sang. Elles sont bloquées dans leur différenciation, à la différence des clones cellulaires des syndromes myéloprolifératifs et des syndromes myélodysplasiques, et ne peuvent aboutir à une hématopoïèse normale et efficace. Parallèlement, la diminution de l'hématopoïèse résiduelle définit l'insuffisance médullaire et les cytopénies périphériques conséquentes (Dick, 2008 ; Lopis, 2009).

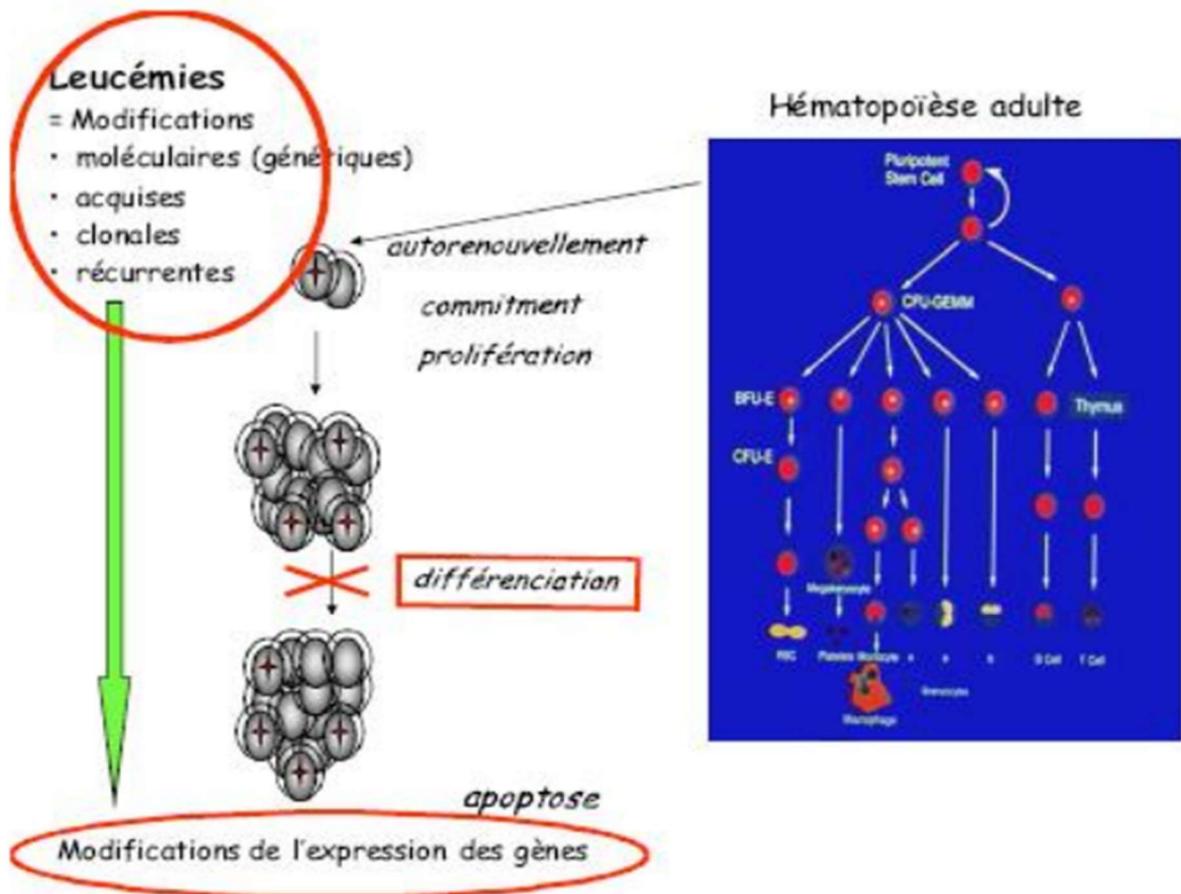


Figure 8: Mécanisme de leucémogénèse (Masterpod, 2008).

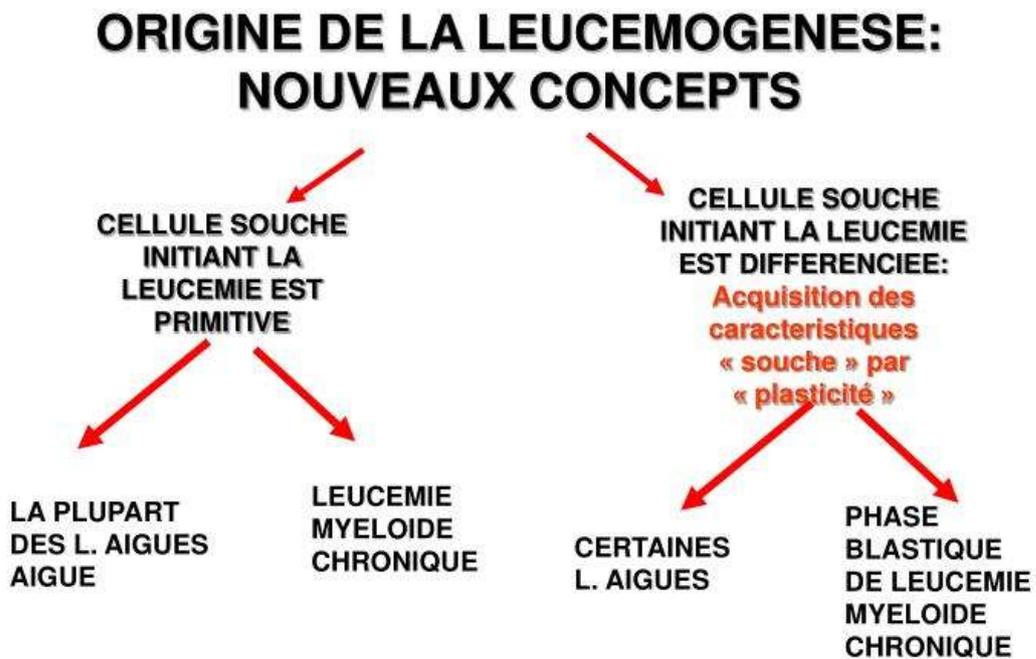


Figure 9 : Origine de la leucémogénèse. (Durham, 2014).

III. La leucémie aigüe

III.1 Définition

Une leucémie aigüe est une prolifération maligne de cellules de la moelle osseuse ; ces cellules, appelées leucoblastes sont normalement chargées de donner naissance aux cellules sanguines matures. Ces leucoblastes tumoraux vont progressivement envahir la moelle osseuse et vont être retrouvés dans le sang. Ils prolifèrent très rapidement (**Jérôme ,2008**).

Ces leucoblastes d'origine lymphoïde ou myéloïde sont bloqués à un stade immature ; cela explique que leur multiplication est très active et produit un clone de cellules identiques, qui envahissent la moelle et disséminent vers les autres organes par la circulation sanguine et lymphatiques (syndrome tumorale) (**Bell, 2010**).

On distingue deux grands types de leucémies aiguës en fonction de l'origine du précurseur hématopoïétique atteint (**tableau I**).

Tableau I : Les deux grands types de leucémies aiguës (**Claude, 2002**) (**Benakli, 2009**).

Leucémies aiguës myéloïdes (LAM)	Leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL)
Les plus fréquentes des leucémies aiguës de l'adulte	Les plus fréquentes des leucémies de l'enfant
Age médian de survenue autour de 65 ans (l'incidence augmente avec l'âge)	Age de survenue surtout entre 2 et 15 ans
Rares chez l'enfant, elles surviennent alors en général avant 2 ans ou après 15 ans	Rares chez l'adulte

III. 2 La leucémie aigüe myéloïde (LAM)

III.2.1 Définition

Les leucémies aiguës myéloblastiques sont des proliférations néoplasiques de précurseurs médullaires des lignées granuleuses ou monocytaires, associées à un blocage de maturation de ces précurseurs au stade de blastes, qui s'accumulent dans la moelle, dans le sang, et éventuellement dans d'autres organes. Par ailleurs, il existe un déficit de production de cellules matures, d'où une anémie, une neutropénie et une thrombopénie, et leurs conséquences cliniques (**Löwenberg et al, 1999**).

III.2.2 Classification

Publiée en 1976, (**Gordon et al, 2001**). Elle propose une nomenclature simplifiée tenant compte à la fois de la spécificité de la lignée impliquée (lymphoblastique ou myéloblastique), et de son niveau de maturation (**Tableau II**).

Tableau II : cytologie de leucémies aigues myéloblastique (LAM), classification francoaméricano-britannique « FAB» (Gordon *et al*, 2001).

Type	Définition	Anomalies cytogénétiques
LAM0 Indifférenciée	Inclassable par morphologie et cytochimie. MPO intracytoplasmique + en immunophénotypage.	-
LAM1 Sans maturation	> 90% de blastes sans maturation granuleuse. Corps d'Auer +/-	-
LAM2 Avec maturation	30 à 90% de blastes avec maturation granuleuse représentant > 10% de la cellularité. Corps d'Auer fréquents	t(8 ; 21) (q22 ; q22)
LAM3 Promyélocytaire	Majorité de promyélocytes anormaux Corps d'Auer fréquents	t(15 ; 17) (q24 ; q21)
LAM4 Monoblastique	Moelle > 30% de blastes, 20 à 80% de cellules monocytaires sang > 5G/L cellules monocytaires. M4 avec éosinophilie (M4Eo) : granulations éosinophiles dans le cytoplasme.	t(9, 11) t(1, 11) inversion ch 16
LAM5 Sans maturation	LAM5a : peu différenciée (monoblastes > 80% des cellules monocytaires). LAM5b : différenciées (monoblastes < 80% des cellules monocytaires)	Anomalie impliquant la bande 11q23
LAM6 Erythroleucémie	Blastes > 30% des éléments non érythroblastiques. Erythroblastes > 50% des éléments nucléés avec dysérythropoïèse.	-
LAM7 Mégacaryoblastique	Reconnaissance par anticorps monoclonaux Le plus souvent	t(1 ; 22°) (q13. q13) Anomalie du ch 21.

III.3 La leucémie aigüe promyélocytaire (LAP)

III.3.1 Définition

La leucémie aigüe promyélocytaire (LAP) ou LAM3 est un sous type de leucémie aigüe myloblastique, touche la lignée granulocytaire et représente environ 8 à 10% des cas de leucémies aigües myloblastiques. Elle se caractérise par l'accumulation de cellules myéloïdes bloquées dans leur processus de différenciation au stade promyélocytaire dans la moelle osseuse. Ce blocage du processus de différenciation est causé, dans près de 95% des cas par la translocation chromosomique t(15, 17) (**Figure 10**). Cette translocation entraîne une fusion des gènes PML (Promyélocytic Leukemia) et RAR α (Retinoic Acid Receptor) et génère la protéine oncogénique PML-RAR α , qui est un acteur clé dans l'induction de la LAM3. Cette pathologie survient chez des adultes avec une distribution égale dans les deux sexes (**Degos, 2001**) (**Chen et al, 2011**).

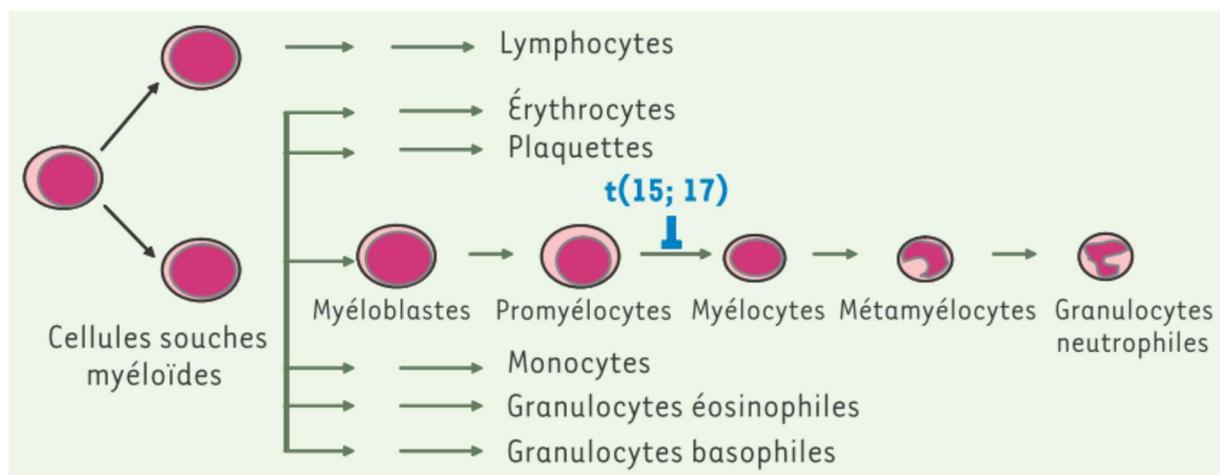


Figure 10 : Blocage de la différenciation au stade promyélocytaire suite à la translocation chromosomique t(15;17) (**Pierre, 2008**).

III.3.2 Historique

Historiquement, les premières LAP ont été décrits en 1957 chez trois patients suédois par Hillestad. Celui-ci considérait cette entité comme la forme de LAM la plus agressive, associant envahissement sanguin par des promyélocytes et une prédisposition à des saignements sévères (**Hillestad, 1957**).

En 1977, Janet Rowley avait découvert, pour sa part, que la maladie était associée à une translocation entre les chromosomes 15 et 17, et c'est au début des années 1990 qu'a été découverte l'implication de la fusion entre le gène RAR α sur le chromosome 17 et le gène initialement inconnu nommé PML (promyelocytic leukemia) sur le chromosome 15 (**Lancet, 1977**) (**De The H et al, 1991**).

III.3.3 Epidémiologie

Représente 8 à 10% des leucémies aiguës myéloblastiques Prédomine chez l'adulte d'âge moyen.

Bien que l'incidence réelle de la LAM3 reste inconnue, il s'agit d'une hémopathie relativement rare et même très rare chez les enfants de moins de 10 ans. Son incidence augmente pendant l'adolescence pour atteindre un plateau à l'âge adulte précoce et rester constante avant de décroître après l'âge de 60 ans. Cette épidémiologie est en contraste avec les autres LAM dont les incidences augmentent de façon exponentielle après 55 ans (**Douer, 2003**).

Le taux d'incidence standardisé sur la population mondiale est de 0,2 pour 100 000 chez l'homme comme chez la femme, soit un rapport hommes/femmes de 1 (**Tableau III**).

	Sexe	Année				
		2003	2005	2007	2010	2012
Incidence	Homme	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	Femme	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Tableau III : Taux d'incidence selon l'année (standardisés monde pour 100 000 personnes-années) - Leucémie aiguë promyélocytaire.

III.4. Physiopathologie de la LAP

III.4.1 Chromosome 15 et 17

Les LAP sont caractérisées par l'existence d'une translocation acquise, réciproque et équilibrée, la translocation t (15;17). Celle-ci est retrouvée dans plus de 95% des cas de leucémies aiguës promyélocytaires (**Cordonnier et al, 1985**).

Cette translocation aboutit à la juxtaposition du gène promyelocytic leukemia (*PML*) situé au niveau du bras long du chromosome 15, en 15q24.1, et du gène du récepteur de l'acide rétinoïque (*RAR*) localisé au niveau du bras long du chromosome 17, en 17q21.2 (**Figure11**) (**De The H et al, 1990**) (**Biondi et al, 1991**).

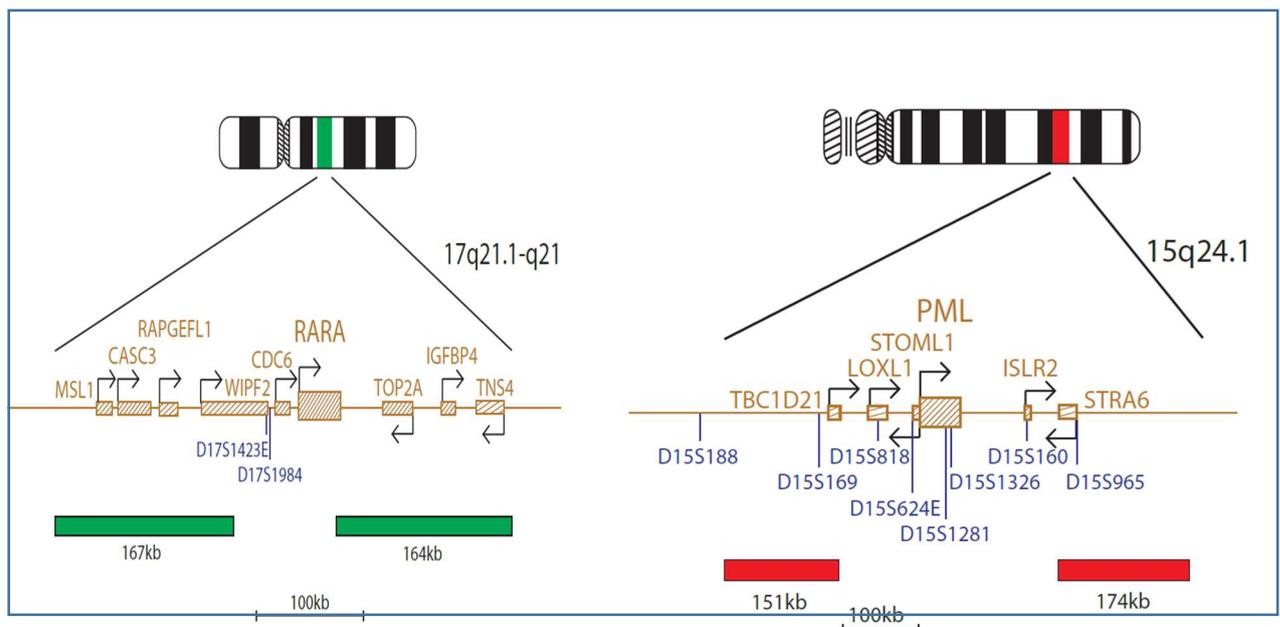


Figure 11 : Localisation de gène *RARA* Ch;17) et de gène *PML* (Ch;15) (Cytocell, 2014).

III.4.2 Gène *PML*/ *RARα* et sa protéine

La translocation $t(15; 17)$ engendre une fusion entre les gènes *PML* et *RARα*, localisés respectivement sur les chromosomes 15 et 17, telle que l'expression de la protéine hybride *PML-RARα* est placée sous le contrôle du promoteur du gène *PML* (Cell, 1991) (Science, 1991).

Dans les cellules des LAP, on observe généralement une surabondance de la protéine *PML-RARα* par rapport au récepteur natif. La chimère retient la majeure partie des domaines fonctionnels des deux protéines natives, notamment le RING finger, les boîtes B et la région en hélice a au sein de *PML*, ainsi que les domaines B à F de *RARα*. Alors que le point de cassure sur le chromosome 17 est toujours situé au niveau du deuxième intron du gène *RARα*, ce qui a pour effet d'entraîner la délétion de la région A, deux points de cassure principaux au sein du gène *PML* définissent deux protéines chi métriques différentes. Dans 90 % des cas, la translocation s'effectue, soit au niveau du troisième intron, soit au niveau du sixième intron, engendrant respectivement les protéines *PML-RARα* S et *PML-RARα* L. Le fait que le produit de fusion réciproque *RARα-PML* ne soit pas présent de façon systématique chez tous les malades atteints de leucémie aiguë promyélocytaire (LAP) suggère fortement que seul l'hybride *PML-RARα* joue un rôle majeur dans le développement de la maladie (Figure12) (Alcalay; Kastner,1992) (Warrel,1993).

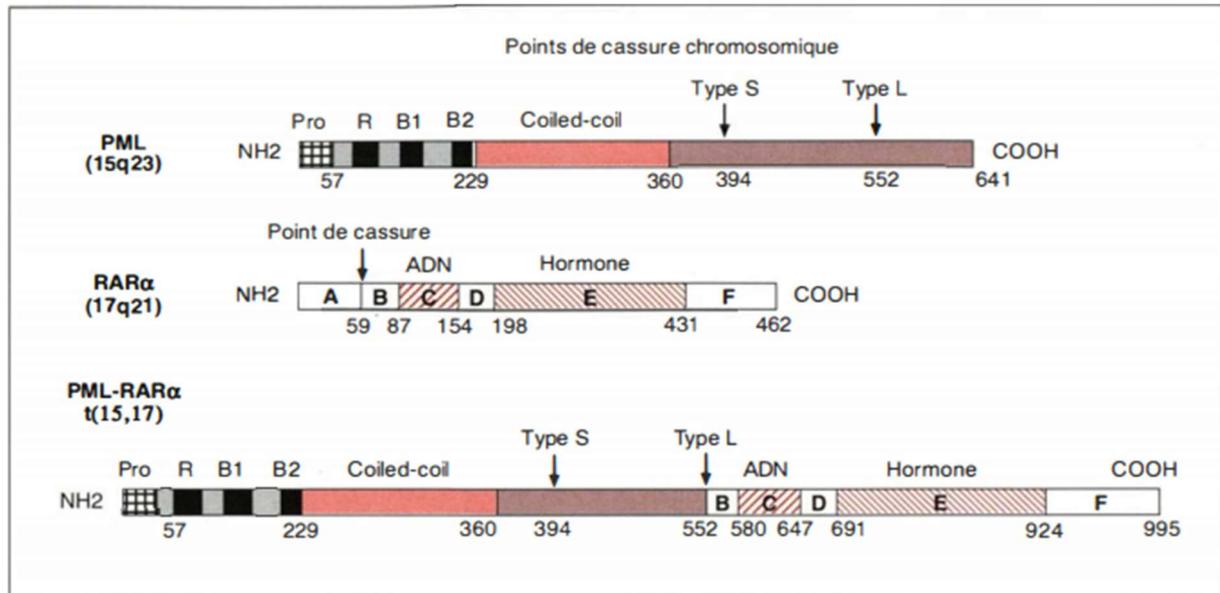


Figure 12 : Structure des protéines PML et RAR α natives et des deux types de protéines de fusion PML-RAR α engendrées par la translocation t(15;17) (Catherine, 1994).

III.4.3 Rôle de PML

Les fonctions précises de PML ne sont pas encore entièrement claires. L'étude des souris Knock-out PML $^{-/-}$ et de son hyperexpression dans les lignées cellulaires d'origine diverses a permis d'impliquer PML dans plusieurs processus cellulaires incluant l'apoptose et la croissance cellulaire, la suppression de tumeur, la régulation transcriptionnelle, la stabilité génomique et la réponse aux infections virales (Leukemia, 2002).

PML a un rôle de suppresseur de tumeur comme l'indique la susceptibilité accrue des souris PML $^{-/-}$ au développement de tumeurs après exposition à des carcinogènes. Cette activité s'exerce à plusieurs niveaux, par contrôle de la croissance cellulaire, de la survie cellulaire et de la stabilité génomique. L'hyperexpression de PML induit un arrêt de croissance de toutes les lignées, et les cellules PML $^{-/-}$ en culture ont une croissance plus élevée que les cellules normales, indiquant un rôle d'inhibition du cycle cellulaire. PML est également un facteur pro-apoptotique impliqué dans les voies dépendantes et indépendantes de p53 et a été impliqué dans le maintien de la stabilité génomique (Science, 1998) (Bioessay, 2000).

III.4.4 Variantes moléculaires de PML-RAR α

Trois formes moléculaires sont distinguées en fonction de la localisation du point de cassure dans le gène PML, sur le chromosome 15. Si le point de cassure survient au niveau de sixième intron (55% des cas), le transcrite de fusion sera du type BCR1 (breaking cluster region 1). Le type BCR2, plus rare (5%), est défini par une cassure localisée au sein du 6^{ème} exon ; ces 2 types, de taille très proche, ne sont pas distingués actuellement par les techniques de biologie moléculaire utilisées en routine. Le type BCR3, retrouvé dans environ 40 des cas est associé à la forme morphologique variante correspond à un transcrite de fusion plus court, avec un point

de cassure plus de 5' du gène PML, au niveau du 3^{ème} intron. Ces trois formes moléculaires aboutissent toutes à la formation d'un transcrite de fusion et d'une protéine chimérique PML-RAR α , le point de cassure sur le chromosome 17 est unique, au niveau du 2^{ème} intron du gène RAR α (Embo, 1992) (Haematol, 1998).

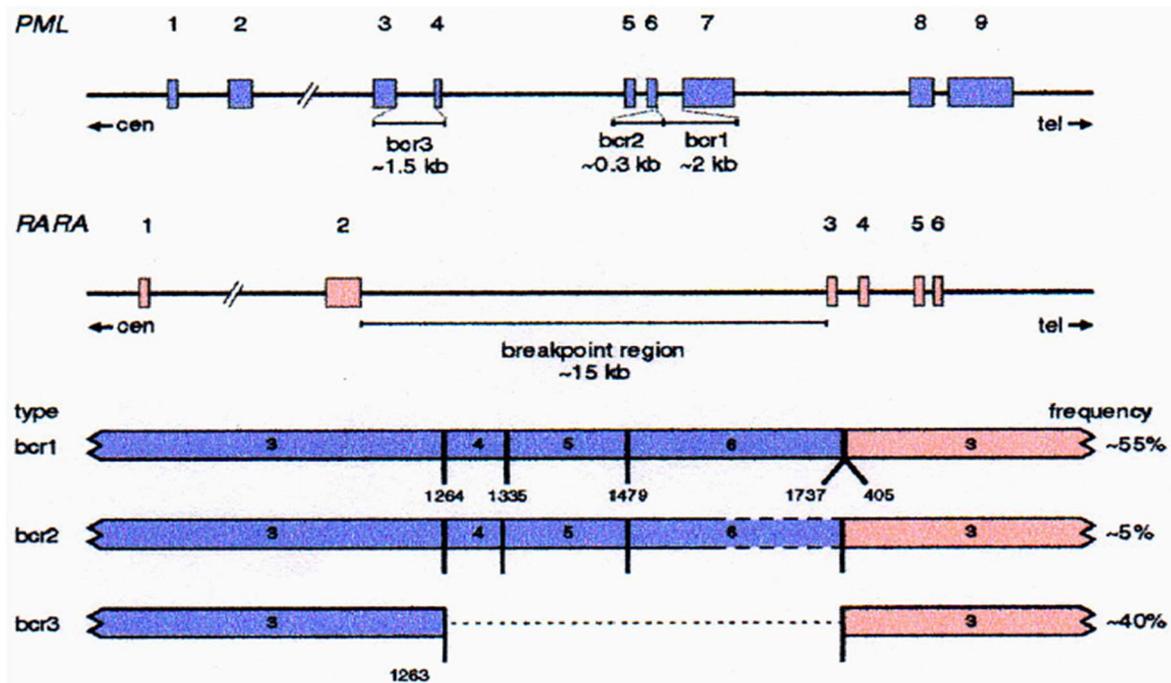


Figure 13 : Variantes moléculaires du transcrite de fusion PML-RAR α (Haematol, 1998).

III.4.5 L'acide rétinoïque (AR) et son récepteur α (RAR α)

L'acide rétinoïque (AR) et son récepteur α (RAR α) jouent un rôle important dans le développement de la lignée myéloïde.

L'acide rétinoïque (AR) est un métabolite de la vitamine A dont l'activité biologique est médiée par liaison à des récepteurs nucléaires spécifique, les RARs (α , β et γ) et les RXRs (α , β et γ). Ces deux types de récepteurs sont activés par l'acide rétinoïque 9-cis, RAR étant aussi sensible à l'ATRA. Ces récepteurs forment des hétérodimères (RAR/RXR) se liant à des motifs d'ADN nommés RAREs (rétinoïc acid-response elements) localisés dans la région promotrice des gènes cible de la voie de l'AR.

En l'absence de ligand, ces hétérodimères sont capables de lier les séquences RAREs avec une forte affinité et exercent une activité répressive sur la transcription des gènes en s'associant à un complexe contenant des co-répresseurs N-CoR (nuclear receptor co-repressor). Ces co-répresseurs, à leur tour, recrutent des histone-déacétylases (HDAC), entraînant une déacétylation des histones et une condensation de la chromatine. La chromatine, dans cette configuration, est inaccessible à la machinerie transcriptionnelle, il en résulte donc une répression des gènes cibles.

La liaison de l'AR à son récepteur α induit un changement conformationnel de RAR α permettant la dissociation du complexe co-répresseur et le recrutement de molécules co-activatrices (CBP,

ACTR...) qui entraînent une acétylation des histones et donc une décondensation de la chromatine. Ce relâchement chromatinien permet au complexe d'initiation de la transcription d'accéder à l'ADN et donc d'activer l'expression des gènes nécessaires à la différenciation granuleuse.

RAR α a donc une fonction double : non lié, il apparaît de la maturation myéloïde comme un régulateur négatif alors que lié, il stimule cette différenciation (Leukemia, 2002).

III.4.6 Structure du récepteur α de l'acide rétinoïque

Les récepteurs nucléaires, sous la forme d'un hétérodimère avec la molécule RXR, lient un motif d'ADN, présent dans la région promotrice des gènes cibles, composé d'une séquence consensus (A GGTCA) directement répétée et espacée par un nombre variable de nucléotides (de 1 à 6 pb). L'espacement entre les deux motifs répétés spécifie le type de réponse hormonale. RXR : récepteur de l'acide rétinoïque 9-cis (9-c-AR), PPAR : récepteurs activés par les proliférateurs de peroxydome et les acides gras, VDR : récepteur de la vitamine D, TR : récepteur de l'hormone thyroïdienne T3, RAR : récepteur de l'acide rétinoïque tout-trans (T-AR) (Green ; Embo, 1993).

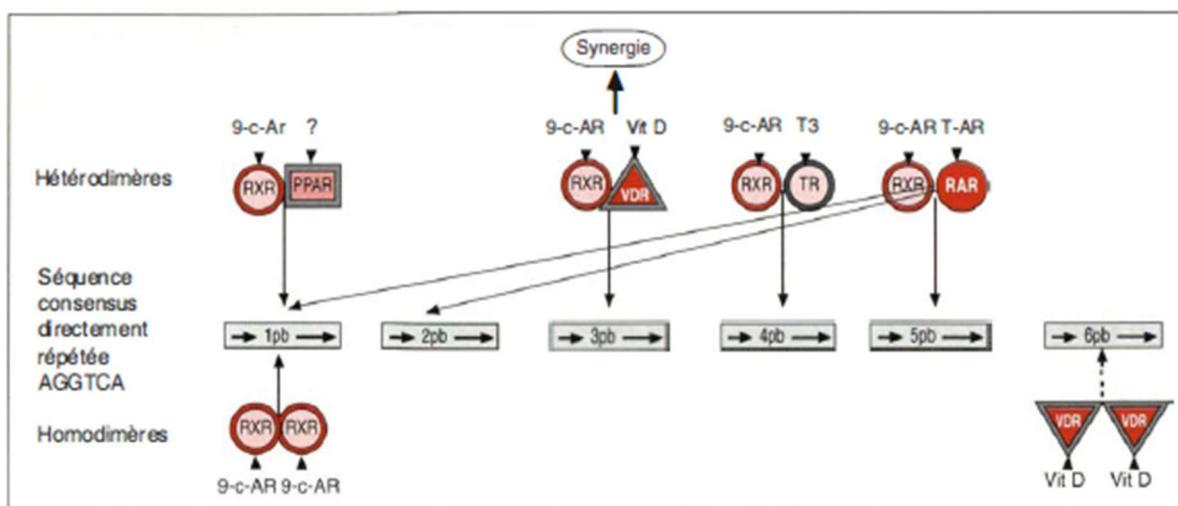


Figure 14 : Spécificité de liaison des récepteurs nucléaires à leurs cibles (Catherine, 1994).

III.4.7 Mécanismes de pathogénèse de PML-RAR α

La t (15 ; 17) génère 2 protéine de fusion PML-RAR α et RAR α - PML, mais c'est l'isoforme PML-RAR α qui contribue majoritairement à la pathogénèse de LAP. Cette protéine de fusion conserve les domaines principaux de chacune des 2 protéines : la portion RAR α reste capable de lier l'ADN et de s'hétérodimériser avec RXR. Cependant, contrairement à RAR α , PML-RAR α peut également lier les séquences RAREs sous forme d'homodimères. En conséquence, la liaison des homodimères PML-RAR α et des hétérodimères PML-RAR α / RXR aux séquences RAREs, a un effet dominant-négatif sur la protéine RAR α sauvage. En l'absence de ligand, PML-RAR α réprime la transcription plus fortement que RAR α sauvage car elle s'associe aux co-répresseurs de façon plus étroite. De plus, la répression transcriptionnelle est accrue par une

méthylation aberrante de l'ADN, liée au recrutement d'ADN méthyltransférase par la protéine de fusion. D'autre part, la formation d'hétérodimères PML-RAR α /RXR provoque une séquestration de RXR qui ne peut interférer avec d'autres récepteurs nucléaires d'hormone comme le récepteur aux hormones thyroïdiennes qui requiert l'association aux RXR pour lier l'ADN. Enfin, PML-RAR α se lie à PML, ce qui entraîne la fragmentation des corps nucléaires et donc la délocalisation de PML et des autres composants des NBs (**Science, 2002**).

IV. Signes cliniques

Les signes cliniques pouvant être mis en évidence chez les patients atteints de LAP, sont identiques à ceux pouvant être retrouvés chez les patients atteints d'autres LAM. L'accumulation de blastes dans d'autres organes, la leucostase et l'envahissement neuro-méningé sont rares dans les LAP. Il faut cependant noter que dans ces leucémies existe souvent au diagnostic un syndrome hémorragique diffus sévère, attribué par le Professeur Jean Bernard, en 1959, à une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) et à une hyperfibrinolyse. La tendance aux saignements est augmentée par le relargage de facteurs procoagulants par les leucoblastes promyélocyaires dans la circulation, exacerbant la CIVD (**Wochenschr, 1959**).

V. Le diagnostic de LAP

Il est assuré par des examens biologiques :

V.1 Hémogramme

L'hémogramme (ou numération de la formule sanguine) est l'examen biologique le plus prescrit dans la Leucémie aigüe promyélocytaire. Il a pour but d'apporter des informations quantitatives (numération) sur les cellules sanguines mais également des informations qualitatives (formule) (**Figure 15**).

Sexe : Homme	Age : 49 ans
Globules rouges :	Globules blancs :
Nb : 2.800.000	Nb : 2.600
Hb : 7,5	Formule (%)
Ht : 24	PN : 39 PE : 1
VGM : 92	PB : 1
CGM : 29	Ly : 41
TGM : 31	Mo : 5
Réticulo : < 0,1 %	Autres cellules :
	Promyélo : 13
	Plaquettes : 35.000

Figure 15: Exemple d'hémogramme d'un patient atteint de la Leucémie aigüe promyélocytaire (**Cytologie, 2015**).

L'hémogramme consiste à:

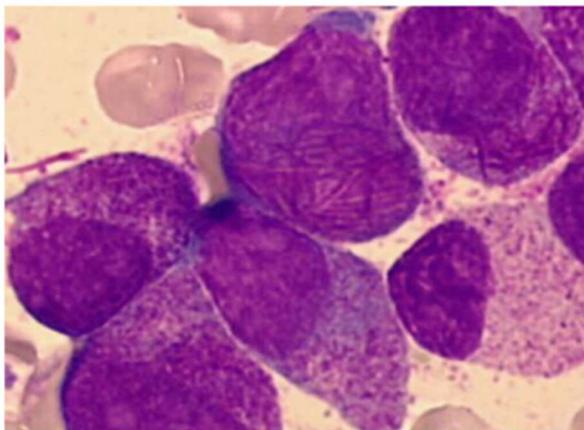
- 1- Faire la numération des cellules sanguines circulantes (hématies, leucocytes et plaquettes) dans 1 mm³ de sang.
- 2- Calculer les constantes hématimétriques (VGM, CCMH, TGMH).
- 3- Établir la formule leucocytaire (détermination de la proportion des différents types de leucocyte).
- 4- Étudier la morphologie (Véronique, 2009) (Quessar, 2014).

V.2 Myélogramme

C'est l'examen-clé du diagnostic et de la classification, il est effectué par ponction de moelle au niveau du sternum chez l'adulte ou de la crête iliaque chez l'enfant. Il montre une moelle envahie par plus de 20% de cellules myéloblastiques bloquées dans leur différenciation. Le myélogramme permet de réaliser une classification cytologique (morphologique) de la Leucémie aigüe promyélocytaire (**Hématologie et transfusion, p124**).

La classification morphologique de Leucémie aigüe promyélocytaire distingue deux sous types (**Figure16**): la forme classique hyper-granulaire (LAPc) et la forme la forme micro-granulaire (LAPv). La forme classique, fréquemment pancytopénique, se caractérise par des blastes hyper-granuleux contenant souvent des corps d'Auer en fagots. Dans la forme variante, habituellement hyper-leucocytaire, les blastes sont au contraire hypo-granuleux, rarement avec corps d'Auer, mais ont typiquement un noyau bilobé (figure). Les promyélocytes leucémiques présentent une réaction myéloperoxydasiqüe très forte dans les deux formes (**Hematol, 2001**).

Hyper-granulaire, avec corps d'Auer en fagots



Hypo-granulaire, avec noyaux bilobés

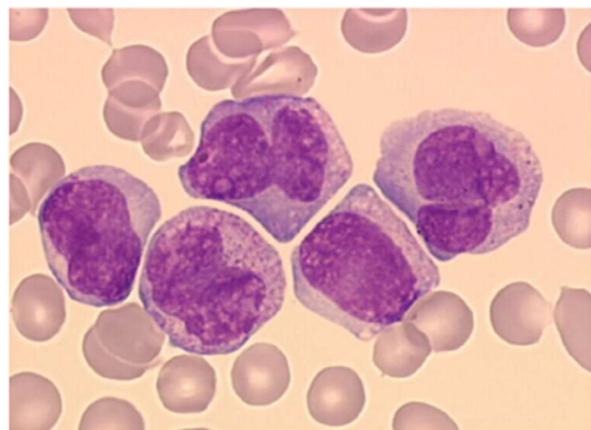


Figure16: Les deux types morphologiques de la Leucémie aigüe promyélocytaire (**Hematol, 2001**).

V.3 Immunophénotype par cytométrie en flux

L'immunophénotypage est la détermination d'antigènes cellulaires, qu'ils soient membranaires, intracytoplasmiques ou nucléaires (**Sebahoun, 1998**).

L'immunophénotypage utilisant des paramètres multiples de la cytométrie en flux est utilisé pour déterminer la lignée impliquée d'une leucémie aiguë nouvellement diagnostiquée. Il est nécessaire pour établir le diagnostic de la Leucémie aiguë promyélocytaire (*Leukemia, 1995*) (*Blood, 2008*).

Les promyélocytes leucémiques expriment de façon caractéristique les marqueurs myéloïdes CD13 et CD33, et sont classiquement négatifs pour le HLA-DR et le CD34 (**Tbleau IV**). L'expression, au niveau des promyélocytes leucémiques, des CD15 et CD65 – antigènes myéloïdes - est variable, tout comme celles du CD11b et du CD14 (marqueurs monocytaires). Le CD117 (c-kit), récepteur du stem cell factor, est le plus souvent exprimé par les blastes de LAP (*Leukemia, 1994*) (**Paietta, 2003**).

L'expression de CD2, marqueur associé à la lignée lymphoïde T, est retrouvée dans environ 25% de LAP (**Blood, 1992**).

Tableau IV : Principaux marqueurs exprimés dans la Leucémie aiguë promyélocytaire (**Kaleem, 2003**).

Marqueurs	Expression dans la LAP
MPO	+
CD2	+/-
CD4	-
CD7	-
CD11c	+/-
CD13	+
CD14	-
CD15	+/-
CD19	-
CD33	+
CD34	-
CD36	-
CD56	-
CD41	-
CD42a	-
CD61	-
CD64	+/-
CD65	+/-
CD71	+
CD117	+/-
Glyco-A	-

V.4 Examen cytogénétique

L'étude cytogénétique des leucémies aiguës vise plusieurs objectifs : diagnostique, pronostique, indication de traitement spécifique et évaluation de la maladie résiduelle.

Elle est faite en routine par deux examens : le caryotype et la FISH.

IV.4.1 Le caryotype

Dans la Leucémie aigüe promyélocytaire, il s'agit d'une Translocation réciproque avec échange de matériel entre deux chromosomes (15 ; 17) (Blood Rev, 2003).

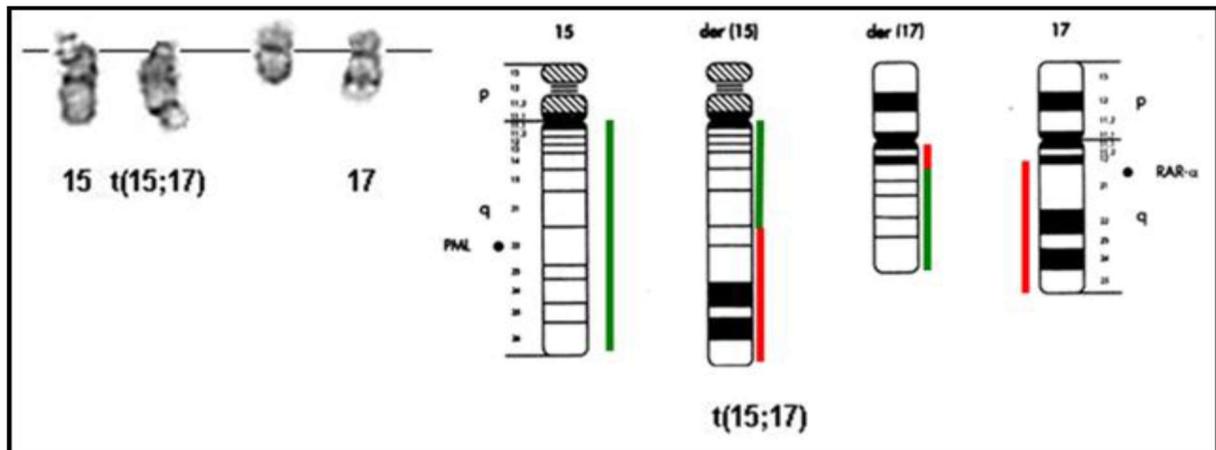


Figure 17: Représentation schématique de la translocation réciproque équilibrée entre les chromosomes 15 et 17 (Blood Rev, 2003).

Le caryotype permet d'obtenir une image, au microscope, des chromosomes d'une cellule (Figure 18). Cela permet donc de compter le nombre de chromosome et de préciser d'exécutuelles anomalies de nombre et de structure (Giuseppe, 2010).

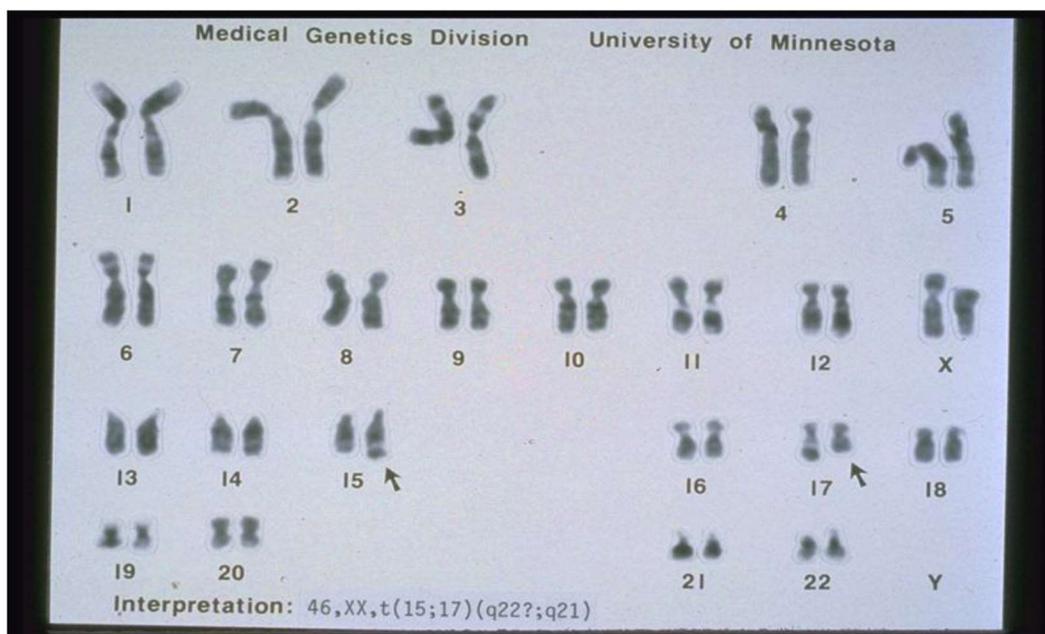


Figure 18: Caryotype d'un patient atteint de Leucémie aigüe promyélocytaire (Giuseppe, 2010).

Le caryotype montre la translocation $t(15;17)(q24;q21)$. Celle-ci est retrouvée dans plus de 95% des cas. Cette translocation aboutit à la juxtaposition du gène promyelocytic leukemia (*PML*) situé au niveau du bras long du chromosome 15, en 15q24.1, et du gène du récepteur α de l'acide rétinoïque (*RAR α*) localisé au niveau du bras long du chromosome 17, en 17q21.2. Ce gène de fusion, *PML-RAR α* , aboutit à l'expression de la protéine de fusion PML-RAR α (Giuseppe, 2010).

V.4.2 La FISH

En complément de la cytogénétique conventionnelle. La FISH est un examen cytogénétique ciblé plus sensible et plus précis réalisé à partir d'un échantillon de sang ou de moelle osseuse ; il permet de déceler si les deux gènes sont à leur position normale ou fusionnés sur le chromosome anormal, détecte le gène de fusion PML-RAR α , avec des sondes fluorescentes spécifiques des gènes *PML* situé au niveau du bras long du chromosome 15, en 15q24, et du gène du récepteur α de l'acide rétinoïque (*RAR α*) localisé au niveau du bras long du chromosome 17, en 17q21 (Figure 19).

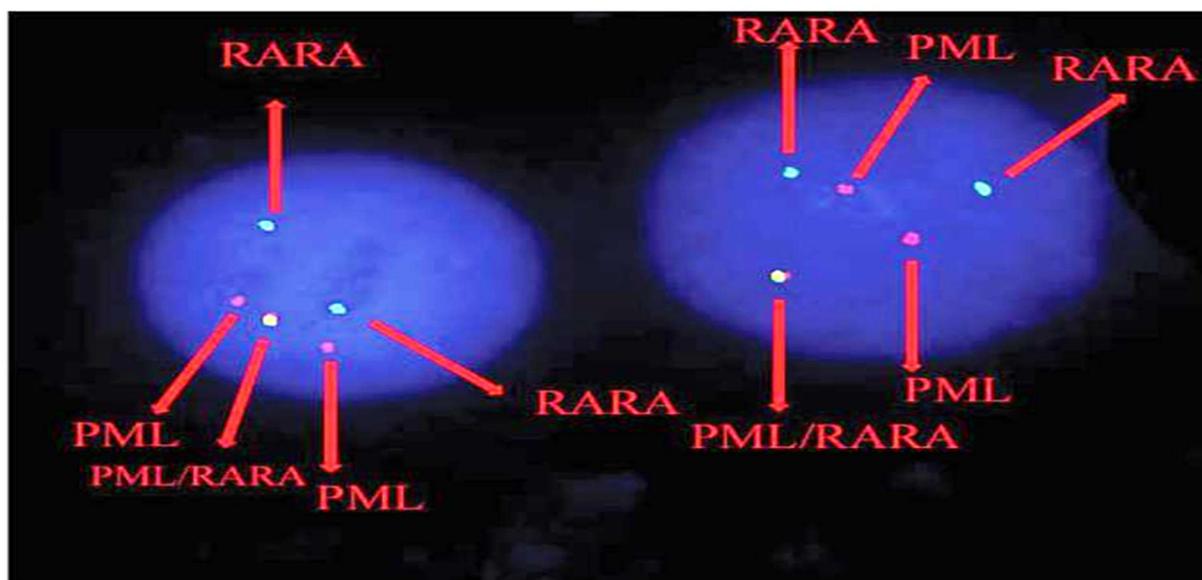


Figure 19: FISH, mise en évidence du signal de fusion PML-RAR α (sonde RAR α en vert, sonde PML en rouge, et fusion PML-RAR α en jaune) (Eclache, 2005).

La Fish est nécessaire pour le diagnostic et la surveillance de la maladie (Eclache, 2005).

V.5 Autre Examen biologique

La recherche d'une Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée (CIVD) est indispensable. Une CIVD est souvent présente dans les LA hyperleucocytaires et promyélocytaires. Elle augmente le risque hémorragique lié à la thrombopénie, en particulier lors de la mise en route de la chimiothérapie (Ferrant, 2004).

VI. Prise en charge de la leucémie aigüe promyélocytaire

❖ Traitement d'induction

Le but du traitement d'induction de la LPA est de traiter toutes les cellules leucémiques présentes dans le sang et la moelle osseuse et d'engendrer une rémission.

La chimiothérapie d'induction comporte au moins une anthracycline et de l'acide tout trans rétinoïque (ATRA). Cette combinaison guérit au moins 75 % des patients.

- On a recours à la trétinoïne (acide tout-trans rétinoïque, ATRA, Vesanoid) pour traiter la LPA. Ce médicament est administré, en deux prises (8 gélules), à la dose journalière totale de 45 mg/m² de surface corporelle. Le traitement doit être poursuivi pendant 30 à 90 jours jusqu'à obtention d'une rémission complète.
- L'arsenic (Trisenox™) :

Le Trisenox™ est un médicament actif par voie injectable. Contrairement à l'acide rétinoïque, qui déclenche la différenciation cellulaire, l'arsenic induit l'apoptose ou mort programmée naturelle des cellules.

❖ Traitement de consolidation

Le traitement de consolidation est aussi appelé traitement post-rémission. Le but du traitement de consolidation de la LPA est de traiter toutes les cellules leucémiques encore présentes dans le sang ou la moelle osseuse une fois la rémission atteinte. On y a recours pour maintenir une rémission complète et prévenir la récurrence.

Lors du traitement de consolidation de la LPA, on continue d'administrer de la trétinoïne ainsi que de l'idarubicine ou de la daunorubicine.

❖ Traitement d'entretien

Le but du traitement d'entretien de la LPA est d'empêcher les cellules leucémiques de réapparaître (récurrence).

Le traitement d'entretien comprend l'administration de trétinoïne pendant 1 à 2 ans. On peut l'administrer seule ou l'associer :

- au méthotrexate;
- à la mercaptopurine

❖ Traitement de soutien

Le traitement de soutien est important lors de chaque phase du traitement de la LPA. On y a recours pour contrôler les complications qui surviennent habituellement à cause des traitements de la LPA et de la maladie même.

Les traitements de soutien administrés pour une LPA récidivante ou réfractaire peuvent comprendre :

- des antibiotiques et des antifongiques pour traiter les infections;
- des facteurs de croissance pour aider la moelle osseuse à se rétablir de la chimiothérapie (la chimiothérapie risque d'affecter la moelle osseuse en l'empêchant de produire suffisamment de cellules sanguines saines, ce qui peut accroître le risque d'infection);
- des transfusions de globules rouges, de plaquettes, de plasma frais congelé et de cryoprécipité (produit qui remplace les facteurs de coagulation) au besoin **(Degos, 2001) (Pierre Bobé, 2008) (Eljahidi, 2014)**.

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

Introducadre de l'étude

L'objectif de notre étude est de réaliser différentes techniques cytogénétiques ; caryotype et Hybridation in situ fluorescente (FISH) chez des patients atteints de leucémie aiguë promyélocytaire évoquées cytologiquement, pour le diagnostic de certitude de la forme classique ou variante cytogénétique.

I. Etude rétrospective sur 33 cas

Notre étude pratique a été réalisée au niveau du service cytogénétique hématologique, du laboratoire hématologie (CAC) Blida sur une période de 4 mois du Février au Juin 2018.

Cette étude a porté sur 33 patients atteints de leucémie aiguë promyélocytaire, recrutées de janvier 2016 à Juin 2018 au service d'hématologie du Centre Anti Cancer (CAC).

Tableau V : caractéristique de la population étudiée.

N	33	100%
Homme	16	48,5%
Femme	17	51,5%
Sex-ratio (H/F)	0,94	
Age moyen	44,21	

Une fiche de renseignement a été remplie pour chaque patient par le médecin traitant incluant des informations sur Nom-Prénom, son âge, le sexe, la date de prélèvement, les différentes manifestations cliniques et biologiques notamment le frottées sanguins et le medullogramme évoquant soit LAM3 classique ou une variante cytologique.

II. Matériels (Annexe)

III. Méthodes

III.1 Prélèvement (ponction de moelle)

La ponction de moelle consiste à introduire un trocart dans la moelle osseuse (sternum ou plus rarement au niveau de la crête iliaque, antérieur ou postérieur) afin d'aspirer des cellules médullaires.

Le patient est couché sur le dos. On nettoie la peau qui entoure la région de ponction par une solution antiseptique (Bétadine). Ensuite on introduit le trocart avec des mouvements circulaire (jusqu'à effraction de la tablette osseuse externe), après fixation de la seringue sèche, on aspire une goutte du ponction du suc médullaire qui est étalé sur des lames en verre cytologie pour le

frottis qui sont ensuite colorer puis examiner sous microscope optique. Le deuxième prélèvement se fait avec une seringue héparinée, est transféré dans un tube conique, et sera acheminé au laboratoire d'hématologie pour des examens cytogénétiques.

Le point de ponction est nettoyée avec la bétadine ensuite on pose un pansement sur la région et on applique une pression pendant quelques minutes.



Figure 20: Ponction de la moelle osseuse

III.2 Mise en culture cellulaire

Les cellules médullaires sont mis en culture. L'opération se fait obligatoirement en milieu stériles (sous hotte à flux laminaire).

Après avoir effectué un prélèvement de la moelle osseuse, on procède à la numération sur l'automate d'hématologie (FNS) pour le comptage de cellules nucléées, On doit mettre le flasque de culture (2 millions de cellules par 1 ml de milieu de culture), soit 20 million dans de 10 ml RPMI complet, pour chaque flasque éditer le nom et prénom du patient, son numéro de dossier, la date du jour, la technique: 24 h synchro, possible 48 h.

Les flasques sont disposés horizontalement dans une étuve à CO₂ à 37°C, bouchon dévisse ¼ de tour pour permettre au CO₂ d'y pénétrer, à plat sur un plateau en inox désinfecté.

Remarque

Le temps de culture et le choix du type de culture.

Le type de culture de LAP  24h avec synchronisation.

III.3 Sortie de culture

III.3.1 Blocage des cellules en métaphase

L'étape suivante consiste à bloquer les cellules en métaphase afin de pouvoir observer les chromosomes. Pour cela, on utilise la colchicine (colcemid) après 16h de culture, pour chaque flasque : Mettre pour les cultures 24h : 60ul de colchicine pendant 30 min.

La colchicine est un inhibiteur qui empêche la progression de la mitose vers l'anaphase en bloquant la polymérisation des microtubules.

Après avoir bien mélangé le contenu des flasques, ces derniers sont remis dans l'étuve à CO₂ pendant 20 à 30 minutes.

III.3.2 Dispersion des chromosomes par choc thermique

Réalisé avec le KCL. Cette étape, indispensable pour avoir un étalement correct, entraîne le gonflement des cellules par différence de pression osmotique. Les membranes cytoplasmique et nucléaire sont fragilisées ce qui permet l'éclatement des cellules et l'obtention d'une bonne dispersion des chromosomes.

- Sortir les flasques de l'étuve à CO₂, transvaser chacune d'elles dans des tubes coniques de 15 ml, les identifier par le nom, le temps de culture (24 heures) ainsi que la date de mise en culture. Puis centrifuger à température ambiante 8mn à 1300 tours.
- Après centrifugation on obtient un culot et un surnageant coloré, on élimine le maximum de surnageant à l'aide d'une pipette pasteur ou un type d'aspiration relié à une pompe à vide, on remet le culot en suspension et on ajoute le KCL préchauffé goutte à goutte (0,75 ml) et homogénéiser doucement le culot cellulaire puis compléter progressivement par du KCL jusqu'à 12 ml avec la pipette pasteur et procéder à des aspirations refoulement de ce mélange sur la paroi interne du tube conique plusieurs fois (mélange homogène).
- Le choc doit être à la fois mécanique. On remet les tubes sans bouchons dans l'étuve à 37°C pendant 25 minutes. Pendant ce temps, on prépare la solution de fixation (carnoy) : 3Volumes de méthanol + 1Volume d'acide acétique, en quantité suffisante pour deux ou trois fixations.

III.3.3 Fixation

Cette étape a pour but de fixer les mitoses obtenues. On utilise le fixateur pour déshydrater les cellules et de dénaturer les protéines qui fragilisent la membrane cytoplasmique.

❖ Préfixation

Sortir les tubes coniques de l'étuve à 37°C, ajouter sur cette suspension cellulaire quelques gouttes de solution de fixation et procéder à une homogénéisation douce et progressive (les cellules sont très fragiles à cette étape).

Centrifuger les tubes à 1300 tours pendant 8 min.

❖ Première Fixation

On enlève le surnageant (1/3 culot, 2/3 surnageant), puis on rajoute 1cc de fixateur et homogénéiser doucement,

On complète jusqu'à 8 ml avec le fixateur et homogénéiser doucement

Centrifuger à 1300 tours pendant 8 min.

❖ Deuxième fixation

Les fixations sont répétées jusqu'à ce que le culot cellulaire soit propre c'est-à-dire pour avoir un culot cellulaire clair (3 fixations maximum).

Une fois obtenu, le culot est gardé à 4°C, bouchons bien fermés pour éviter l'évaporation du fixateur (maximum 6mois).

III.3.4 Etalements des culots cellulaires

L'étalement est la réalisation de préparations chromosomiques sur des lames à partir de culots cellulaires fixés, soit pour FISH ou caryotype.

L'étalement a une très grande importance pour la qualité des mitoses et des bandes chromosomiques.

Pour un bon étalement il faut respecter les conditions de température (23°C -25°C) et un taux d'humidité de 30 à 40% pour avoir des mitoses bien éclatées et des noyaux bien séparés.

L'étalement se fait à partir du lendemain de la sortie de culture sauf urgence.

Procédure de l'étalement :

- A la dernière fixation, retirer le surnageant en laissant une partie suffisante pour remettre le culot en suspension (la quantité de carnoy sera plus ou moins importante suivant l'épaisseur du culot).
- Homogénéiser à la pipette pasteur en aspirant doucement et légèrement pour que les cellules ne remontent pas trop dans la pipette (risque de perte cellulaire).
- On identifie les lames avec le nom, prénom et date de culture et la technique, avant de déposer une ou deux gouttes pour la FISH, et deux gouttes séparées pour le caryotype, sur des lames humidifiées au préalable pour ce dernier seulement. On surveille l'étalement par le phénomène d'irisation de la goutte qui diffuse sur la lame, puis on dépose la lame sur un papier sec et on laisse sécher à température ambiante.

Remarque 1

Pour chaque prélèvement on a lancé 2 flasques de culture et pour chaque culture traitée avec succès on aura 6 lames au maximum; c'est juste une question de sécurité. Si l'une échoue, l'autre peut toujours servir. Pour les échantillons dans lesquelles les mitoses ne sont pas bonnes, on fait un maximum de lames pour élargir le champ de recherche et augmenter la probabilité de trouver de bonnes mitoses.

Remarque 2

La culture cellulaire se fait de la même façon pour les deux examens cytogénétique conventionnelle (caryotype) et moléculaire (FISH).

III.4 Le protocole de cytogénétique conventionnelle caryotype (Bandes R)

Technique de marquage permettant de mettre en évidence des structures appelées bandes, sur les chromosomes.

La technique des bandes R: correspond à un marquage de l'euchromatine (segments non variable), ainsi les chromosomes présentent une alternance de bandes sombres et claires.

Le caryotype en bande R (Reverses) consiste à faire un traitement thermique à 87 °c en milieu salin suivie d'une coloration au Giemsa.

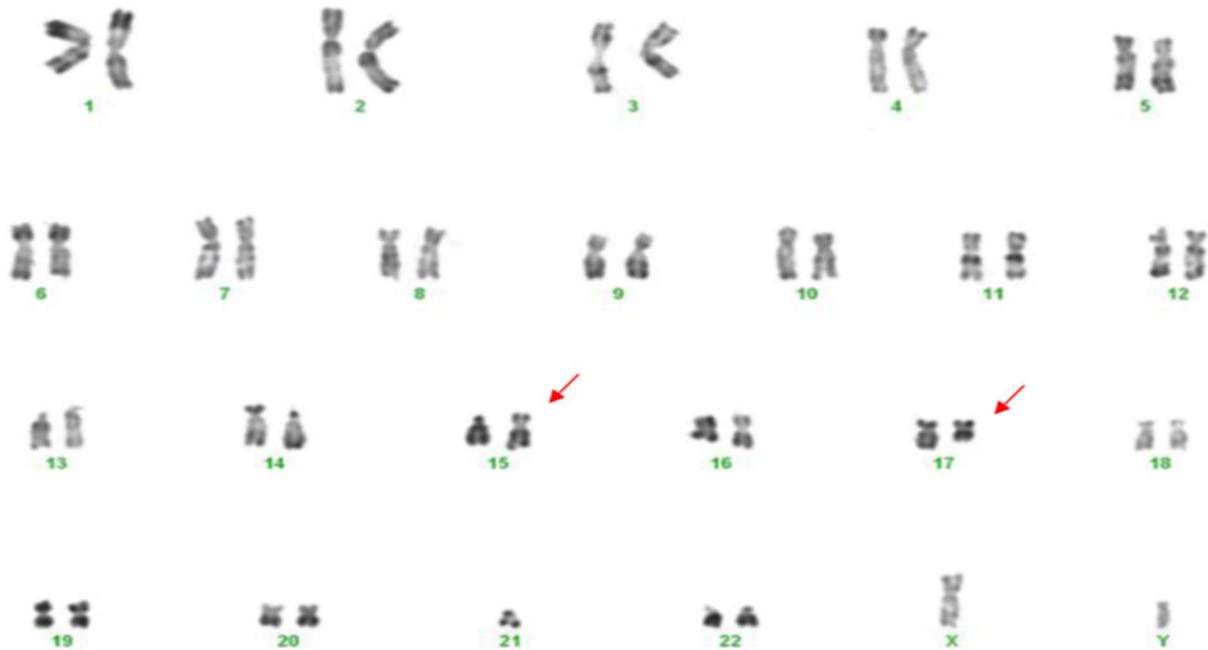


Figure 21: Exemple de caryotype bande R chez un sujet atteint de LAP (**Laboratoire Hématologie CAC Blida**).

Le caryotype se fait en plusieurs étapes:

- ❖ **Réhydratation** : Après l'étalement de la culture cellulaire sur lame, on laisse sécher 45min avant de réhydrater à l'eau distillé dans un bac à température ambiante pendant 5min.
- ❖ **Dénaturation**: La dénaturation se fait dans un bac préchauffer à 87°C, dans un tampon phosphate NH_2PO_4 pendant 12min en moyenne (peut varier en fonction du climat).
- ❖ **Arrêter le processus de dénaturation** : Par refroidissement en mettant les lames dans un bac d'eau distillé à 18°C pendant 2 min.
- ❖ **Coloration** : On procède à la préparation de colorant dans un bac avec 4cc de Giemsa, 4 cc de tampon de coloration (Na_2HPO_4 , 12 H_2O), complété avec de l'eau distillée jusqu'à 100ml , on met les lames dans le bac de colorant pendant 5 min, elles sont ensuite rincées avec de l'eau du robinet et séchées à température ambiante.
- ❖ **Observation** : L'observation des lames de chaque patient se fait au microscope à lumière blanche couplé à un logiciel de traitement d'image et d'archivage de dossier (**figure 22**).

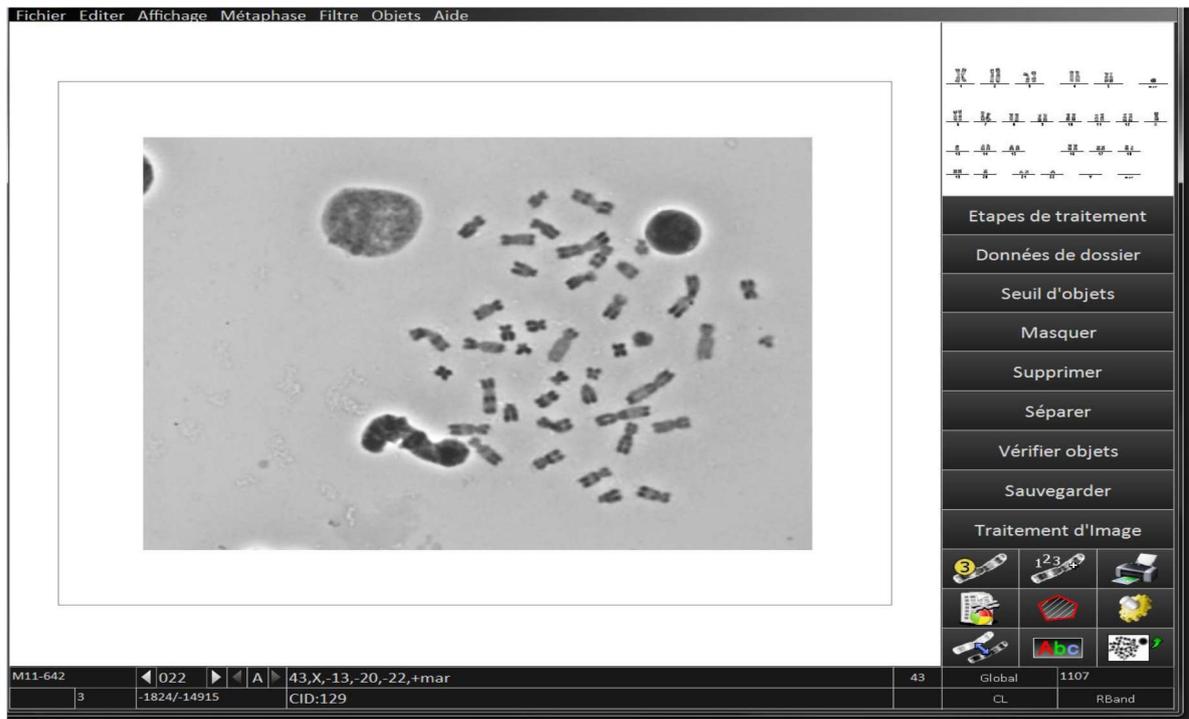


Figure 22: Observation au faible grossissement (20) pour apprécier la qualité de l'étalement, la mitose en nombre, la qualité de coloration (**Laboratoire Hématologie CAC Blida**).

Après avoir séché les lames, on leur rajoute de l'huile d'immersion avant la lecture sous microscope. Il est nécessaire d'analyser (comptage et identification des chromosomes) au moins 20 mitoses. Ainsi les chromosomes sont classés en fonction de leur taille décroissante et leur indice centromérique et les bandes.

III.5 Protocole de la cytogénétique moléculaire FISH

La technique FISH (Fluorescent In Situ Hybridation) est une technique qui permet de révéler par fluorescence grâce à des sondes d'ADN des séquences complémentaires sur les chromosomes étudiés.

La FISH repose sur la propriété d'hybridation, après dénaturation, d'une sonde nucléotidique de synthèse, le plus souvent préalablement marquée chimiquement de façon à pouvoir être repérée par la suite, sur une séquence spécifique d'ADN génomique à étudier, cela aussi bien sur plaque métaphasique que sur noyau interphasique. Grâce aux multiples possibilités de marquage et de détection, la FISH permet d'hybrider et de révéler simultanément plusieurs sondes moléculaires. Les sondes sont marquées soit avec une molécule fluorescente, soit avec une haptène (molécule qui peut être reconnue par un anticorps). Dans le premier cas, la sonde est directement visible au microscope à fluorescence, tandis que dans le second, une étape supplémentaire de révélation avec un anticorps fluorescent est nécessaire.

Le protocole de FISH que nous avons utilisé pour cette étude est celui pratiqué en routine au laboratoire de cytogénétique du CAC de l'hôpital Frantz fanon BLIDA, conforme au protocole Cytocell aquarius company.

La technique se fait dans une chambre noire (technique et lecture).

Protocole (après étalement des lames) :

❖ Préparation

1) Préparation des échantillons

Le kit a été développé pour utilisation sur les cellules du sang périphérique ou de la moelle osseuse cultivées et fixées avec du fixateur Carnoy et doivent être préparées selon les protocoles en vigueur dans le laboratoire.

Préparer les lames de microscope avec les échantillons séchés à l'air selon les procédures standard de cytogénétique (culture cellulaire).

2) Préparation des solutions

Avant de démarrer toute technique, il faut préparer les solutions utilisées:

- Ethanol 70%, 85%, 100 %.
- Solution de Buffer (2scc).
- Solution IGEP0,1%.
- Solution IGEP0,3%.
- Solution Tween20%.

❖ Prétraitement des lames

- Les lames sont immergées dans du 2scc pendant 2 minutes à température ambiante sans agitation.
- Déshydrater les lames dans des bains d'éthanol successifs (70%, 85%, 100 %), 2 minutes dans chaque bain à température ambiante.

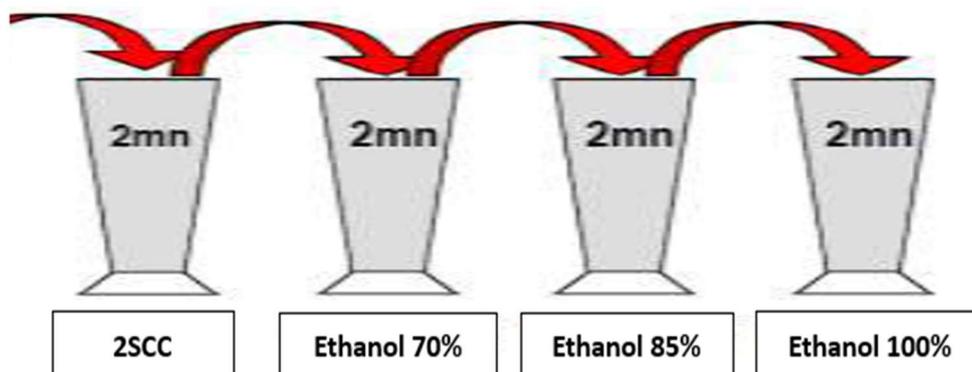


Figure23 : Prétraitement des lames.

- Les lames sont ensuite séchées.

❖ Application des sondes (à l'abri de la lumière)

- Retirer la sonde du congélateur -20°C et la préchauffer à TA.
- Bien homogénéiser la sonde en pipetant plusieurs fois.
- Prélever $10\mu\text{l}$ de la sonde par test et placer dans un tube eppendorf puis remettre la sonde à -20°C .
- Mettre la sonde et la lame échantillon à préchauffer sur une plaque chauffante à 37°C pendant 5 minutes.

Déposer $10\mu\text{L}$ de sonde sur l'échantillon et couvrir avec une lamelle puis sceller avec du rubber cement ou fixo-gum et laisser sécher (**figure24**).

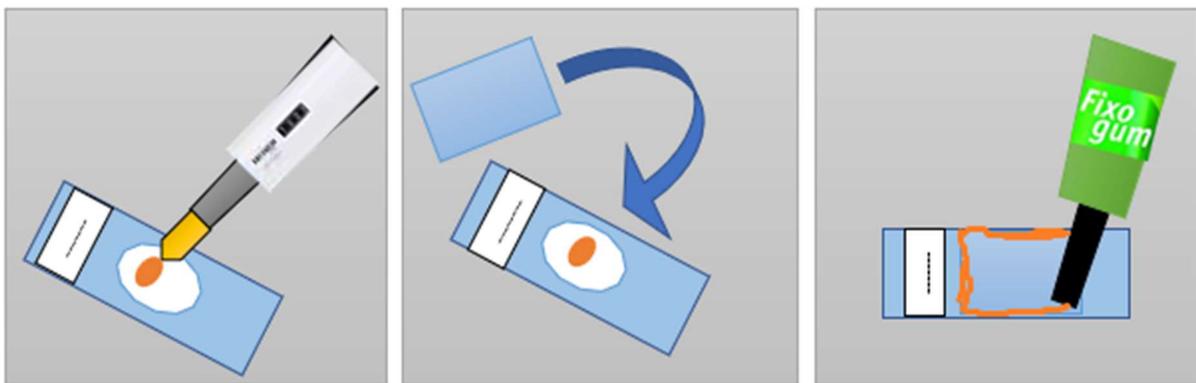


Figure 24: Schéma explicatif du dépôt de sondes et la fixation de la lamelle avec rubber cement ou fixo-gum et laisser sécher.

- Laisser les lames sécher à température ambiante.

❖ Dénaturation et hybridation

La lame est placée dans le ThermoBrite et incubée à 37°C pendant environ 5 minutes avant de lancer le programme de dénaturation/hybridation (**Figure25**):

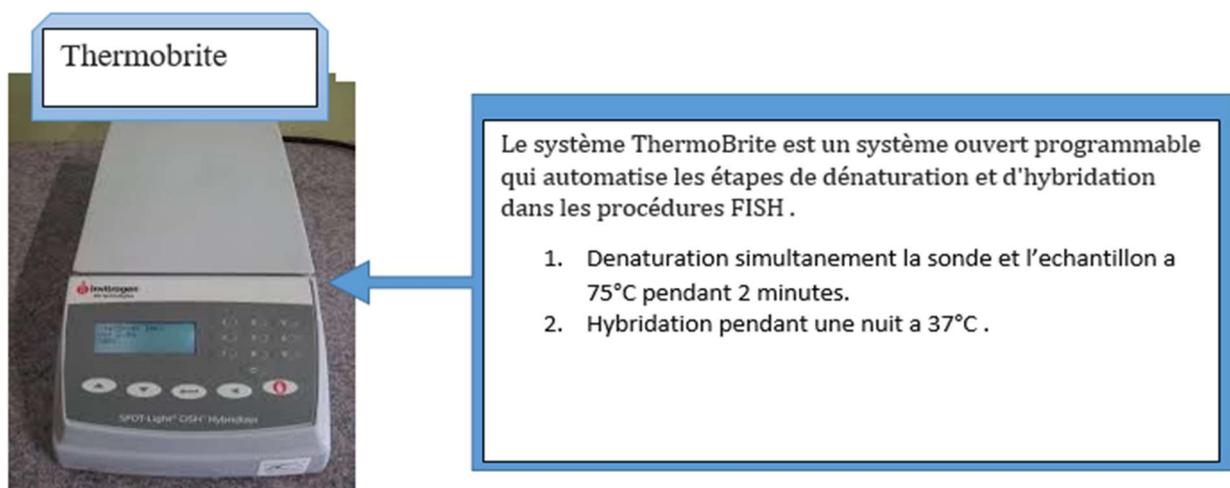


Figure 25: le ThermoBrite (Laboratoire Hématologie CAC Blida).

❖ Lavages (à l'abri de la lumière)

Afin d'éliminer les hybrides non spécifiques, les molécules de sondes non hybridées, les lamelles et les traces de rubber ciment ou fixo-gum.

- La lame est placée dans la solution de lavage 2SSC/0,1% Igépal à t° ambiante pour faciliter le décollement de la lamelle (quelques secondes).
- Les lamelles sont ensuite retirées délicatement.
- Les lames sont transférées dans la solution 0,4SSC/0,3% Igépal à 73°C. Sans agitation, le chronomètre réglé à 2 minutes est lancé.
- Les lames sont retirées de la solution à 73°C et transférer dans la solution Tween pendant 30 seconde.
- Les lames sont retirées de la solution Tween et transférer dans des bains d'éthanol successifs (70%, 85%, 100 %), 1min dans chaque bain à température ambiante.
- Laisser les lames sécher à température à l'abri de la lumière.

❖ Contre coloration DAPI

Une fois les lames séchées, 10ul de DAPI est déposé sur la lame au niveau de la préparation cellulaire pour être ensuite recouvert d'une lamelle, déposée de façon incliné afin d'éviter les bulles d'air. Les lames ainsi préparées sont conservées à 4°C jusqu'à la lecture au microscope à épifluorescence.

❖ La lecture au microscope à fluorescence

La lecture se fait avec un microscope à fluorescence muni de filtres adaptés aux fluorochromes des sondes utilisées.

Un fluorochrome est caractérisé par son spectre d'excitation et son spectre d'émission. La lecture s'effectue d'une part grâce à un rayonnement sélectionné par un filtre d'excitation spécifique du fluorochrome et d'autre part grâce au filtre d'émission spécifique du fluorochrome qui va permettre de visualiser la fluorescence émise. Pour chaque zone de lecture, nous observons entre 20 mitoses et 200 nouaux. **(Figure 26).**

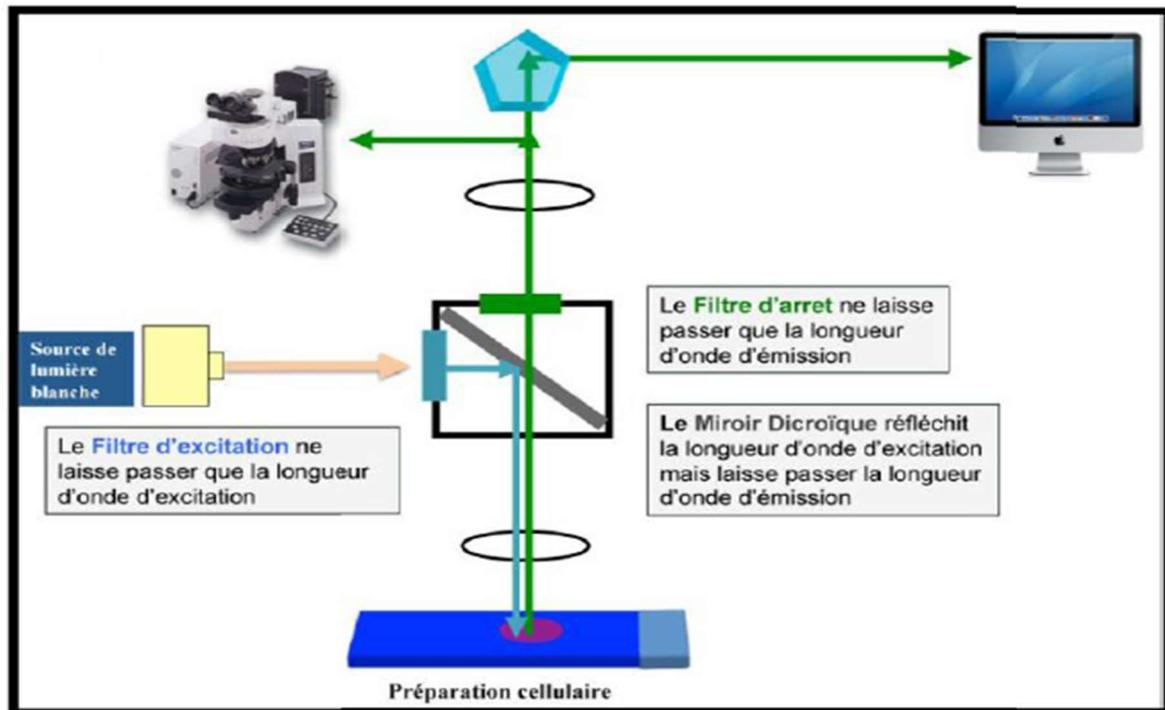


Figure 26: La microscopie en fluorescence (Romana et al, 2001).

Remarques

- Les lames FISH sont analysables pendant plusieurs mois voire des années si elles sont conservées à l'obscurité et au-dessous de la température ambiante à (4°C).
- Vieillir les lames n'est pas recommandé, ceci pouvant réduire l'intensité du signal.
- L'utilisation d'un thermomètre calibré est fortement recommandée pour mesurer les températures des solutions, bain-marie et incubateurs. Ces températures sont essentielles pour une efficacité optimale du produit.
- Les concentrations des lavages, pH et température sont importants (une forte concentration peut résulter en une perte de signal).
- Une dénaturation incomplète peut engendrer une perte de signal et une trop forte dénaturation : une hybridation non-spécifique.

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

Conclusion

La leucémie aiguë promyélocytaire (LAP) est un sous-type des leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) dénommé variant M3, ce sont des leucémies rares 8 à 10 des LAM. Elles sont caractérisées par une translocation réciproque entre les chromosomes (15 et 17) cette anomalie chromosomique est responsable de la fusion du gène PML (leucémie promyélocytaire) avec le gène RARA récepteur de l'acide rétinoïque tronqué conduisant à la synthèse d'un récepteur de l'acide rétinoïque anormal (protéine PML/RARA) qui bloque la différenciation des promyélocytes .

Pour notre étude, nous avons choisi 6 patients qui avaient un culot clair afin d'appliquer les différents tests cytogénétiques (caryotype et Fish) pour un diagnostic complet.

Avec le caryotype, nous avons identifié chez les six patients une translocation $t(15;17)(q21;q12-21)$. Pour la technique de FISH on a utilisé une sonde PMLRARA qui a montré la présence du gène PMLRARA par un jaune.

La FISH a permis d'identifier les variantes cytogénétiques qui impliquent RARA avec d'autres partenaires.

La leucémie aiguë promyélocytaire a un traitement spécifique physiopathologique qui est l'acide tout-trans-rétinoïque « ATRA » qui permet la différenciation des promyélocytes. La combinaison avec l'arsenic plus la chimiothérapie permet la guérison de 90% des cas.

Pour le futur la thérapie génique est un espoir pour une guérison complète telle que CRISPER qui peut couper l'ADN et un gène complet et passer un gène normal semble plutôt très prometteur.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Achouria Bouriach ,2012. La cytogénétique et classification des hémopathies malignes.
- Abdelali. Med ,2015. Génétique humaine, Publication Universitaires 1, Place centrale-Ben-Aknoun - Alger p47-59-62-64-65-73-74-75-76.
- AlcalayM, Zangrili D, Fagioli M, Pandolfi P P , Mencarelli A, Lo Coco F, Biondi A, Grignani F, Pehcci P . Expression pattern of the RAR α -PML fusion gene in acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4840-4.
- Amparo VERDEGUER (2003). Leucémies aiguës promyélocyaires : Le portail des maladies rares et des médicaments orphelins, ORPHA:520.
- Avvisati G et al, Acute promyelocytic leukemia: clinical and morphologic features and prognostic factors. *Semin Hematol.* 2001.38:9.4-12.
- Bell. B, 2010. Hématologie.
- Benakli .M, 2009. leucémies aiguës myéloïdes, revue algérienne d'hématologie ,42 pages.
- Bene MC, Castoldi G, Knapp W, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia.* 1995;9(10):1783-1786.
- Bernard J et al, [Acute promyelocytic leukemia: a study made on 20 cases]. *Schweiz Med Wochenschr.* 1959. 89:604-8.
- Biondi A et al., RAR-alpha gene rearrangements as a genetic marker for diagnosis and monitoring in acute promyelocytic leukemia. *Blood.* 1991.77(7):1418-22.
- Briard ML, Moichon-delvallez N. Anomalies chromosomiques. EMC (Elsevier SAS, Paris), Pédiatrie 2006 ; 002-T-30.
- Burke, V. P., and Startzell, J. M. (2008). The leukemias. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 20, 597-608.
- Cancer cytogenetic 2005. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and tology.
- Catherine Lavau, Joopjansen, Karsten Weis, Angus Lamond, Anne Dejean. (2014). Leucémie aiguë promyélocytaire et acide rétinoïque : le paradoxe. *médecine/sciences* 1 994 ; JO : 81 7-24.
- Cédric Le Caignec, Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale. « Caryotype humain : Technique –Indications » Support de Cours 2010-2011.
- Chen, S.-J., Zhou, G.-B., Zhang, X.-W., Mao, J.-H., Thé, H. de, and Chen, Z. (2011). From an old remedy to a magic bullet: molecular mechanisms underlying the therapeutic effects of arsenic in fighting leukemia. *Blood* 117, 6425–6437.
- Claude P. ,2002 Biologie moléculaire et leucémies aiguës *Revue Française des Laboratoires*, N° 344.
- Claxton, D.F., et al. Correlation of CD2 expression with PML gene breakpoints in patients with acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 1992. 80(3): p. 582-6.
- Collins, S.J. The role of retinoids and retinoic acid receptor in normal hematopoiesis. *Leukemia*, 2002. 16(10): p.1896-905.
- Cordonnier C et al, Acute promyelocytic leukemia in 57 previously untreated patients. *Cancer.* 1985. 55(1):18-25.

- Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*. 2008;111(8):3941-3967.
- Cytocell an OGT company Aquarius. (2014). FAST PML/RAR α translocation, Dual Fusion Probe. Instructions For Use REF: LPH 064-S/ LPH 064/ LPH 064-20.
- Cytologie-sanguine, 2015. Lignée granuleuse : leucémies aiguës myéloïdes - partie 1.
- D'après Prof Akeem-Durham, 2014 (<https://www.slideserve.com/akeem-durham/cellules-souches-leucemiques>).
- Degos, L. and Wang Z.Y., All trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*. 2001. 20(49):p.7140-5.
- De Thé H, Lavau C, Marchio A, Chomienne C, Degos L, Dejean A. The PML-RAR α Fusion mRNA generated by the t(15; 17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* 1991; 66:675-84.
- De Thé H et al., The PML-RAR α fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell*. 1991. 66(4): 675-84.
- De Thé H et al., The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus. *Nature*. 1990. 347(6293):558-61.
- Dick J.E; 2008 .Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*, 112(13): 4793-807.
- Di Croce, L., et al. Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science*, 2002. 295(5557): p. 1079-82.
- DOCPLAYER, 2015. Cours Biologie Cellulaires : Chapitre 2 - L'ÉTUDE DU NOYAU.
- Douer D. The epidemiology of acute promyelocytic leukemia. *Best Pract Clin Haematol*, 2003. 16 (3):p.357-67.
- Dupont JM. « Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology » June 2008.
- Eclache V, Viguie F, Frocraïn C, Cassinat B, Chomienne C, Cymbalista F, Fenaux P. A new variant t(15;17)(q24;q21) in acute promyelocytic leukemia : Fluorescence in situ hybridization confirmation. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005 ; 159 :69-73.
- Ferrant A, 2004. Hématologie tome 1, Faculté de Médecine Unité d'Hématologie.
- François Lefrère, Jean-Paul Lévy, Bruno Varet, Jean-Pierre Clauvel, Annie Bezeaud, Marie-Claude Guillin. Hématologie et transfusion. 6^{ème} édition page 124.
- Giuseppe Avvisati. (2010). Le Diagnostic, Le Suivi et Le Traitement de la Leucémie Aiguë Promyélocytaire. Université "Campus Bio-Medico" Rome, Italie.
- Goddard AD, Borrow J, Freemont PS, Solomon E. Characterization of a zinc finger gene disrupted by the t(15; 17) in acute promyelocytic leukemia. *Science* 1991; 254. 1371-4.
- Gordon J. Piller, A, Great W. Historical Review LEUKAEMIA ± A BRIEF HISTORICAL REVIEW FROM ANCIENT TIMES TO 1950 *British Journal of Haematology*, 2001, 112, 282-292.
- Green S. Promiscuous liaisons. *Nature* 1993 ; 361 : 590-1.
- Guglielmi, C., et al., Immunophenotype of adult and childhood acute promyelocytic leukaemia: correlation with morphology, type of PML gene breakpoint

- and clinical outcome. A cooperative Italian study on 196 cases. *Br J Haematol*, 1998.102(4): p. 1035-41.
- Hillestad L.K, Acute *promyelocytic leukemia*. *Acta Med Scand*. 1957 Nov 29;159(3):189-94.
 - Jérôme A, 2008.cancérologie Hématologie. 224 pages.
 - John Libbey (2014).Leucémies aiguës promyélocyaires : les défis qui demeurent Volume 20, numéro 2.
 - Julie Dumont. (2014). Le caryotype et les anomalies chromosomiques constitutionnelles.Laboratoire de Biologie Cellulaire Inserm UMR 1167 –Institut Pasteur de Lille.
 - Kakizuka A et al., Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor,PML. *Cell*. 1991. 66(4):663-74.
 - Kaleem Z, Crawford E, Pathan MH, Jasper L, Covinsky MA, Johnson LR, et al.Flowcytometric analysis of acute leukemias. Diagnostic utility and critical analysis of data. *Arch Pathol Lab Med*. 2003 Jan; 127(1):42–8.
 - Kastner P, Perez A, Lutz Y, RochetteEgly C, Gaub MP, Durand B, Lanotte M , Berger R, Chambon P. Structure, localization and transcriptional properties of two classes of retinoic acid receptor fusion proteins in acute promyelocytic leukemia (APL) : structural similarities with a new family of oncoproteins. *EMBO J* 1992 ; 11 : 629-42.
 - Lacombe. C, 2006. Les cellules souches hématopoïétiques humaines normales: régulation et méthodes d'exploitation D1 – Hématologie.
 - L'Association des Cytogénéticiens de Langue Française, Le Groupe Français de Cytogénétique Hématologique, Le Groupe Français de Cytogénétique Oncologique, 2013. Guide de bonnes pratiques en cytogénétique.
 - Leid M, Kastner P, Chambon P. Multiplicity generated diversity in the retinoic acid signalling- pathways. *Trends BiolSci* 1992; 17: 427-33.
 - Lopis. L, 2009. Molecular biology and prognostic value in acute myeloid leukemia. *Hématologie*, 15(6): 426-43.
 - Löwenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*.1999; 341:1051–62. - 93 – 30.
 - Mader S, Chen JY, Chen Z, White J, Chambon P, Gronemeyer H. The patterns of binding of RAR, RXR and TR homo and heterodimers to direct repeats are dictated by the binding specificities of the DNA binding domains. *EMBO J* 1993 ; 12 : 5029-41.
 - Masterpod.univ-rennes La leucémogénèse IMMUNO-HEMATO FONDAMENTALE etPATHOLOGIQUE. Octobre 2008.
 - Michel Arock, Gilbert Chemla, Jean-Paul Chemla, 2008. Autoformation et aide au diagnostic en hématologie avec Logiciel ADH.141-153.
 - Mistry, A.R., et al. The molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia: implications for the clinical management of the disease. *Blood Rev*, 2003. 17(2): p.71-97.
 - M. Maynadié, A. Collignon, M. Mounier, S. Le Guyader-Peyrou, A. Monnereau, X. Troussard. (2012). Leucémie aiguë myéloïde promyélocytaire. Estimation nationale de l'incidence des cancers en France entre 1980 et 2012. Partie 2 – Hémopathies malignes / p. 64-65.

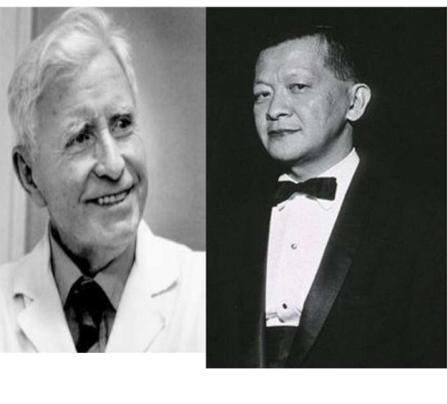
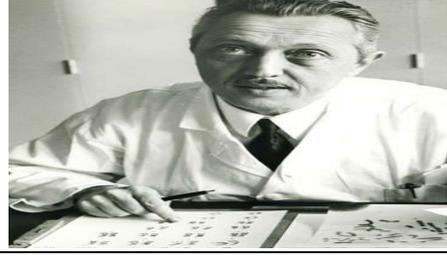
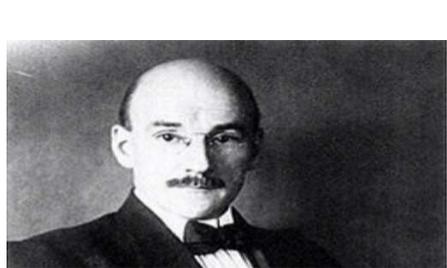
- Mohamed ELJAHIDI. (2014). Evaluation du protocole AML de prise en charge des Leucémies Aigues Myéloblastiques de l'adulte. Thèse de Doctorat, UNIVERSITE CADI AYYAD FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE MARRAKECH-Maroc.
- Mylène BERTI-DEXHEIMER. (2005). Hybridation génomique comparative en microréseau : évolution techniques et place dans la stratégie diagnostique Expérience dans le cadre du retard mental. Thèse de Doctorat, Université Henri Poincaré - Nancy 1.
- NAYAZIC HALIM. (2015). Cytogénétique des hémopathies malignes. Projet de fin d'étude Licence en Sciences Biologiques appliquées et Santé. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah Faculté Des Sciences et Techniques – FES au Maroc.
- Paietta E et al, The immunophenotype of acute promyelocytic leukemia (APL): an ECOG study. *Leukemia*. 1994. 8(7):1108-12.
- Paietta E, Expression of cell-surface antigens in acute promyelocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2003. 16(3):369-85.
- Pandolfi, P.P et al., Genomic variability and alternative splicing generate multiple PML/RAR alpha transcripts that encode aberrant PML proteins and PML/RAR alpha isoforms in acute promyelocytic leukaemia. *Embo J*. 1992. 11(4):1397-407.
- Pandolfi PP, Grignani F, Alcalay M, Mencarelli A, Biondi A, Lo Coco F, Grignani F, Pelicci PC. Structure and origin of the acute promyelocytic leukemia myl/RAR α . cDNA and characterization of its retinoid-binding and transactivation properties. *Oncogene* 1991; 6: 1285-92.
- P.C. Turner, A.G. Mclellan, A.D. Bates et M.R.H White. (2002). L'Essentiel en Biologie Moléculaire. BERTI EDITIONS. Ecole de sciences biologiques University of Liverpool, Liverpool, UK p 95.
- Pierre Bobé, Mounira K. Chelbi-Alix. (2008). De nouvelles perspectives thérapeutiques pour l'arsenic De la leucémie aiguë promyélocytaire aux maladies auto-immunes. *MEDECINE/SCIENCES* 2008 ; 24 : 967-71.
- Principes de génétique humaine, Biofutur, Volume 1998, Issue 183, November 1998, Page 53.
- Pr. Pascale GUIRAUD. (2015). Introduction à la génétique médicale et chromosomes humains.
- Pr. Quessar. A. (2014). Cours d'Hématologie – 3ème Année. Faculté de Médecine et de Pharmacie Casablanca – Maroc.
- P. Vago, Un demi-siècle de cytogénétique humaine et médicale Morphologie, Volume 93, Issue 301, August–September 2009, Pages 42-50 ? l'équipe de cytogénétique médicale de Clermont-Ferrand.
- Rabineau et JM. Dupont « Cours de cytogénétique humaine ». Faculté de Médecine Cochin-Port Royal. Université PARIS V.
- Rabineau et JM. Dupont, 2001. Notion de base de la cytogénétique.
- R. Berger, Cytogénétique humaine. De 1956 à 2006 Pathologie Biologie, Volume 55, Issue 1, February 2007, Pages 1-12.
- Rowley, J.D., H.M. Golomb; and C. Dougherty, 15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukemia. *Lancet*, 1977. 1(8010); p.549-50.
- Ruggero, D., Z.G. Wang, and P.P. Pandolfi, The puzzling multiple lives of PML and its role in the genesis of cancer. *Bioessays*, 2000. 22(9): p. 827-35.

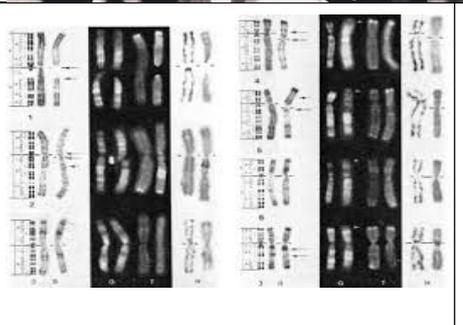
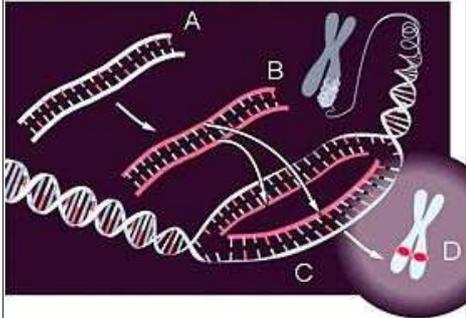
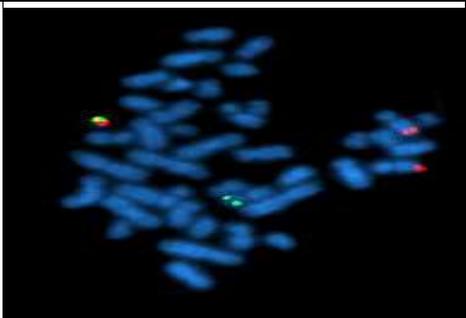
- Sebahoun G. L'hématologie biologique et clinique. Initiatives santé, 1998: 578p.
- Springer Verlag HSU TC Human and mammalian cytogenetics New York. 1979 pp 1-2.
- S. P. Romana, P. Gosset, et al. « Apport de la cytogénétique moléculaire au diagnostic des anomalies chromosomiques constitutionnelles .*Médecine thérapeutique / Pédiatrie*. 4. 4 (2001) : 284-290.
- Strudwick, S. and K.L. Borden, Finding a role for PML in APL pathogenesis: a critical assessment of potential PML activators. *Leukemia*, 2002. 16(10): p. 1906-17.
- Tabin CJ. Retinoids, homeoboxes and growth factors: toward molecular models for limb development. *Cell* 1991; 66: 199.
- Véronique DEMAS. (2009). Hémogramme : indications et interprétations. Item 316- Support de Cours (Version PDF).
- Wang, Z.G., et al., Role of PML in cell growth and the retinoic acid pathway. *Science*, 1998. 279(5356): p. 1547-51.
- Warrell R.P Jr. et al, *Acute promyelocytic leukemia*. *N Engl J Med*. 1993. 329(3):177-89.

Annexe

ANNEXE BIOBLOGRAPHIQUES

Annexe 1: Historique

1880		Première observation de chromosomes par Walther Flemming.
1956		Le nombre de chromosomes de l'espèce humaine a été établi à 46 par Tjio et Levan.
1959		Identification de la trisomie 21 du syndrome de Down par Jérôme Le Jeune et al.
1959		Identification de XXY du syndrome de <i>Klinefelter</i> par Jacobs et Stron.

<p>1960</p>		<p>Identification du chromosome Philadelphie dans la LMC par Nowell et Hungerford.</p>
<p>1968</p>		<p>découverte des techniques de bandes (Q,R,G).</p>
<p>1969</p>		<p>1ere hybridation in situ ADN-ARN* = cytogénétique moléculaire (Joe Gall et Mary Lou Pardou.</p>
<p>1970-1980</p>		<p>développement des techniques de détection: d'abord radioactive, fluorescence indirecte (1977), puis couplage direct ARN/ADN à un fluorochrome (1986).</p>
<p>1990 2000</p>		<p>Naissance de la technologie appelée : FISH, RT-PCR. Naissance de la technologie appelée : puce à ADN, bio-informatique</p>

ANNEXE MATERIELS ET METHODES

Annexe1 : Matériels

❖ Equipement

- Un incubateur à CO₂ pour culture cellulaire (5% de CO₂ à 37°C).
- Une hotte à flux laminaire (sécurité microbiologique, risque pathogène).
- Une hotte chimique pour manipulation de produits toxiques.
- Une centrifugeuse basse vitesse et une à micro-tubes.
- Un bain marie thermostaté 0 à 100°C.
- Deux réfrigérateurs 4°C.
- Congélateur -20°C.
- Un hygromètre pour la T° et l'humidité de la pièce du laboratoire
- Un microscope équipé d'un système d'acquisition et de traitement d'image avec imprimante, permettant l'analyse en fluorescence et en sonde R. Ce système est doté d'un équipement assurant la conservation des documents (les logiciels d'acquisition sont à mettre à jour en fonction de leur évolution).
- Des bacs en porcelaine.
- Les plateaux en inox.
- Les haricots, les portes lames, les portoirs des tubes coniques 15 ml et 50 ml, minuteurs.
- Micropipettes à différents volumes de 5 microlitres jusqu'à 1000 microlitres.
- Thermobrite : équipement pour dénaturation et hybridation pour FISH.

❖ Consommables

- Les tubes coniques 15ml, 50ml.
- Les embouts.
- Les lames et lamelles.
- Les flasques de culture.
- Les eppendorfs.
- Les pipettes Pasteur.
- Portoirs tubes.
- Les seringues.
- Compresses.
- Les gants.
- Désinfectants.

❖ Réactifs :

• Réactifs pour la culture et la sortie de culture cellulaire

Reactifs	Stockage
RPMI 1640 sans glutamine	+4
Serum de Veau Foetal 20%	-20
Penicilline + streptomycine+ l-glutamine	-20
Heparine lithum	TA
Synchrotest Solution A	-20
Synchrotest Solution B	-20
Colcemide (10ug/ml)	+4
KCL (poudre)	TA
Methanol absolu	TA
Acide acetique glacial	TA

• Réactifs pour caryotype en bandes R

Reactifs	Stockage
Na ₂ HPO ₄ (1M) poudre	TA
KH ₂ PO ₄	TA
Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O	TA
PBS 20X	TA
Acide citrique	TA
Giemsa à 4 %	TA

- **Réactifs pour la FISH**

Pour la FISH métaphasique, tous les réactifs de l'étape de culture cellulaire sont nécessaires.

Réactifs	Stockage
20 SSC	TA
PBS (phosphate buffered saline).	TA
Tween-20	TA
Ethanol	TA
HCL	TA
Pepsine	-20
Formaldéhyde (optionnel)	TA
Igéal0,1	TA
Igéal0,3	TA
DAPI	+4
Les sondes	-20

Types de sondes pour LAP

2 types de sondes sont utilisés :

- Sonde locus double fusion double couleur : Chaque locus PML (15q 22) et RARA (17q12) est couple à un fluorochrome (exp : FZTC (vert) et Rhodamine (rouge), la fusion donne un signal jaune).
- Sone break apart ou spécifique : Le locus RARA sur le 17q12 est marqué un double couleur jaune, qui va se séparer en vert et en rouge sur le (der17) et le (der15).

❖ **Milieux et solutions**

➤ Milieu de transport : RPMI+ HEPARINE+ATB+ L-glutamine.

➤ Milieu de culture :

- RPMI 500ml+ Sérum de veau fœtal 100ml+ L-glutamine
- 10cc+ peni-strepto 1,25 ml+ héparine 5cc.

➤ Colchicine.

➤ Kcl.

➤ Carnoy : solution de fixation :

- Acide Acétique 1/3+ Méthanol 2/3.

**Culture et
sortie de
culture
cellulaire**

➤ Carnoy : solution de fixation.

➤ solution de dénaturation :

- NaH₂PO₄ 60g+Compléter l'eau distillé à 500 ml.

➤ Solution de coloration (Giemsa à 4%) :

- Giemsa 4cc+ Compléter l'eau distillée à 100 ml.
- Solution de Buffer 2CC

Caryotype

➤ Milieu éthanol :

- 100 % : 200 Ethanol.
- 85% : 170 Ethanol+ Compléter l'eau distillée à 200 ml.
- 70% : 140 Ethanol+ Compléter l'eau distillée à 200 ml.

➤ Solution de Buffer (20scc) :

- 20scc 100+L'eau distillé 1cc=1000ml.

➤ Solution IGEP 0,1% :

- Igépal 1cc+ 20scc 100ul+ Compléter l'eau distillée à 100ml.

➤ Solution IGEP 0,3% :

- Igépal 1,5cc+20scc 10ul+ Compléter l'eau distillée à 100 ml.

➤ Solution Tween :

- 20scc 100ml+ Compléter l'eau distillée à 1000ml+ Tween 500ul.

FISH



RPMI Complet



Les Boites à FISH



Synchro B



Synchro A



Réfrigérateur +4

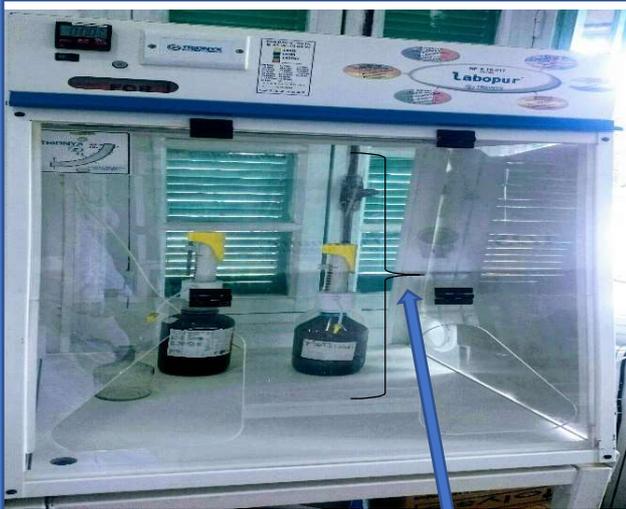


KCL

CONSERVE



Etuve Seche



Haute chimique



Haute Laminaire



Acide acétique



Méthanol



Etuve Humide 5% CO2 37



Sonde PML-RARA



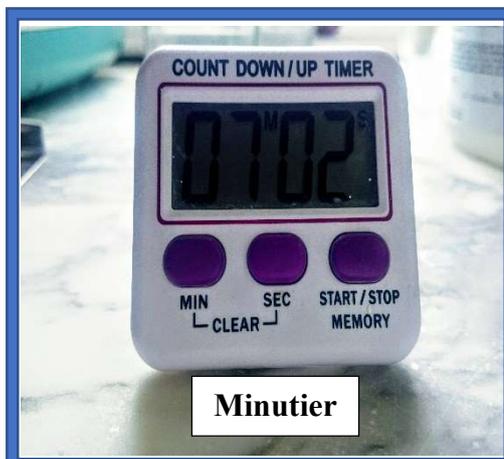
Dapi



Congélateur -20°C.



Colchicine



Minutier



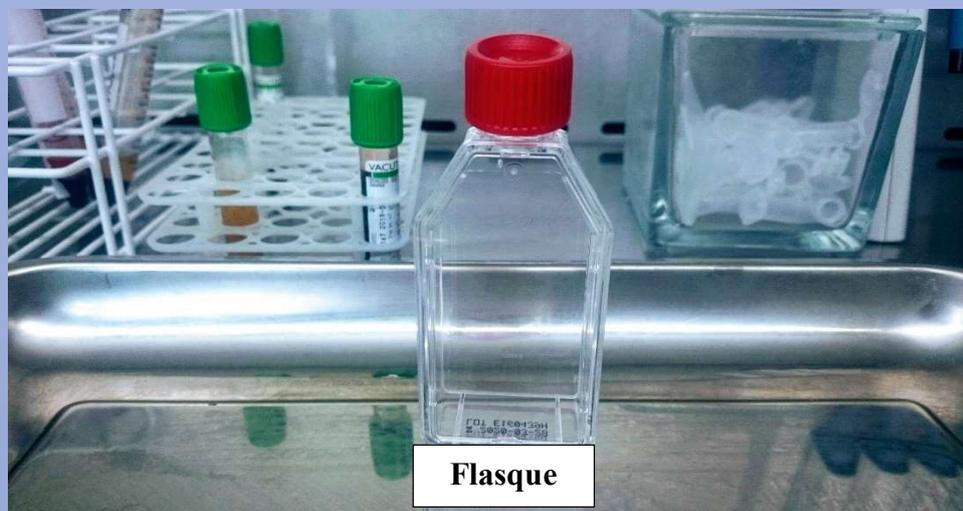
Filtere



Ependourffe



Tube



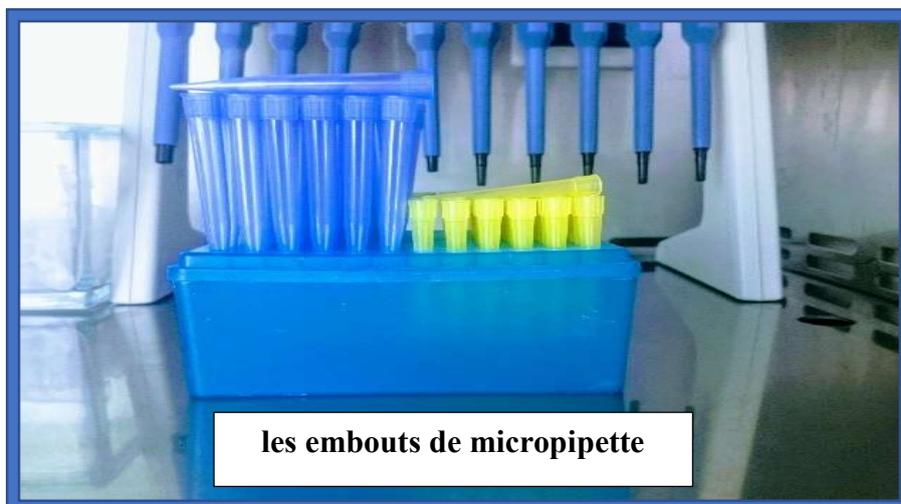
Flasque



Suringue



KIT de prélèvement



les embouts de micropipette



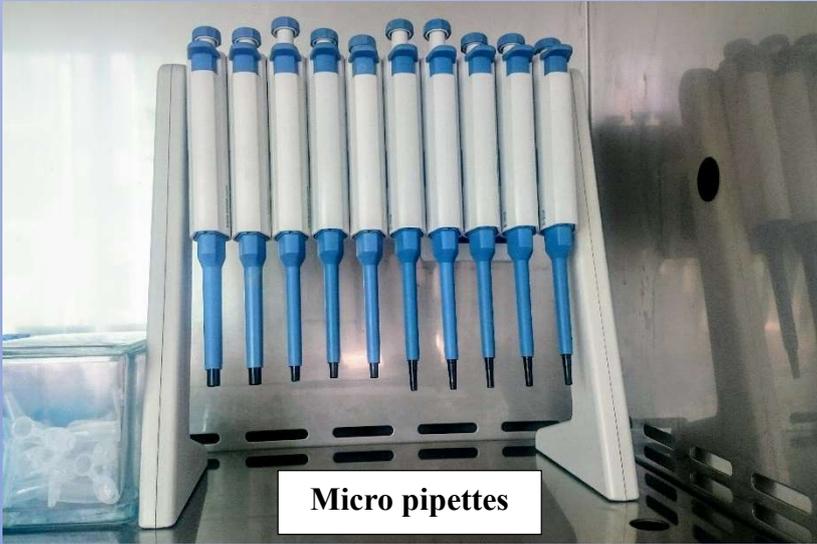
Détergent



Eau distillée



Détergent



Micro pipettes



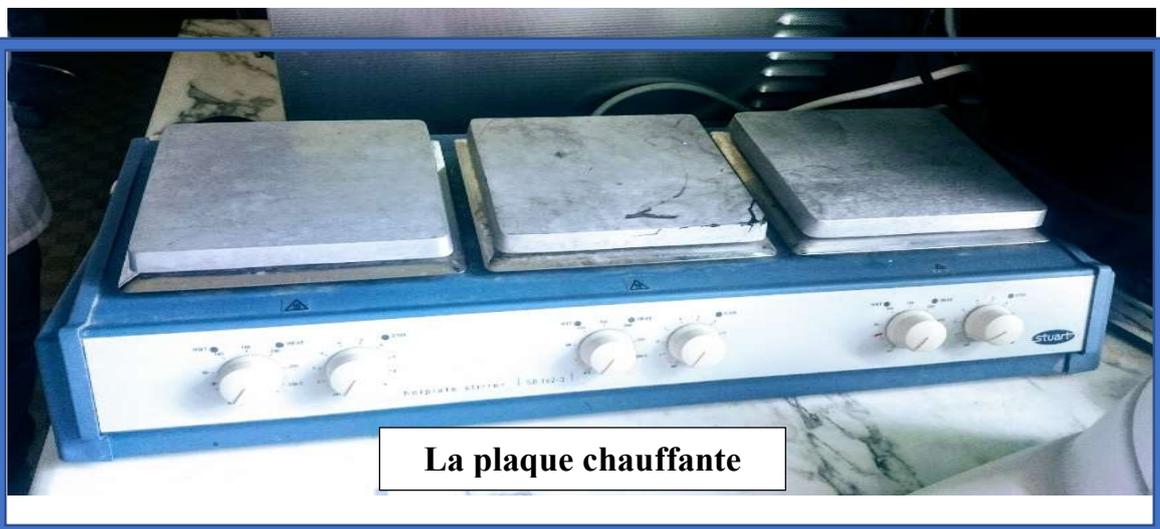
Pipette



Plateaux



Arcaux



La plaque chauffante



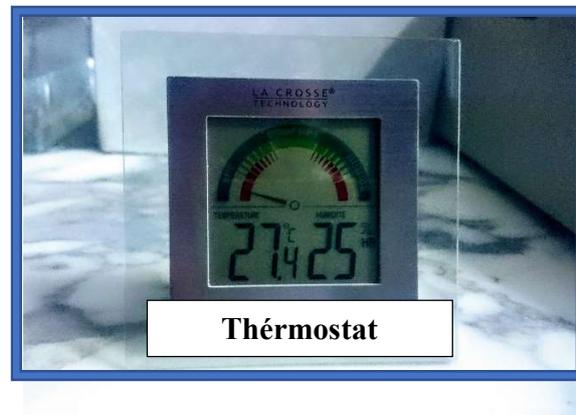
Fixo gum



Huile d'émersion



Solution Alcoolique



Thérmostat

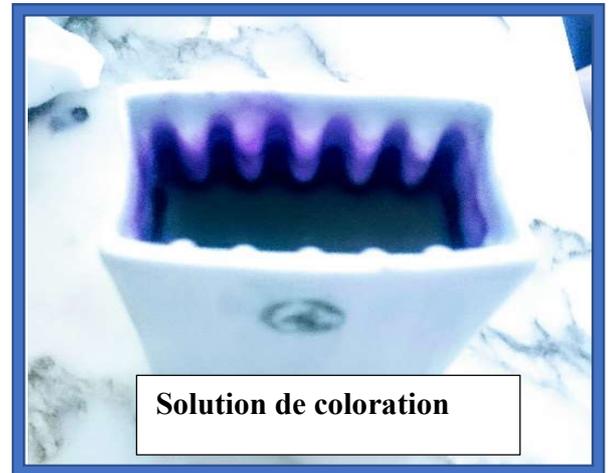
La centrifugeuse

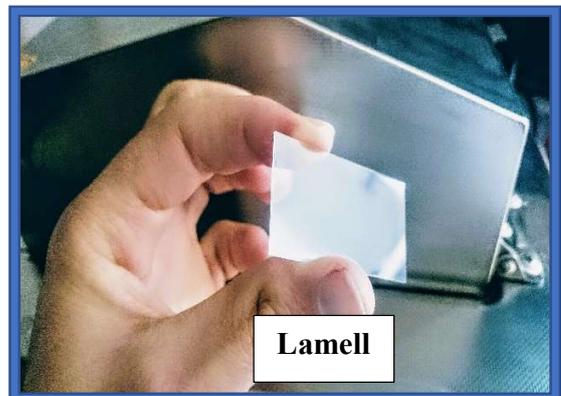
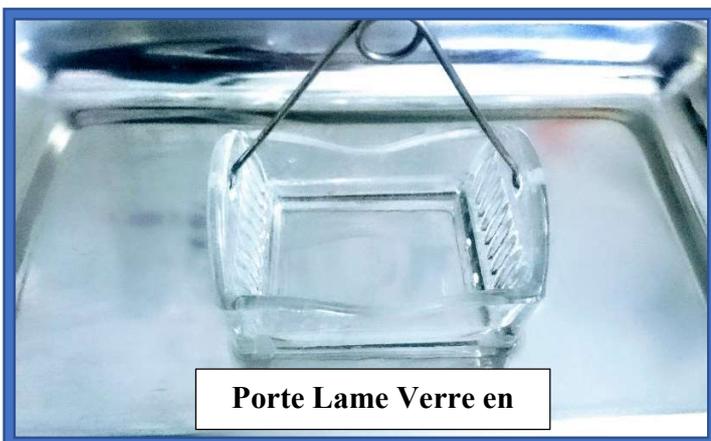
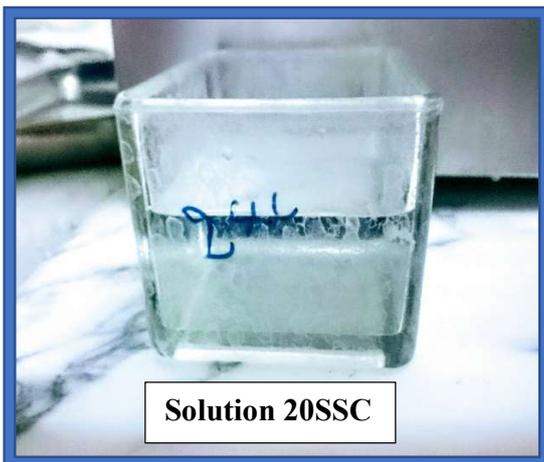
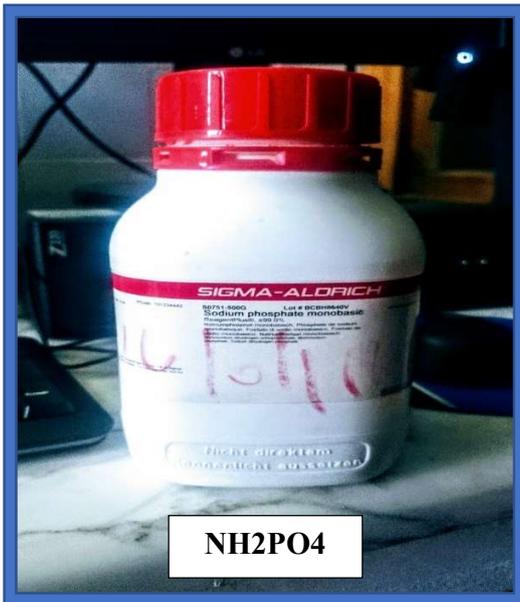


la micro-centrifugeuse



Bain Marie







Thermomètre



Microscope en florescence

Introduction

Une étude nationale faite entre 2006 et 2010, sur 1426 cas de leucémies aiguës myéloblastiques, retrouve une incidence annuelle de 0,7 cas pour 100000 habitants.

Parmi toutes les leucémies aiguës myéloblastiques, 9,3 % sont des Leucémies Promyeloctaires (LAM3).

I.1 Répartition des patients selon leur sexe

Dans notre série, les 33 patients au moment du diagnostic se répartissent en 17 femmes et 16 hommes, soit un sexe ratio H /F de 0,94.

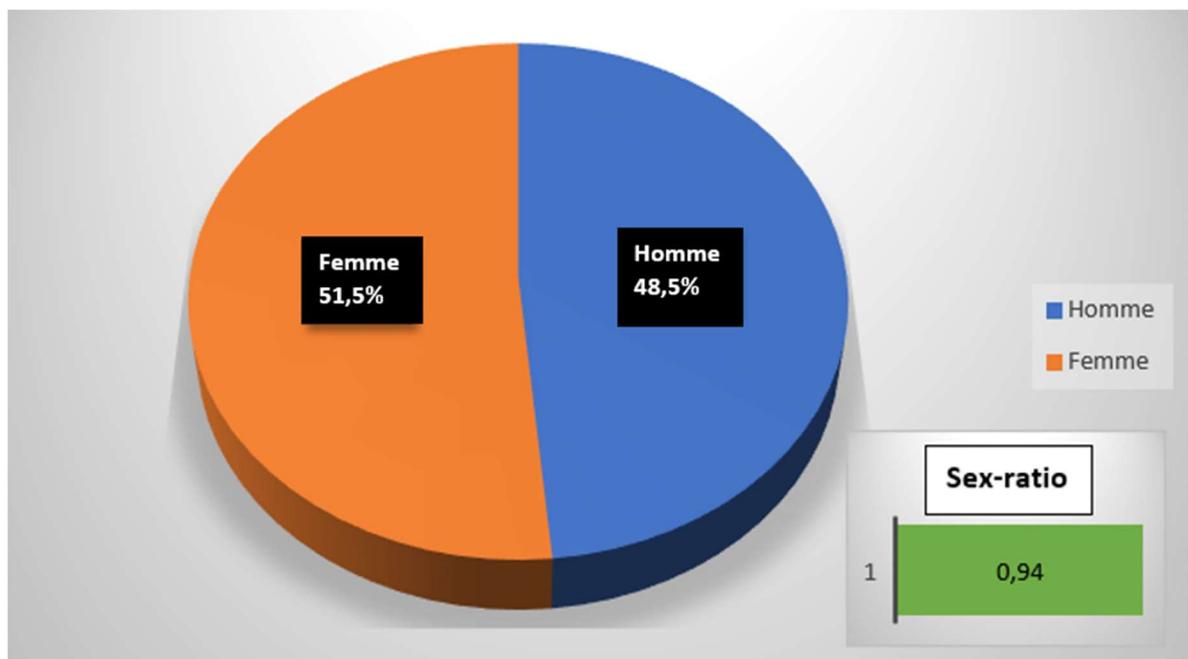


Figure 27: Répartition des patients selon le sexe.

La répartition des cas selon leur sexe donne les résultats présentés dans la figure 27. D'après ces résultats, nous notons une distribution égale dans les deux sexes.

I.2 La répartition des patients selon l'âge

L'âge de nos patients au moment du diagnostic allait de 17 à 67 ans avec un âge moyen de 44.21 ans.

La répartition selon les tranches d'âge présentée dans la figure29.

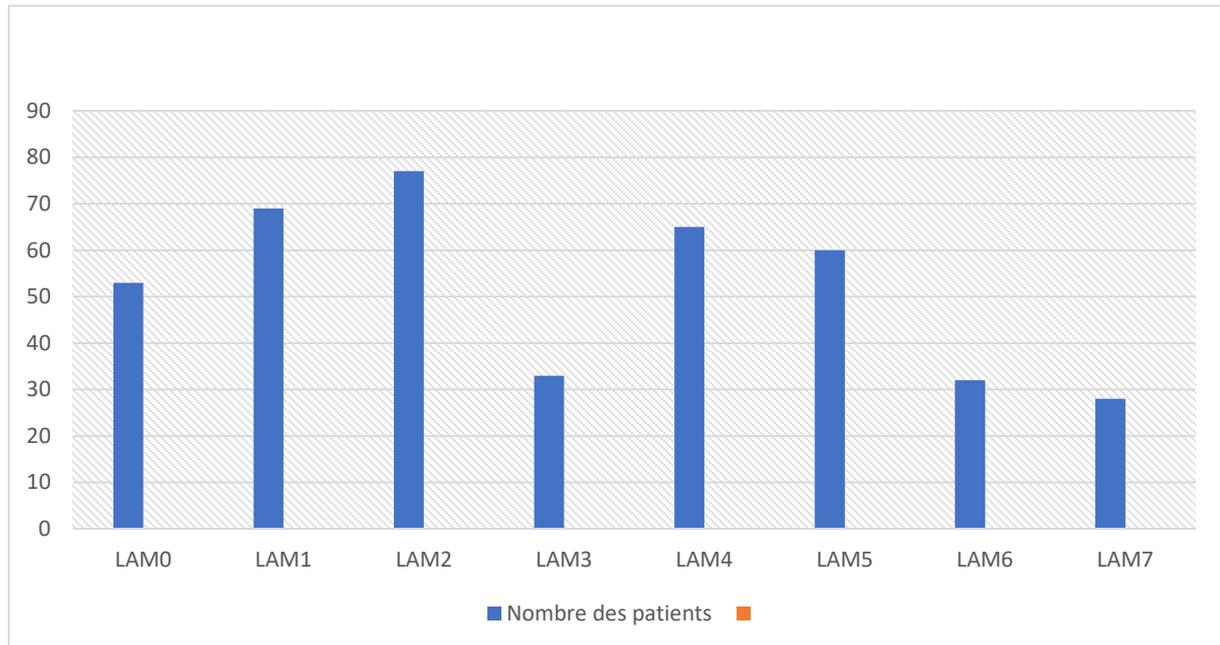


Figure 28: Histogramme montrant la répartition des patients en fonctions de tranches d'âges de 10 ans.

Nous avons effectué une répartition des malades selon 6 classes d'âge, La répartition des patients selon les tranches d'âge montrent que :

- L'incidence la plus élevée s'observe entre : 60-70 ans avec 9 cas observés soit 27,27%.

40-50 ans avec 8 cas observés soit 24,24%.

- Les tranches d'âges : 10-20ans, 20-30ans, 30-40ans et 50-60ans, l'incidence s'observe égale avec 4 cas observés soit 12,12%.

II. Etude prospective

II.1 Présentation des cas

Nous avons choisi d'exposer les résultats des six cas les plus représentatifs de type de Leucémie aiguë promyélocytaire rencontrées dans l'unité d'hospitalisation du service d'hématologie du CAC, avec une présentation les résultats de l'hémogramme, caryotype et FISH.

Numéro de patients	Sexe	Age (ans)
Cas N° : 1	Homme	19
Cas N° : 2	Homme	26
Cas N° : 3	Homme	40
Cas N° : 4	Femme	31
Cas N° : 5	Femme	33
Cas N° : 6	Femme	67

Tableau VI : Présentation des cas.

II. Résultats des cas :

Cas N°1

Notre premier patient est né en 1988 originaire de Tissemsilt a été diagnostiqué le 13/12/2017. Une leucémie aiguë Promyélocytaire (M3) est évoquée cytologiquement sur frottis sanguin et médullaire.

Il a reçu un traitement de chimiothérapie accompagnée de l'acide transrétinoïque

Le devenir de ce patient : vivant

1) Résultats de l'hémogramme

GB	GR	HB	VGM	CCMH	Plaquette	Lym	Reticulocytes
105570 ul	5,61 10 ⁶ ul	14,6 g/dl	82,4 μ ³	31,6 %	20000 ul	950 ul	20000 ul

Interpretation

A partir de ces résultats, nous avons observé :

Les GB au-dessus de 10000 ul donc il s'agit d'hyperleucocytose.

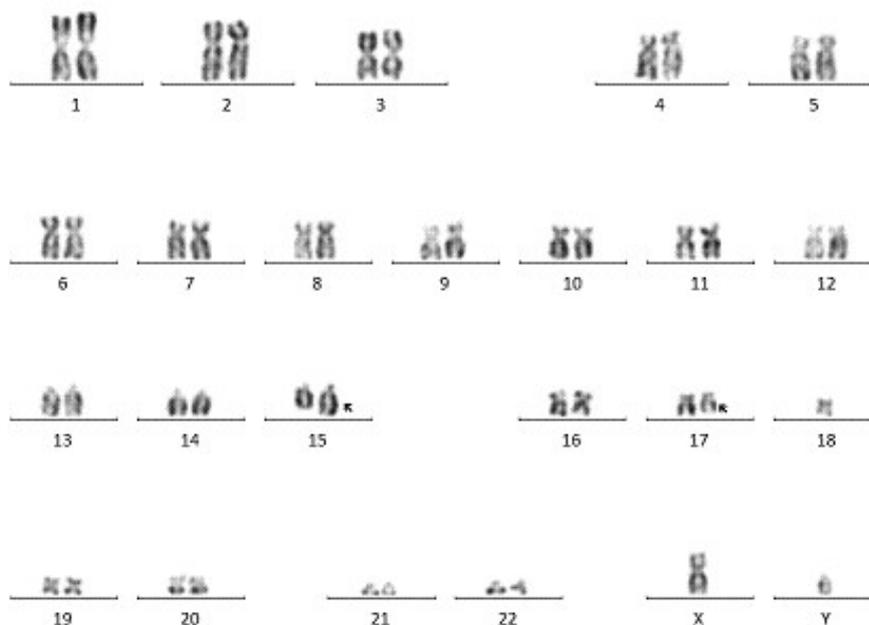
Une CCMH inférieure à 32% :c'est une hypochromie.

Les plaquettes sous la valeur de 150 G/L : donc c'est une thrombopénie avec risque hémorragique.

Reticulocytes < 120000 ul donc c'est une anémie arégénérative.

Les autres paramètres (GR, Hb, VGM, Lym) sont normaux.

2) Les résultats de la cytogénétique conventionnelle (caryotype)



Laboratoire d'hématologie , unité cytogenetique EHS ELCC CAC Blida

Caryotype : G.A : t(15;17)(q22;q12)

Figure 29: Le caryotype (bandes R) du cas N°1: 46 XY t(15; 17) (q22; q12).

3) Les résultats de la cytogénétique moléculaire (FISH)

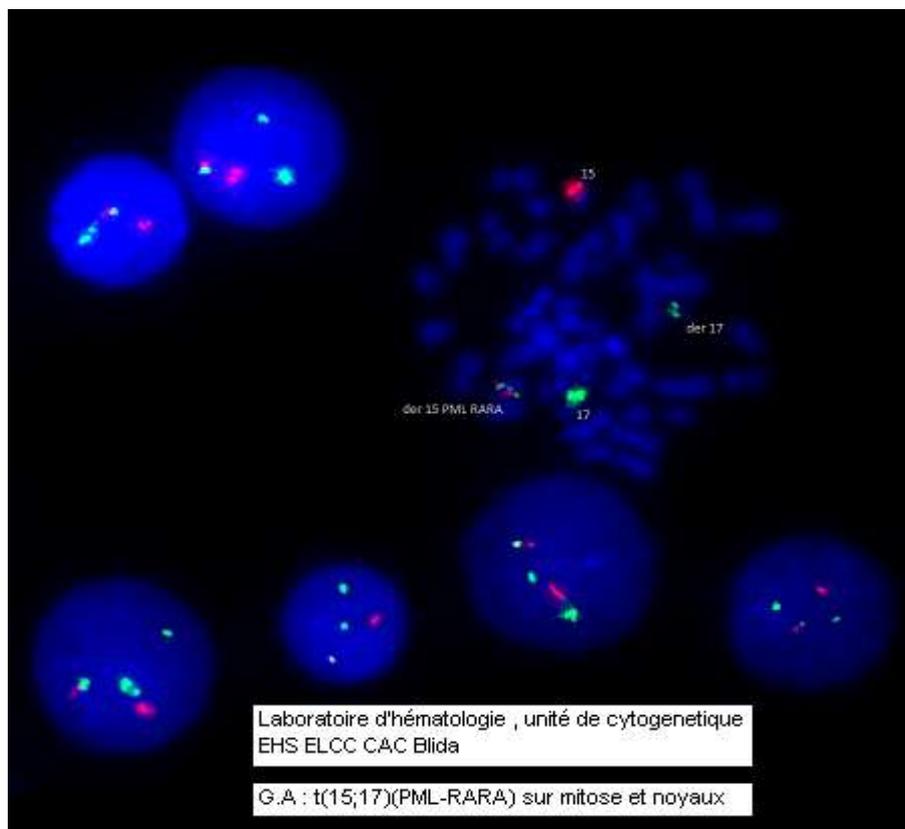


Figure 30: Résultats de la FISH du cas N°1 avec présence de 2 fusions sur le dérivé 15 et le dérivé 17, un signal rouge normal sur le 15 et un signal vert normal sur le 17.

Cas N°2

Notre deuxième patient est né en 1990 originaire de Aïn Defla a été diagnostiqué le 06/02/2018. Une leucémie aiguë Promyélocytaire (M3) est évoquée cytologiquement sur frottis sanguin et médullaire.

Il a reçu un traitement de chimiothérapie accompagnée de l'acide transrétinoïque

Il est Décédé.

1) Résultats de l'hémogramme

GB	GR	HB	VGM	CCMH	Plaq	Lym	PNN	Reticulocytes
20320 ul	2,53 10 ⁶ ul	7,6 g/dl	86,2 μ ³	34,9 %	25000 ul	2800 ul	850 ul	69800 ul

Interpretation

Dans cette optique nous avons observé :

Une hyperleucocytose (GB > 10000).

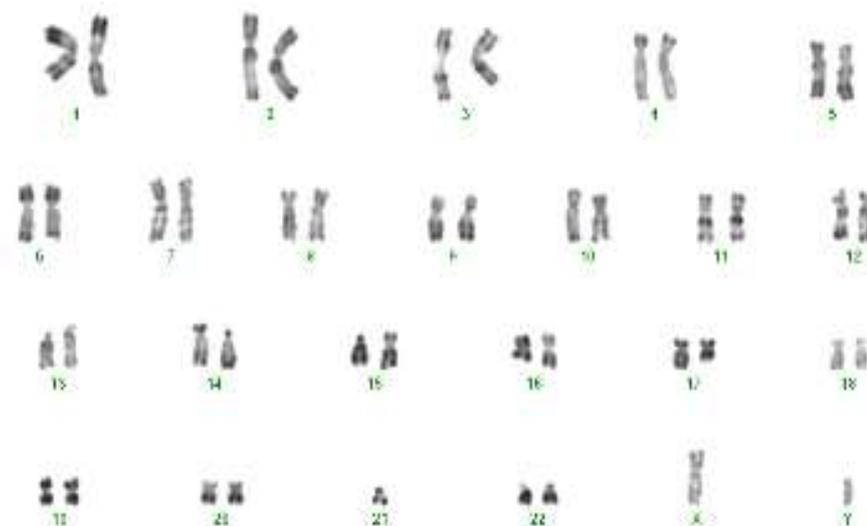
Une anémie normocytaire, normochromie, argénérative.

Une thrombopénie (les plaquettes < 150 G/L).

Une neutropénie (Le taux absolu des polynucléaires neutrophiles est inférieur à 1600 mm³

Les lymphocytes sont normaux.

2) les résultats de la cytogénétique conventionnelle (caryotype)



Laboratoire 'hématologie , unité de cytogenetique

Caryotype : K.O : t(15;17)(q22;q12)

Figure 31: Le caryotype (bandes R) du cas N°2 : 46 XY t(15; 17) (q22; q12).

3) Les résultats de la cytogénétique moléculaire (FISH)

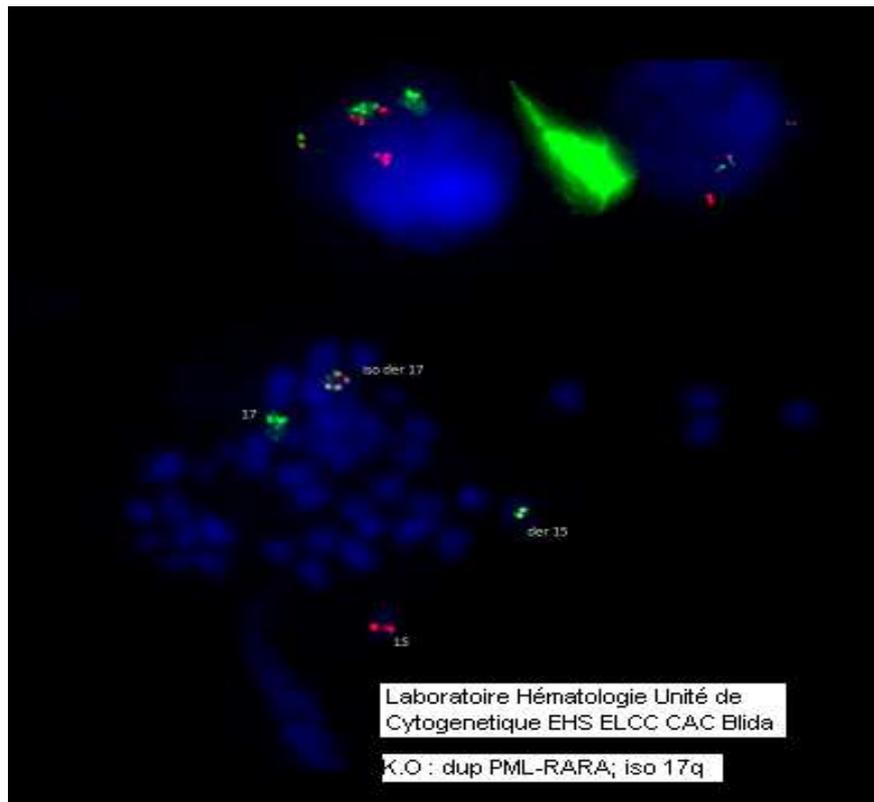


Figure 32: Résultats de la FISH du cas N°2., avec présence de 3 signaux, un sur le dérivé 15 et deux sur le dérivé 17.

Cas N°3

Notre troisième patient est né en 1991 originaire de Djelfa a été diagnostiqué le 30/01/2018 Une leucémie aiguë Promyélocytaire (M3) est évoquée cytologiquement sur frottis sanguin et médullaire.

Il a reçu un traitement de chimiothérapie accompagnée de l'acide transrétinoïque

Le devenir de ce patient est encore vivant.

1) Résultats de l'hémogramme

GB	GR	HB	VGM	CCMH	Plaquette	Lym	Reticulocytes
5110 ul	2,7 10 ⁶ ul	7,9 g/dl	88,6 μ ³	32,9 %	38000 ul	1690 ul	75800 ul

Interpretation

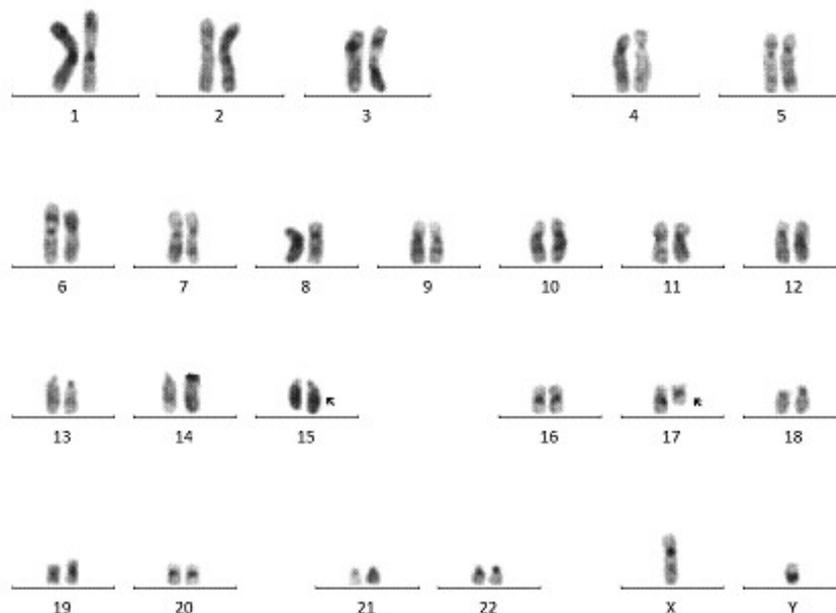
Nous avons observé :

Une anémie normocytaire normochrome argénérative

Une thrombopénie avec risque hémorragique

Les autres paramètres (GB, Lym) sont normaux.

2) Les résultats de la cytogénétique conventionnelle (caryotype)



Laboratoire d'hématologie, unité de cytogenétique, EHS ELCC CAC Blida

Caryotype : A.K ; t(15;17)(q22;q12)

Figure 33 : Le caryotype (bandes R) du cas N°3 : 46 XY t(15;17)(q22;q12).

3) Les résultats de la cytogénétique moléculaire (FISH)

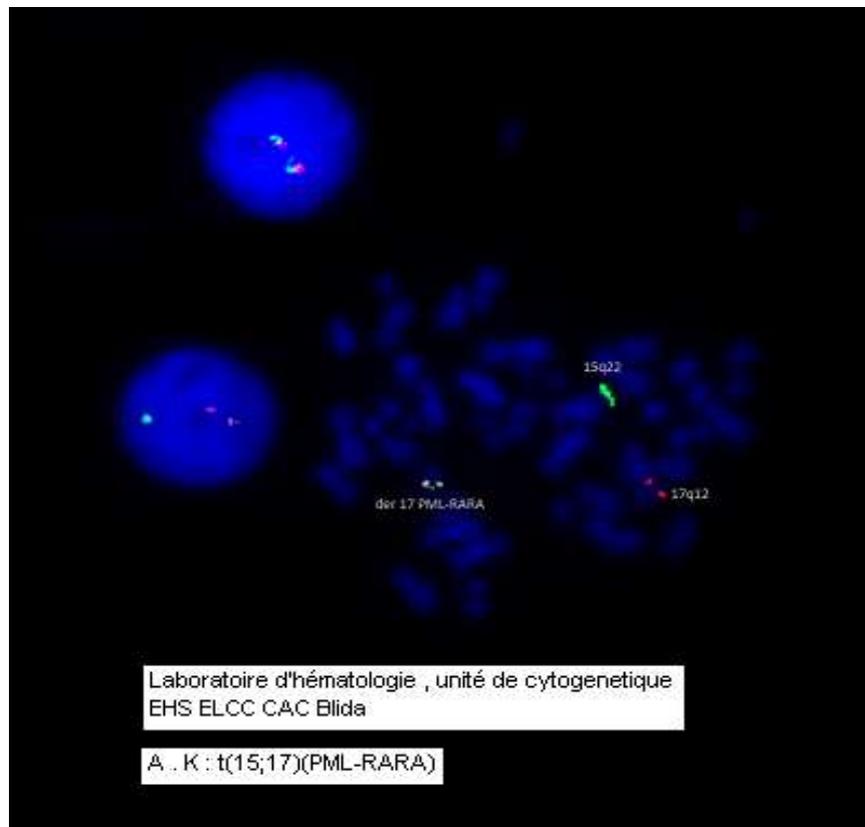


Figure 34 : Résultats de la FISH) du cas N°3, avec présence un signal de fusions PML/RARA sur le dérivé17, le dérivé15 est délité, un signal vert normal sur le 15 et un signal rouge normal sur le 17.

Cas N°4

La quatrième patiente est une femme âgée de 31 ans originaire de Médéa a été diagnostiquée le 04/03/2018 pour une leucémie aiguë Promyélocytaire (M3).

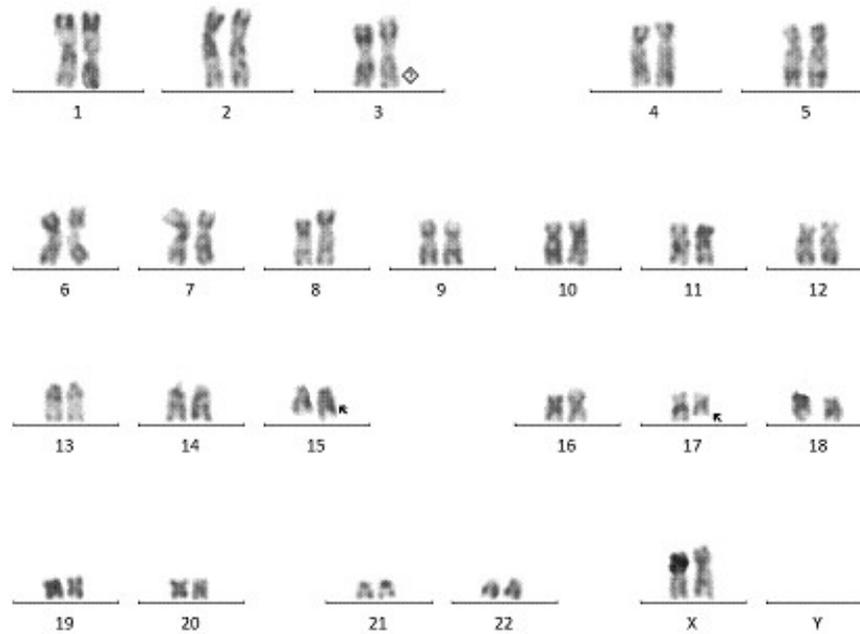
Résultats de l'hémogramme

GB	GR	HB	VGM	CCMH	Plaquette	Lym	Reticulocytes
35480 ul	3,06 10 ⁶ ul	9,8 g/dl	97,7 μ ³	32,8 %	20000 ul	1420 ul	24500 ul

Interpretation

Cette patiente a : Une hyperleucocytose, Une Thrombopénie, lymphocyte normaux, Une anémie normocytaire arégénérative.

2) Les résultats de la cytogénétique conventionnelle (caryotype)



Laboratoire d'hématologie, unité de cytogenétique EHS ELCC CAC Blida

S. H: caryotype : t(15;17)(q22;q12)

Figure 35: Le caryotype (bandes R) du patient) du cas N°4 : 46 XX t(15; 17) (q22;q12).

3) Les résultats de la cytogénétique moléculaire (FISH)

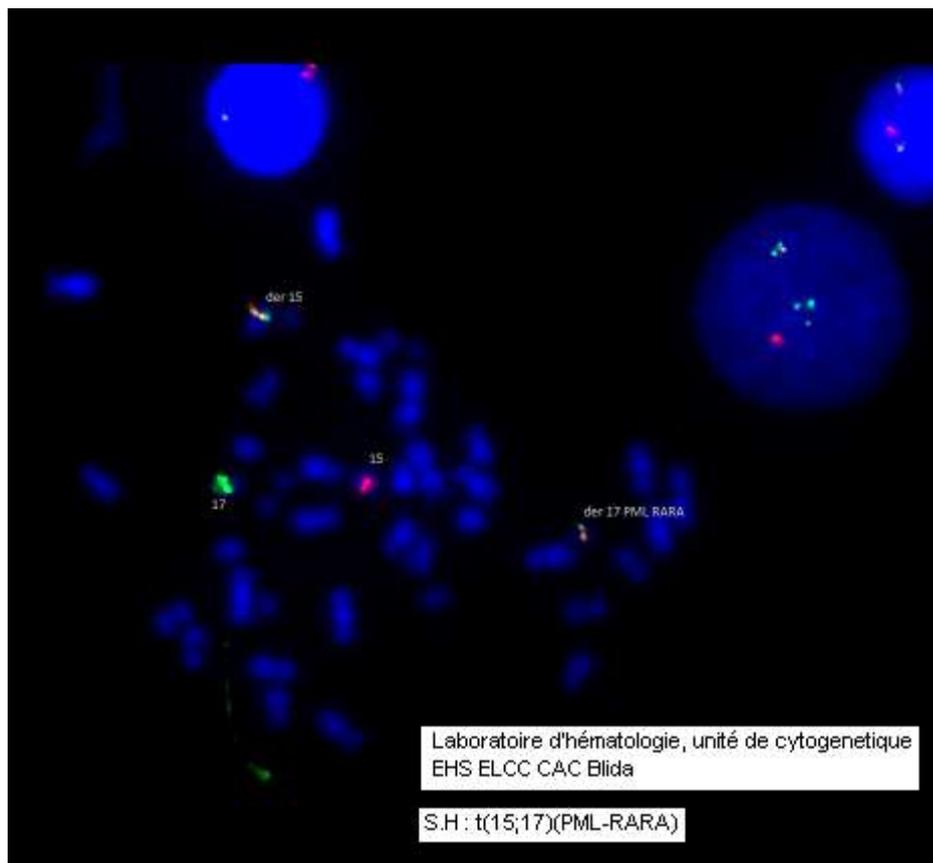


Figure 36 : Résultats de la FISH du cas N°4, avec résultats classique pour la sonde utilisée c'est-à-dire 2 fusions sur le der 15 et 17 et un signal rouge normal sur le 15 et vert sur le 17

Cas N°5

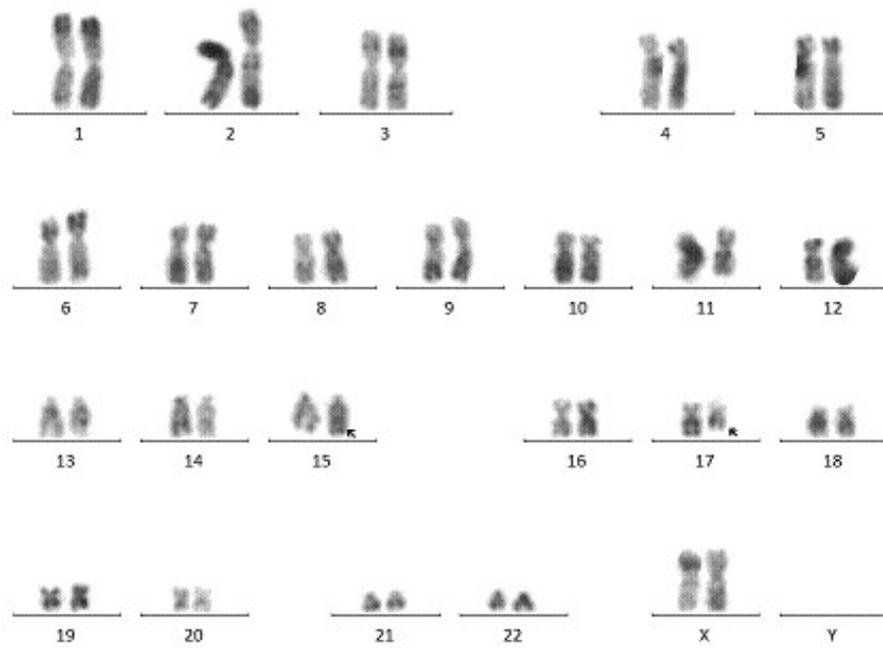
La cinquième patiente est une femme née en 1962 originaire de Blida a été diagnostiquée le 08/05/2016 pour une leucémie aiguë Promyélocytaire (M3).

1) Résultats de l'hémogramme

GB	GR	HB	VGM	CCMH	Plaquette	Lym	Reticulocytes
109550 ul	3,36 10 ⁶ ul	10 g/dl	88,4 μ ³	33,7 %	44000 ul	1312 ul	60800 ul

Interpretation
 Cette patiente a : Une Hyperleucocytose, Une anémie normocytaire normochrome arégénérative, Thrombopénie avec risque hémorragique, lymphocyte normaux.

2) Les résultats de la cytogénétique conventionnelle (caryotype) :



Laboratoire d'hématologie , unité de cytogenetique EHS ELCC CAC Blida

Caryotype : L.K : t(15;17)(q22;q12)

Figure 37: Le caryotype (bandes R) du cas N°5, 46 XX t(15; 17) (q22;12).

3) Les résultats de la cytogénétique moléculaire (FISH) :

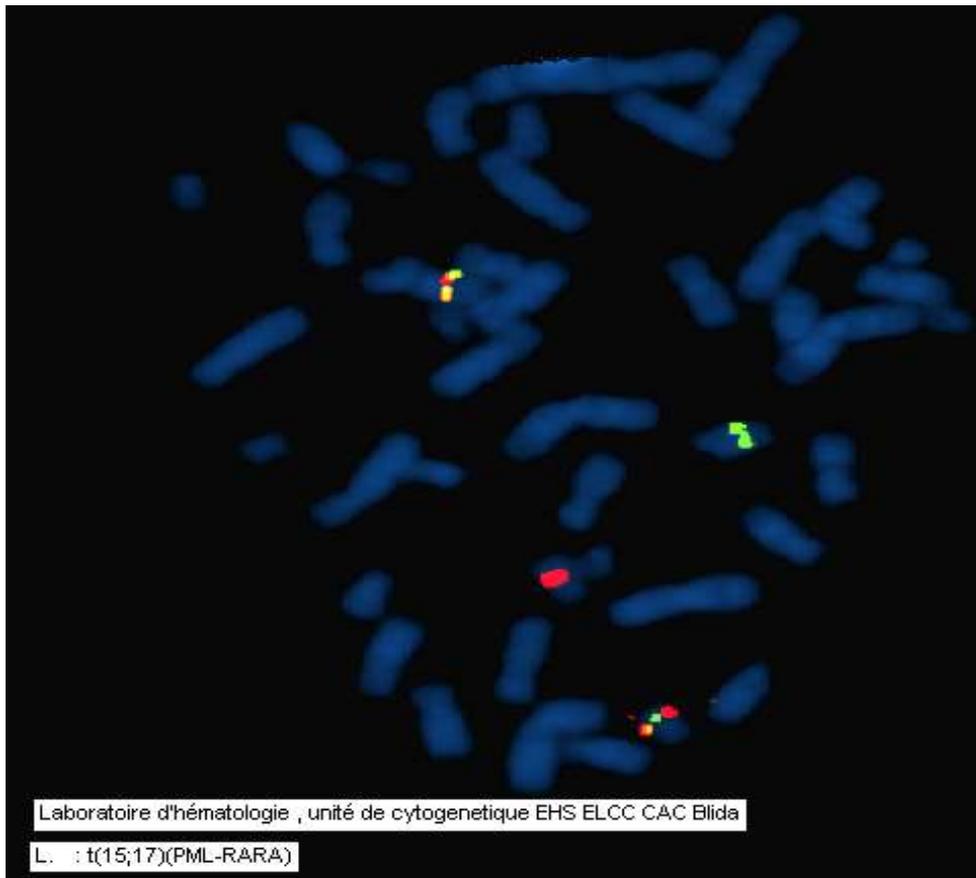


Figure 38: Résultats de la FISH du cas N°5 avec présence de 2 fusions sur le der 15 et 17 et un signal rouge normal sur le 15 et vert sur le 17

Cas N°6

La dernière patiente est née en 1984 originaire de Blida a été diagnostiquée le 15/04/2018 pour une leucémie aiguë Promyélocytaire (M3).

1) Résultats de l'hémogramme du :

GB	GR	HB	VGM	CCMH	Plaq	Lym	PNN	Reticulocyte s
2140 ul	2,09 10 ⁶ ul	8,8 g/dl	90,3 μ ³	35,8 %	23000 ul	620 ul	950 ul	21000 ul

Interpretation

Dans cette optique nous avons observé :

Une leucopénie ($GB < 4000 \text{ mm}^3$).

Une anémie ($GR < 4$ Millions par microlitre et de $Hb < 12 \text{ g/dl}$).

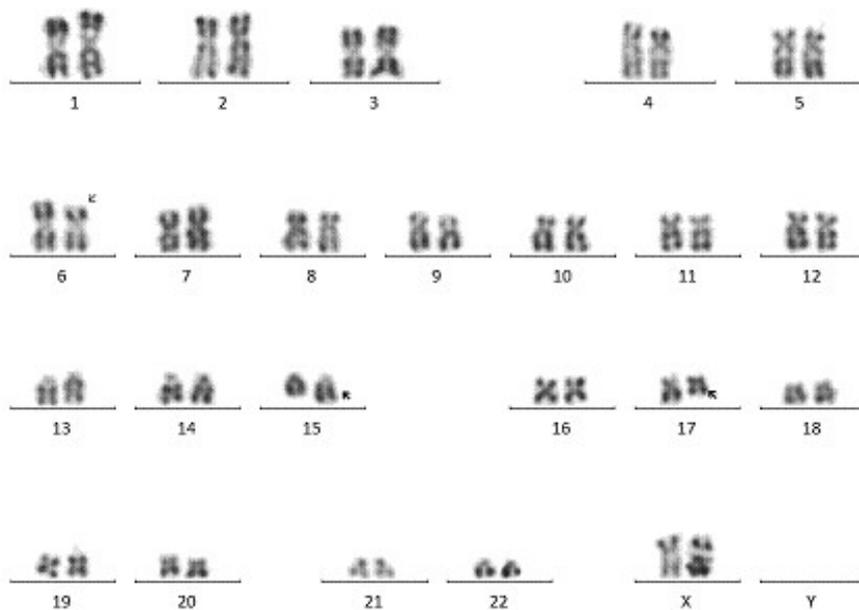
Une anémie normocytaire, normochromie, arégénérative.

Une thrombopénie (les plaquettes $< 150 \text{ G/L}$).

Une lymphopénie ($Lym < 1500 \text{ mm}^3$).

Une neutropénie ($PNN < 1600 \text{ mm}^3$).

2) Les résultats de la cytogénétique conventionnelle (caryotype):



Laboratoire d'hématologie , unité de cytogenetique EHS ELCC CAC Blida

Caryotype : L.A : $t(15;17)(q22;q12)$

Figure 39: Le caryotype (bandes R) du cas N°6 : $46 \text{ XX } t(15;17)(q22;q12)$

1) Les résultats de la cytogénétique moléculaire (FISH) :

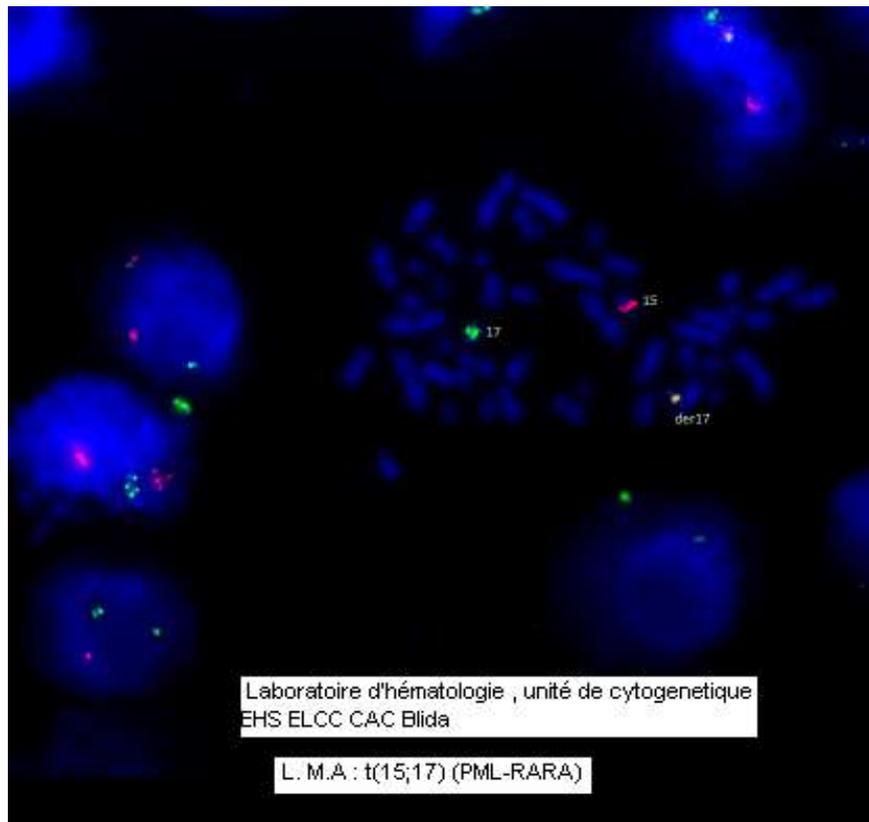


Figure 40: Résultats de la FISH du cas N°6, avec présence de 2 fusions sur le der 15 et 17 et un signal rouge normal sur le 15 et vert sur le 17

III. Discussions :

III. 1 Selon l'hémogramme :

L'hémogramme désigné sous le terme de (Numération-Formule Sanguine) est l'élément clé du diagnostic, il a pour but d'apporter des informations quantitatives (numération) sur les cellules sanguines mais également des informations qualitatives (formule). Les valeurs moyennes de l'hémogramme sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau VII : Les valeurs moyennes de l'hémogramme

paramètres	Formules	Valeurs moyennes
GB	Globules blancs	4000 - 10000/ μ L
GR	Globules rouges	H : 4,2 à 5,7 μ L F : 4,0 à 5,3 μ L
Hb	Hémoglobine	H : 13 à 18 g/dl F : 12 à 16 g/dl
VGM	Volume Globulaire Moyen	80 - 100 μ^3
CCMH	Concentration moyenne en hémoglobine	32%
Lym	lymphocytes	800 - 4000/ μ L
Plaq	Plaquettes	150 000 - 450 000 / μ L
Réticulocytes	globules rouges jeunes	120000 μ L
PNN	polynucléaires neutrophiles	1600 - 7500/ μ L

- **Globules blancs** : En dessous de 4000/mm³ on parle de **leucopénie** et au-dessus de 10000/mm³ d'**hyperleucocytose**.
- **Hémoglobine** : On parle de **polyglobulie** lorsque ce nombre est anormalement élevé ; d'**anémie** lorsqu'il est trop bas.
- **VGM** : Le VGM est compris entre 80 et 100 μ^3 donc c'est une **normocytaire**. Sous le seuil de 80, on parle de **microcytose** et au-dessus de 100 de **macrocytose**.
- **CCMH** : Lorsque la CCMH est inférieure à 32% on parle d'**hypochromie**. Si la CCMH est normal on parle une **normochrome**.
- **Plaq** : Sous la valeur de 150 G/L on utilise le terme de **thrombopénie** ; au-dessus de la valeur de 450 G/L on parle de **thrombocytose** (ou d'hyperplaquettose).
- **Lym** : Lorsque les lymphocytes sont inférieurs à 800 μ L on parle de **lymphopénie**. Au-dessus de 4000mm³ on parle de **lymphocytose**.
- **Réticulocytes** : Ce chiffre permet de connaître le caractère **régénérative** (réticulocytes élevés) ou **arégénérative** (réticulocytes bas) d'une **anémie**.
- **PNN** : La concentration des polynucléaires neutrophiles peut être augmentée (polynucléose neutrophile) ou au contraire abaissée par rapport aux normes (neutropénie).
-

III. 2 Selon le caryotype :

La cytogénétique conventionnelle (caryotype) permet le diagnostic dans 95% des cas de la LAP. Elles sont réalisées dans le but de détecter des aberrations chromosomiques. Le suivi des patients traités se fait par biologie moléculaire (transcrit PML/RARA).

A l'aide de l'huile d'immersion et un microscope optique en grossissement 100 nous avons classés 20 mitoses par un logiciel (Ikaros) et nous avons établi un caryotype en (Bande R) qui a permis d'identifier la présence de :

- la translocation t(15; 17) (q22; q12) chez les patients (N°1, N°2, N° 3, N°4, N°5 et N°6). La translocation fusionne le gène PML (15 q22) au gène (RAR alpha) du récepteur de l'acide rétinoïque (17 q12), ce qui se traduit par une cassure et un échange de matériel entre le chromosome 15 et le chromosome 17 aboutit à la formation d'un chromosome 15 plus long et d'un chromosome 17 plus court.

III. 3 Selon la FISH :

La FISH utilise les propriétés des séquences d'ADN de se fixer spécifiquement sur leurs homologues cellulaires. Des sondes spécifiques sont fabriquées après clonage des gènes et marquées chimiquement à l'aide de fluorochromes, ces sondes dites spécifiques pour un locus donné sont utilisées pour la détection de translocations, isochromosomes ou amplifications géniques.

La FISH est un examen ciblé qui ne visualise pas tout le génome, il met en évidence le signal de fusion PML/RAR α sur :

- Noyaux (FISH inter-phasique)
- Mitoses (FISH métaphasique)

La mise en évidence d'un gène hybride PML/RAR α par FISH confirmera alors le diagnostic de la leucémie aigüe promyélocytaire, donc cette technique présente comme avantage :

- La détection des translocations entre 15 et 17 «masqués» non visualisés par la cytogénétique conventionnelle.
- Sa sensibilité est meilleure que la cytogénétique conventionnelle en particulier avec les sondes double fusion.

Les résultats de la FISH chez les patients (N°1, N°4, N°5 et N°6) avec la sonde PML/RAR α , Translocation, dual fusion probe (Cytocell) a montré la présence du signal PML/RAR α sur 100% des noyaux et des mitoses.

La sonde couvrant le gène PML sur le chromosome 15 est marquée en rouge, celle couvrant le gène RAR α sur le chromosome 17 est marquée en vert. On observe un signal rouge sur le chromosome 15, un signal vert sur le chromosome 17 et un signal de fusion PML/RAR α en jaune sur le chromosome (der (15)). La fusion des gènes PML/RAR α est mise en évidence par la technique FISH.

Dans le résultat de patient N°2 nous avons observé une autre anomalie chromosomique, cette anomalie est connue comme isochromosome. Un isochromosome est un chromosome anormal formé de deux bras longs avec perte du bras court, donc c'est un isochromosome 17q.

Isochromosome 17q du bras court est visible sur noyaux et une mitose avec trois signaux de fusion PML-RARA (couleur Jaune), et une cellule d'interphase normale avec un rouge et un signal vert.

La FISH de troisième patient : L'image FISH montre un seul signal jaune sur le dérivé 17, le 2ème signal jaune théoriquement présent sur le dérivé 15 est absent l'explication de ce cas peut être faite par un mécanisme d'insertion du PML provenant du chromosome 15 dans le RARA situé sur le chromosome 17 et de ce fait on ne voit qu'un seul signal jaune sur le dérivé 17.