

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة سعد دحلب البليدة (1)

Université SAAD DAHLEB - Blida (1)



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie

Mémoire de fin d'études

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV

Filière : Sciences Biologiques

Option : Biologie moléculaire et cellulaire

Thème

L'intérêt de transcrit *BCR-Abl* dans la prise en charge
des patients ayant une leucémie aigue
lymphoblastique

Présenté par :

soutenu le : 16 / 07/ 2023

KADRI HOURIA Manel

OTHMANI MARABOUT Malek

Devant le jury :

Dr. HARKET S.

MCA / USDB1

Président

Dr. AISSANI R.

MCB / USDB1

Examinatrice

Dr. HAMEL H.

MCA/ LCC-BLIDA

Promotrice

Dr. MED BELKEBIR N.

Assistante en Biochimie / EHS

Co-Promotrice

Année universitaire : 2022/2023

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

En second lieu, Nous remercions Pr bouchedoub pour l'autorisation de stage de notre PFE

Nous tenons à remercier notre Co-promotrice Mme Mohammed Belkebir Nor el houda pour sa disponibilité, ses conseils, ses Encouragements et son assistance moral Durant toute la période du travail.

Nos remerciements s'adressent également à notre encadreur Mme Hamel H pour ses précieux conseils et son aide.

Nos remerciements vont également aux membres du jury Mme la Présidente Dr Harket S et Mme l'examinatrice Aissani R, pour l'intérêt Qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et De l'enrichir par leurs propositions.

Nous remercions particulièrement et profondément tout le personnel de Service d'hématologie d'hôpital Frantz-fanon Blida spécialement Mme Lamraoui, Mme Rekab, Mr Mazeroub, la biologiste Bahria Bouchra, Résidant Mr Chahine et aussi la résidente de l'unité de contrôle et Mme Menacer.

Nous remercions particulièrement notre chef d'option Mme Saadi Leila et Notre professeur Mr Benyahia pour ses encouragements.

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

MERCI !

الى ملاكي في الحياة ومعنى التفاني ومن كان دعائها سر في نجاحي امي الحبيبة مصدر تشجيعي.

الى حبيبي ابي الذي علمني الحلم ولم يقص اجنحتي وتعب من أجلي وكان دائما بجانبني ومصدر قوتي.

والى اختي ابنتي التي سهرت معي كل الليالي وهي تخفف عني لنفرح معا عند تخرجي احلام.

والى من تحلو به الحياة اخي عثمان الذي علمني حقا معنى الاخوة والامان.
والى روح عمي الراحل الذي مازال في قلبي وتمنيت ان يشاركني هذه اللحظة رحمه الله ولا ننسى باقي عائلتي من كانوا داعما وحافزا ولم ينسوني من صالح دعائهم حتى وصلت الى ما انا عليه وخاصة عمتي سعاد وعزيزتي اسراء وجارتي كنزة.
الى زميلتي التي تحدثت معي جميع الصعاب واجتهدنا معا لنجاح هذا العمل ملاك شكرا على كل شيء.

الى صديقة روعي مغتربة التي تفهمني دون كلام رغم مسافات والاقرب الى قلبي غنية.
الى صديقتي في المواقف وحبيبتي في البهجة الى روح المرحمة ورونق.
الى النجمة التي كنت استدل بها الطريق كلما ضاعت بي السبل عليمه
الى الصديقة التي ساعدتني كثيرا بكل سرور رزقك الله امانيك ياسمين والى كل من كان لهم أثر على حياتي والى كل من أحبهم قلبي ونسيهم قلبي.
وفي الاخير احمد الله على كل شيء وعلى نعمته والذي منحني القدرة على الوصول الى هذه اللحظة الحمد لله. وشكرا للذين كانوا حاضرين في هذا اليوم واشكر الاساتذة والدكاترة الذي ساعدوني تحقيق حلمي.

حورية منال.

لا تستطيع كل الحروف العثور على الكلمات الصحيحة, فكل الكلمات لا يمكنها التعبير عن امتناني و حبي و احترامي و تقديري.

و ايضا بكل بساطة اهدي هذه المذكرة الى : ابي حسين عثمانى مرابط سندي منذ عهد صغر و إلي أمي
مؤنسة روي و رفيقة دربي , لدعمهم لي في مختلف المراحل الدراسية و في الحياة اليومية .
رزقكم الله تعالى بصحة والسعادة والعمر المديد و ادام نعمتكم علي
إلي أخواتي: نهى، مريم , صبرينة , ياسمين رفيقاتي و اقرب الناس لقلبي.
والى صديقتي حورية التي تفانت في العمل و شاركتني في هاته المذكرة التي لامست روي.
ملاك عثمانى مرابط

Résumé

Parmi les patients atteints de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) 25 % des adultes sont atteints d'un sous-type de la maladie appelée LAL Ph positive et autre de Ph négative, qui se caractérise par translocations chromosomiques fréquentes entraîne la formation d'un gène de fusion BCR-ABL. Le suivi moléculaire des patients atteints de LAL Ph positive, est essentiel à la stratégie thérapeutique. Ce suivi moléculaire consiste en la mesure séquentielle (quantification) des niveaux de transcrits BCR-ABL par une des techniques de la biologie moléculaire la RTPCR. Dans cette étude portant sur 22 patients atteints de leucémie lymphoïde limite, nous avons évalué la détection du type de copie chez seulement 14 des 22 patients. le pourcentage le plus élevée c'est pour les patient avec un dépistage négatif (36%), et 6 patients dont ont pas pu détecter la mutation sur le sang périphérique. La mutation la plus fréquent dans leucémie aigue lymphoblastique est « m- BCR-ABL » avec (21%) suivie par la mutation « M-BCR-ABL » avec deux patient soit (14%). Deux patient qui présentent une double population « m-M-BCR-ABL » c'est le résultat de transformation de leucémie myéloïde chronique en LAL. Deux patient qui sont décédée avant la détection.

Mots clés : leucémie aigue lymphoblastique, RT-PCR, chromosome Philadelphie, Fish Transcrit BCR-ABL.

Abstract

Of patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL), 25% of adults have a subtype of the disease called Ph-positive and Ph-negative ALL, which is characterized by frequent chromosomal translocations resulting in the formation of a gene BCR-ABL fusion. Molecular monitoring of patients with Ph-positive ALL is essential to the therapeutic strategy. This molecular monitoring consists of the sequential measurement (quantification) of the levels of BCR-ABL transcripts using one of the molecular biology techniques, RTPCR. In this study of 22 patients with borderline lymphocytic leukemia, we evaluated copy type detection in only 14 of the 22 patients. The highest percentage being for patients with a negative screening (36%), and 6 patients whose peripheral blood could not detect the mutation. The most common mutation in acute lymphoblastic leukemia is “m-BCR-ABL” with (21%) followed by the “M-BCR-ABL” mutation with two patients (14%). m-M-BCR-ABL” is the result of transformation of chronic myeloid leukemia into ALL. Two patients who died before detection.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, RT-PCR, Philadelphia chromosome, Fish Transcript BCR-ABL.

ملخص

من بين المرضى الذين يعانون من سرطان الدم الليمفاوي الحاد، يعاني 25% من البالغين من أنواع فرعية من المرض تسمى PH (ALL) موجبة وسالبة PH ، والتي تتميز بانتقالات صبغية متكررة تؤدي إلى تكوين جين اندماج BCR-ABL. ابيضاض الدم الليمفاوي (ALL) هو عنصر مهم في استراتيجيات العلاج. تتضمن هذه المراقبة الجزيئية قياساً مستمرًا (تقديرًا كميًا) لمستويات نص BCR-ABL باستخدام RT-PCR، إحدى تقنيات البيولوجيا الجزيئية. في هذه الدراسة التي أجريت على 22 مريضًا مصابين بسرطان الدم الليمفاوي الحاد، قمنا بتقييم اكتشاف نوع النسخ في 14 مريضًا فقط من أصل 22 مريضًا، كانت أعلى نسبة منهم مرضى سلبين للشاشة (36%) ، و 6 مرضى بطفرات غير قابلة للكشف في الدم المحيطي. الطفرة الأكثر شيوعًا في ابيضاض الدم الليمفاوي الحاد كانت "m-BCR-ABL" (21%) ، تليها الطفرة "M-BCR-ABL" في مريضين (14%) "M-M-BCR-ABL". (كان نتيجة تحول ابيضاض الدم الليمفاوي المزمن إلى ALL ، وتوفي مريضان قبل الاختبار.

الكلمات المفتاحية: ابيضاض الدم الليمفاوي الحاد، RT-PCR، كروموسوم فيلادلفيا، FISH، نسخة BCR-ABL.

Figure 01 : Représente le déroulement Hématopoïèse.....	4
Figure 02 : Le chromosome Philadelphie.....	7
Figure 03 : l'emplacement des points cassure de Gène ABL.....	8
Figure 04: Représentation schématique de la protéine ABL.....	10
Figure 05 : Gène BCR et les différents points de cassure	10
Figure 06 : structure de gène Bcr-Abl	10
Figure 07: Translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22	11
Figure 08: Schéma des caractéristiques structurales des variantes Bcr-Abl	12
Figure 09 : la protéine de fusion BCR-ABL.....	13
Figure 10 : voie de signalisation de transcrit BCR-ABL.....	13
Figure 11 : les étapes de la PCR kinase.....	18
Figure 12: Mode d'action des inhibiteurs de la tyrosine	20
Figure 13: la répartition des patients selon leur sexe.....	32
Figure 14 : Histogramme montrant la répartition des patients selon l'age.....	33
Figure 15 : Répartition des patients selon le nombre de globules blancs.....	34
Figure 16: Répartition des patients selon le taux des plaquettes.....	35
Figure 17 : Répartition des patients selon les blastes sanguins.....	36
Figure 18 : répartitions des patients selon les blastes de la moelle.....	36
Figure 19: un frottis sanguin des patients observes par microscope optique a G100X.....	37
Figure 20 : un frottis médullaire d'un patients observé par microscope optique a G100X.....	37
Figure 21 : répartitions des patients selon le résultat de CMF.....	38
Figure 22 : Répartition des patients LALB selon les résultats de Fish.....	39
Figure 23 : les différent types des transcrit BCR-ABL.....	41

Tableau 01 : classification des LAL B par rapport au stade maturation.....	6
Tableau 02 : représente la répartition des patients selon le taux d'hémoglobine.....	35
Tableau 03 : représente la répartition des patients selon le taux des plaquettes.....	36
Tableau 04 : Répartition des patients avec LALB selon le CMF.....	39
Tableau 05 : Répartition des patients LALB selon les résultats de Fish.....	40
Tableau 06 : comparaison entre BCR –ABL et l'Age.....	43
Tableau 07: comparaison entre BCR –ABL et L'hémogramme.....	43

ABL	Gène Abelson.
ADN	Acide désoxyribonucléique.
ARN	Acide ribonucléique.
BCR	Break point cluster région.
CAC	Centre anticancer
CD	Cluster de différenciation.
CMF	Cytométrie en flux.
CSH	Cellules souche hématopoïétique.
CFU-L	cellules hématopoiétiques progénitrices.
CFU-GEMM	Colony forming unit, granulocyte, érythrocytes, monocytes, mégacaryocyte
EDTA	Ethylènediaminetétraacétique.
FAB	Franco-Américano-Britannique.
FISH	Fluorescent in situ hybridation.
FS	Frotti sanguin.
GCSH	Greffe des cellules souche hématopoïétique.
GB	Globule blanc.
GFCH	Groupe Français de cytogénétique hématologique.
GR	Globule rouge.
HB	Hémoglobine.
ITK	Inhibiteur de tyrosine kinase.
LA	Leucémie aigüe.
LAL	Leucémie aigue lymphoblastique.
LAL B	Leucémie aigue lymphoblastique de type B.
LAL Ph1	Leucémie aigue lymphoblastique à chromosome Philadelphie.
LAM	Leucémie aigue myéloblastique.
LMC	Leucémie myéloïde chronique.
M-BCR	Major break point cluster.

m-BCR	Minor break point cluster.
MGG	May-Grunwald Giemsa.
MO	Moelle osseuse.
NFS	Formule de numération sanguine.
OMS	Organisation mondiale de la santé.
RC	Rémission complète.
RT-PCR	Reverse transcriptase polymérase chaîne réaction.

Résumé	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction.....	1
Recherche bibliographique	
I. Hématopoïèse	3
I.1. Définition	3
I.2. Les compartiments de l'hématopoïèse.....	4
I.3. La régulation de l'hématopoïèse.....	4
II. les hémopathies malignes	5
III. Leucémie aigüe lymphoblastique B:	5
III.1 Définition LALB.....	5
III.2 Facteurs de risque	6
III.3 Physiopathologie.....	7
IV. transcrit <i>BCR-abl</i>	7
IV.1 Le gène <i>BCR-Abl</i>	8
IV.2 Les cible de <i>BCR-Abl</i>	13
IV.3Voie de signalisation activée par la protéine <i>BCR-Abl</i>	14
V. Diagnostic de la leucémie aiguë.....	14
V.1Diagnostic clinique	14
V.2Diagnostic biologique	15
V.3Diagnostic cytologique	16
V.4Diagnostic moléculaire	16
VI. La Technique PCR (Polymerase Chain Reaction®).....	16
VII. Traitement ciblé	19
Matériels et méthodes	
I. Type de l'étude.....	21
II. Population d'étude.....	21
III. Matériel	21
III.1.Matériel non biologique.....	21
III.2. Matériel biologique.....	23
VI.Méthodes.....	23
VI.1. La technique RT-PCR	23
IV. Etude statistique.....	29

Résultats et discussion	
I. Les caractéristiques de la population.....	30
I.1. Répartition des patients selon sexe.....	30
II. Répartition des LAL selon le statut hématologique.....	32
III. Les résultats des frottis.....	34
IV. Les caractéristiques cytologique	36
IV.1.Répartition selon les résultats de CMF.....	36
IV.2.Répartition des patients selon les résultats de Fish.....	37
V. Répartition des patients selon les résultats de biologie moléculaires.....	38
VI.1. Comparaison entre résultats de <i>BCR-Abl</i> et l'âge	39
VI.2. La comparaison entre les résultats de <i>BCR-Abl</i> et l'hémogramme.....	40
Conclusion	42
Liste des References	43
Annexes	

Introduction

La leucémie aigüe est une hémopathie maligne résultant de l'expansion clonale d'un précurseur hématopoïétique bloqué à un stade précoce de la maturation, appelé blaste **(Doumbia M et al. 2016) (Wäsch R et al. 2011)**. Elles sont classées selon la rapidité d'évolution de la maladie (aiguë ou chronique) et selon les cellules souches de la moelle osseuse à partir desquelles elle se développe (myéloïdes ou lymphoïdes) **(Vardiman JW, et al. 2009)**.

Parmi les différents types de la leucémie on a choisi d'étudier la leucémie aigüe Lymphoblastique type B chez l'adulte :

La leucémie aigüe lymphoblastique (LAL) est une tumeur résultant de la prolifération clonale de lymphocytes immatures. Caractérisées par la prolifération clonale et incontrôlée de cellules précurseurs Hématopoïétiques, bloqués dans leur différenciation au niveau de la moelle osseuse (MO) **(Doumbia M et al. 2016)** avec passage dans le sang périphérique et secondairement dans d'autres tissus (ganglions, rate, foie...) **(Deschler B et al, 2015)**.

Les LAL type B est la plus fréquente, représentant environ 85 % des cas des leucémies chez les enfants et 75 % chez les adultes. L'incidence de la LAL chez l'adulte est de 1 à 2/100 000 habitants, Ainsi, la maladie a une distribution bimodale, avec un premier pic chez les enfants entre 2 et 5 ans et un second pic chez les adultes vers l'âge de 50 ans. **(Belot A et al. 2008) (Inaba H et al. 2013)**.

De nombreuses anomalies génétiques sont décrites dans la LAL B, la fréquence est la translocation (12;21) fréquente chez l'enfant et translocation t(9;22) (q34;q11) transpose un segment de l'oncogène ABL (Abelson) situé en position 9q34, à la place d'un segment du gène BCR (break point cluster région) situé en position 22q11, créant et exprimant un transcrit chimérique BCR-ABL (chromosome Philadelphie (Phi) **(Mullighan et al, 2007)**.

Ce transcrit génère 3 protéines différentes selon le point de cassure sur le gène BCR survenant en M-BCR (BcrAblp210) Le réarrangement qui se produit dans le point de cassure majeur (M-BCR) générant la protéine de fusion p210, pour Major Break point Cluster, ou en m-BCR (Bcr-Ablp190) pour minor Break point Cluster, ou en μ -BCR (Bcr-Ablp230) **(Pane et al. 2002 ; Kurzrock et al. 2003 ; Score et al. 2010)**.

La recherche s'intéresse de plus en plus à l'apport des critères de l'immunophénotypage et de la cytogénétique des blastes médullaires dans le diagnostic et surtout dans le choix du traitement de cette pathologie. Dans ce sens, ce travail qui a été réalisé et qui porte sur 22

Patients, parmi les 22 patients ont à choisi que 14 ayant bénéficié d'une RT-PCR réaliser sur des prélèvements de sang périphérique et la moelle osseuse et dont objectifs :

L'intérêt de transcrire BCR_ABL par la technique RT-PCR

- Décrire les caractéristiques biologiques et cytogénétiques des LAL B et les différentes méthodes de diagnostic et de traitement.
- Confirmer l'analyse de LAL B chez l'adulte par l'analyse RT - PCR.

***Recherche
bibliographique***

Historique :

La naissance de la leucémie entre dans la terminologie médicale française en 1856 et vers 1850 les premières descriptions de cas de la nouvelle maladie chez des patients apparaissent simultanément et indépendamment en France, en Allemagne et en Angleterre. **(FRITZ Avril et al.2008).**

Au début des années 1990, il y avait de nombreux problèmes avec le système de classification existant pour la leucémie et le lymphome. L'avènement des techniques d'immunophénotypage et de la biologie moléculaire a montré que les différentes classes étaient en fait hétérogènes, et aujourd'hui les leucémies sont désormais classées comme cancers, et des cancers ont été décrits pour la première fois. Dans les temps anciens, la maladie peut avoir précédé ses caractéristiques déjà existantes. **(C. Debru et al, 1996) (Mauvieux.L et al , 2005-2006).**

La classification EGIL a standardisé les critères de définition des leucémies myéloïdes, lymphoïdes de lignée T ou B et biphénotypique dans le Chapitre 1 : Informations générales sur les leucémies aiguës, et a proposé en 2001 une classification combinant les critères des classifications FAB et EGIL en y ajoutant données cytogénétiques et moléculaires **(Weinberg O et al.2009) (Brit Haemat et al.1976).**

I. Hématopoïèse :

I.1.Définition :

L'hématopoïèse un processus implique dans la production toutes les cellules sanguines ainsi que la transformation de cellules souches. Ces cellules souches ont la particularité de pouvoir restaurer la fonctionnalité de la moelle osseuse en cas d'agression physique ou chimique. **(Delhommeau et al.2016).**

La genèse de cellules sanguines découle d'une cellule souche totipotente commune qui peut se différencier soit en voie myéloïde, soit en voie lymphoïde **(Féger et al.2017) (Figure 01).**

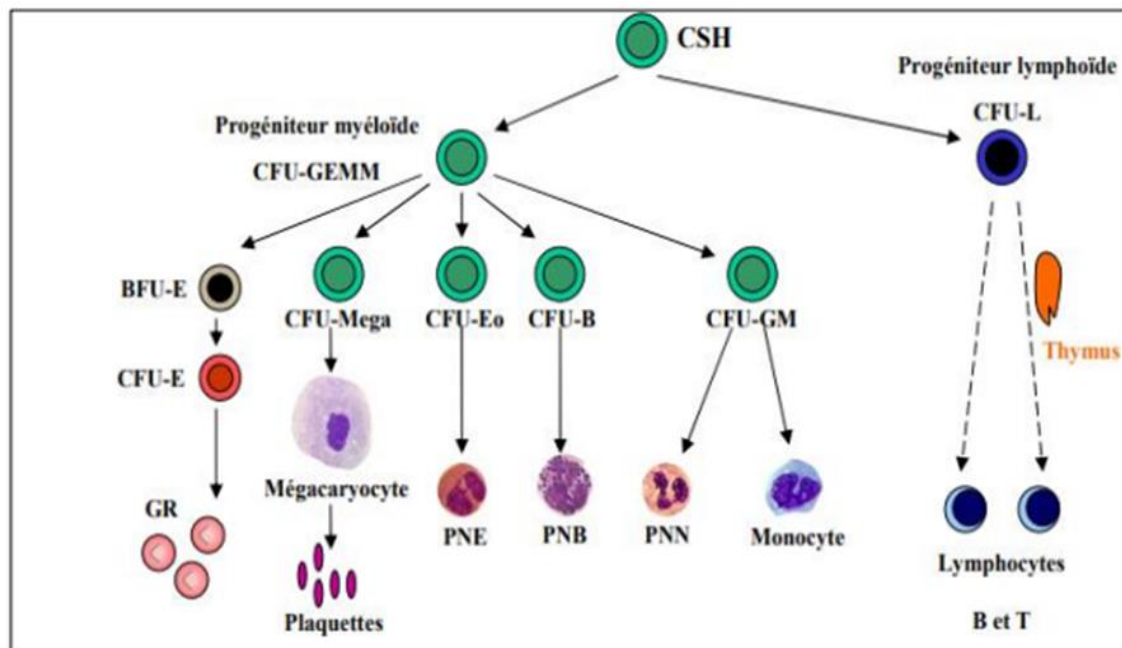


Figure 01 : Hématopoïèse (Féger *et al.*2017)

I.2. Les compartiments de l'hématopoïèse :

La cascade hématopoïétique comprend quatre compartiments représentant des stades de différenciations séquentiels, tel que : (Binet *et al.*2011 ; Azzouz *et al.*2017).

- **Cellules souches hématopoïétiques**
- **Les progénitures**
- **Les précurseurs**
- **Les cellules matures** par exemple : **Les globules rouges, Les globules blancs, Les plaquettes.**

I.3. La régulation de l'hématopoïèse :

L'hématopoïèse est régulée par des facteurs externes et internes qui contribuent à guider la différenciation progressive des cellules souches vers les diverses lignées sanguines. (Delhommeau *et al.* 2016), C'est une voie essentielle pour maintenir un nombre stable de cellules sanguines malgré les variations de consommation liées à des circonstances physiopathologiques. Cette régulation est effectuée par des mécanismes cellulaires et humoraux, tels que les facteurs de croissance et les interleukines, qui peuvent activer ou inhiber l'hématopoïèse (Féger *et al.*2017).

II. Les Hémopathies malignes :

L'ensemble des cancers se développés au dépens du tissu hématopoïétique et des ganglions lymphatiques, c'est une pathologie sanguine pouvant toucher les globules rouges, les globules blancs et/ou les plaquettes (**Diallo1et al.2005**).

Parmi celles-ci, on retrouve les leucémies et les lymphomes qui sont des cancers des ganglions ou de la rate, mais aussi les syndromes myélodysplasiques et myéloprolifératif, qui représentent respectivement un défaut et un excès de synthèse des cellules sanguines (**Diallo1et al.2005**).

III. Leucémie aigue lymphoblastique B:

III.1 Définition Leucémie aigue lymphoblastique B:

La leucémie aigue lymphoblastique de phénotype B est un cancer de sang et de la MO, définie par l'accumulation dans MO de cellules immatures de la lignée lymphoïde bloquées au stade, lymphoblastique (**Mauvieux L et al,2006**).

III.2 Epidémiologie :

La Leucémie Aigue Lymphoblastique appelée (LAL) touche plus les enfants à savoir 80% des leucémie chez l'enfant contrairement aux adultes 20%, on dénombre entre 1 à 3 cas sur 100.000 personnes annuellement, c'est la plus fréquente des pathologies cancéreuses qui touchent les enfants âgés entre 3 ans et 4 ans (**bories et al.2018**).

En Algérie, LAL représente 20% des cas de leucémie aiguë de l'adulte avec incidence restée stable à 0.32 par rapport aux derniers résultats de l'enquête national effectuée de 1994 à 2010 qui a aussi montré que LAL touche le sujets jeunes et masculine plus que féminine (**Zouaoui etal.2016**).

Tableau 01 : La classification des LAL B par rapport au stade maturation : (immun phénotypique (valensi,2003)) et selon OMS (Bell,2010).

Le type	CD19, CD22 (s/c), cCD79a	Diagnostic	Particularité
B-I (Pro-B)	+	N'exprime aucun autre marqueur	/
B-II (B commune ou Pré Pré-B)	+	Exprime le CD 10	55%à60% des LAL Les formes les plus fréquentes

B-III (Pré-B)	+	CD10 CD19 CD20 Chaine cytoplasmique, exprime une IgM intracytoplasmique.	75% des LAL Présentation non spécifique mauvais pronostic en cas de translocation associé.
B-IV (Mature B) burkitt	+	CD19 CD 22 exprime une chaîne légère κ ou λ de surface.	$\leq 5\%$ des LAL Evolution rapide, syndrome tumoral et lyse tumoral bon pronostic .

III.3 Facteurs de risque :

✓ Facteurs génétique :

- La LAL est particulièrement fréquente chez l'enfant atteint de trisomie 21 ainsi que dans d'autres maladies génétiques : ataxie télangiectasie, syndrome de Bloom (Michel G *et al.*, 2008).

✓ Facteurs environnementaux :

- L'exposition à des radiations ionisantes augmente le risque de leucémie aigüe lymphoïde et myéloïde, et la radiothérapie.
- Médicaments cytotoxiques, agents Alkylants (Deschler *et* Lubbert, 2006).

III.4 Physiopathologie :

Leucémie aigüe est une transformation maligne d'une cellule devenue incapable de se différencier en réponse aux stimuli physiologique normaux. Cette même cellule se multiplie indéfiniment donnant naissance à un clone leucémique, ce qui engendre une accumulation de cellules blastiques dans la MO, entraînant une défaillance de l'hématopoïèse normale (Henri *etal.* 2017).

Les LAL se caractérisent dans un premier temps par l'apparition de mutations somatiques à l'intérieur d'une cellule de la lignée des progénitures lymphoïdes médullaires, Cette cellule peut subir une transformation maligne et peut générer une population monoclonale de précurseurs lymphoïdes immatures (lymphoblastes pré-B). Cette population de précurseurs lymphoïdes va progressivement envahir la moelle osseuse et entraîner une insuffisance médullaire en perturbant l'hématopoïèse poly clonale normale. (Mullighan *et al.* 2007).

IV. Transcrit *BCR-Abl* :

Le gène de fusion *BCR-Abl*, aussi appelé gène de Philadelphie ou chromosome Ph1, est le résultat d'une translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22.

La translocation $t(9;22)(q34;q11)$ transpose un segment de l'oncogène *Abl* (Abelson) situé en position 9q34, à la place d'un segment du gène *BCR* (break point cluster région) situé en position 22q11, créant et l'exprimée le transcrit chimérique *BCR-Abl*.

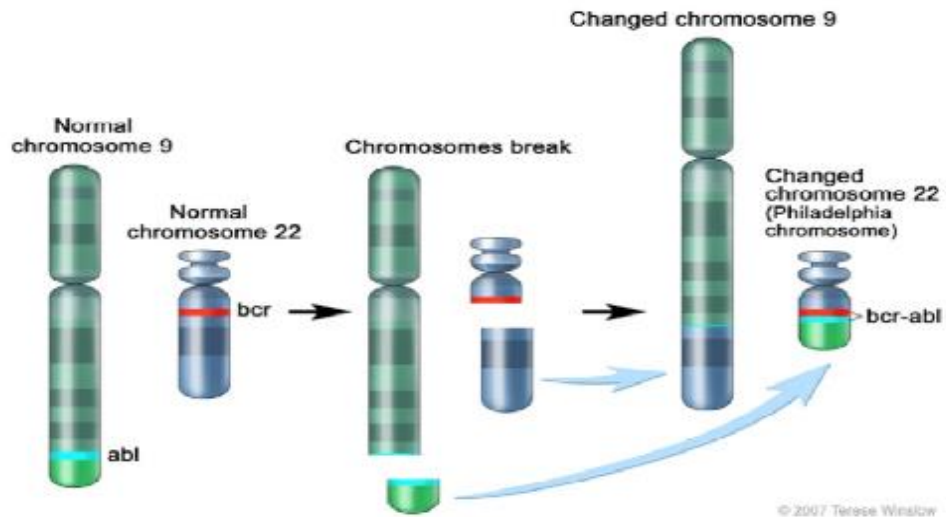


Figure 02: Le chromosome Philadelphie(Kuzrock *et al.*2003)

Le point de cassure sur le chromosome 9 est localisé en 9q34 au niveau de l'oncogène abelson (*Abl*) par contre au chromosome 22, le point de cassure se situe au niveau du gène *BCR* (breakpoint cluster région) du bras long, soit en 22q11.

A. **Gène *Abl* :**

Le gène humain *Abl* composé de 11 exons, comprend un site alternatif d'initiation de la transcription entre les exons 1a et 1b,. Il peut être transcrit en deux ARNm (de 6 ou 7kb) différents et donc la protéine *Abl* présente sous deux iso formes différentes aux niveaux de leur extrémité N terminale. Ce gène code normalement pour une tyrosine kinase cytoplasmique de 145 kDa impliquée dans la transduction du signal prolifératif.

Les cassures du gène *Abl1* (au sein du réarrangement *BCR-Abl* surviennent au niveau une région variable de 300 kb : en amont de l'exon 1b, en aval de l'exon 1a ou entre ces deux exons alternatifs, cas le plus fréquent.

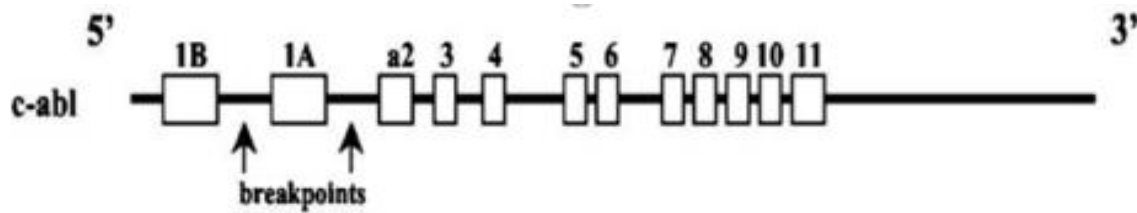


Figure 03: l'emplacement des deux points de cassure (breakpoints) de Gène *Abl*(Herlet.2010).

La protéine *Abl* est une protéine à activité tyrosine kinase (TK) ayant un rôle essentiel dans le fonctionnement cellulaire avec des fonctions à la fois nucléaires et cytoplasmiques.

L'activité TK est assurée par le domaine SH1 où sont localisés le site de liaison à l'ATP, site majeur d'autophosphorylation, et le domaine catalytique phosphotransférase.

La partie N-terminale de la protéine participe à la machinerie cellulaire de transmission du signal et il existe une zone variable de myristoylation permettant à la protéine *Abl* myristoylée, de type 1B, de se fixer à la membrane. La partie C-terminale contient des domaines lui permettant de se fixer aux filaments d'actine (donc au cytosquelette) et d'ADN, ainsi qu'une séquence de localisation nucléaire.

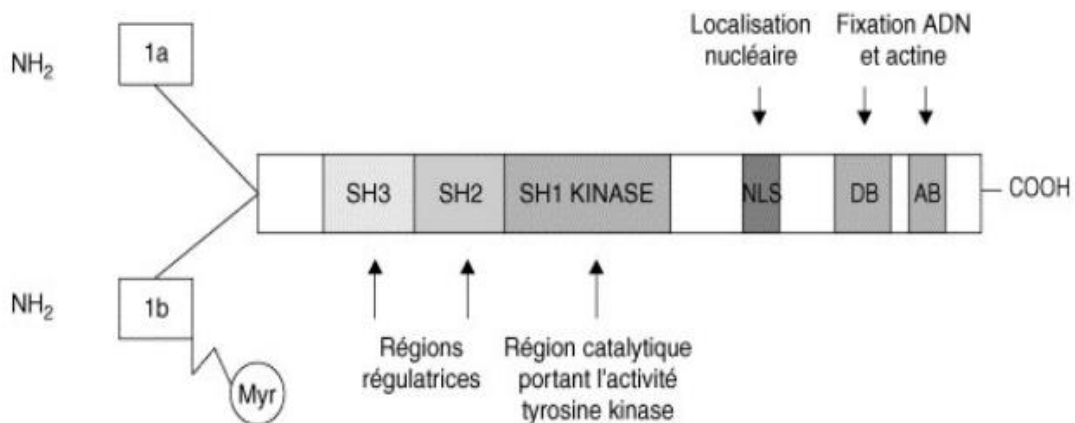


Figure 04 : Représentation schématique de la protéine *Abl*(Herlet.2010).

B. Gène BCR :

Il a été découvert en clonant la région appelée M-BCR (major break point cluster région) où sont situés la majorité des points de cassures.

Il s'étend sur 135kb et comprend 23 exons. Il est transcrit en ARNm de 4,5 ou 6,7kb qui codent une protéine cytoplasmique de 160kb d'expression ubiquitaire.

The diagram illustrates the BCR-ABL signaling pathway. At the top, the BCR-ABL fusion protein is shown with a Coiled-coil domain and a Kinase domain. The Kinase domain is activated by BCR, leading to the phosphorylation of CBL and CRK. This activates the PI3K/AKT pathway, which leads to the phosphorylation of BAD and the activation of mTOR. The PI3K/AKT pathway also leads to the phosphorylation of FOXO3, which is then exported from the nucleus. The RAS/RAF/MEK1/2/MAPK pathway leads to the activation of MYC and the inhibition of apoptosis by BCL-XL. The diagram also shows the involvement of Mitochondrion in the signaling pathway.

IV.3 Voie de signalisation activée par la protéine *BCR-Abl* :

A. Voie RAS :

D'abord, il y'a autophosphorylation du résidu tyrosine situé en position 177 de BCR qui permet la fixation de la protéine adaptatrice Grb2 par l'intermédiaire d'un domaine SH2 de Grb2. Cela mène à l'activation de la cascade des MAPK avec une voie de signalisation RAF/MEK/ERK et JNK. L'activation de la voie a comme conséquences, l'expression anormalement élevée de gènes indispensables pour la prolifération cellulaire, tels que c-Fos (un facteur de transcription induisant la réplication de l'ADN), c-Myc (nécessaire pour la transcription de l'ARN ribosomale), ou c-Jun. Et l'activation de la synthèse protéique en favorisant la traduction au niveau des ribosomes (**Score *et al.*2010**) (**Herlet.2010**).

B. Voie JAK/STAT :

C'est une des voies anti-apoptotiques utilise cette voie essentiellement de STAT 5, de STAT 1 et 6 et de la voie PI3K/AKT pour influencer sur des gènes favorisant le développement de cellules cancéreuses en réponse à la stimulation par une cytokine, JAK est phosphorylée. Ceci provoque le rapprochement de STAT qui est phosphorylée et dimérise à son tour, et rentre dans le noyau et joue le rôle d'un facteur de transcription et inhibe l'apoptose (**cilloni *et al.*2012**).

SYMPTOMATOLOGIE :

Les symptômes les plus courants sont dus à des troubles hématopoïétiques : Anémie (qui se présenter sous forme de fatigue, faiblesse, pâleur, malaise, Thrombocytopénie ; douleurs osseuses (**Passweg *et al.* 2008**) (**Hiddemann W *et al.*2016**).

V.Diagnostic de la leucémie aiguë :

V.1 DIAGNOSTIC CLINIQUE :

- 1) syndrome d'anémie
- 2) syndrome hémorragique plaquettaire
- 3) Signes tumoraux sont fréquents dans les LAL et certaines formes de LAM (**Hamouda.2020**), défini par des adénopathies de petites ou de grandes tailles, une splénomégalie, Douleur osseuse, une hypertrophie testiculaire....

V.2 DIAGNOSTICS BIOLOGIQUES :

Les diagnostics biologiques couramment utilisés comprennent le NFS, la myélographie, la biopsie osseuse et la ponction lombaire (LP)... etc.

L'hémogramme et Myélogramme :

- L'hémogramme est le premier examen biologique utilisé pour dépister, Cet examen consiste à compter le nombre et à observer la forme des cellules sanguines (**Haferlach T et al.2005**) (**Rose-Inman H et al.2017**), par contre Le myélogramme permet d'étudier la moelle osseuse où sont formés les éléments précurseurs du sang (**Mullighan et al .2009**)(**Poplack DG et al.1999**).

Immunophénotypage :

- L'immunophénotypage sur moelle osseuse, Il consiste à mettre en évidence l'expression variable par les cellules leucémiques d'antigènes membranaire ou cytoplasmique regroupés en « CD », caractérisation se fait par la technique de cytométrie en flux (CMF) (**Béné MC et al.2011**) (**Van Lochem E et al.2004**).

V.3Diagnostic cytologique:

Consiste a utilisé les lames de myélogramme pour voir l'aspect cytologique des blastes associer à des techniques cytochimies et cytogénétiques seront également utilisées pour identifier et typer les patients atteints de LAL (**Turgeon ML et al.2020**).

V.4 Diagnostic moléculaire :

- Le diagnostic moléculaire a un rôle important dans la détection de certaines mutations, et les gènes codant pour les facteurs de transcription qui régulent le développement lymphoïde sont le plus souvent mutés, en particulier dans LAL B, (**Patel et al.2012**).
- La PCR pourra mettre en évidence des anomalies qui restent non détectées dans le caryotype et le FISH, et La présence de ces anomalies confirme le caractère clonal de la prolifération pas d'autres mutations (**Lainey É et al. 2017**).

VI.LA Technique PCR (Polymerase Chain Reaction®) :

La PCR ou amplification en chaîne par polymérase, est une technique d'amplification enzymatique qui réalise un grand nombre de copies identiques d'un segment d'ADN. Ainsi, il est possible d'obtenir des centaines de microgrammes d'ADN à partir de gènes en moins d'un pictogramme, soit des milliards d'amplifications.

L'une des propriétés de toutes les ADN polymérases est qu'elles ne peuvent synthétiser que des brins complémentaires à partir d'une amorce. Cette propriété complique le processus de réplication de la cellule et est essentielle pour la stabilité de la cellule. De plus, la taille des fragments amplifiés est toujours beaucoup plus petite que l'ADN de départ, de sorte qu'ils peuvent être facilement séparés même par des techniques de base.

Une **PCR classique** se décompose en trois étapes :

- dénaturation : les deux brins d'ADN sont séparés par chauffage (95 °C),
- hybridation : en abaissant la température (50-70 °C), des amorces constituées de courts fragments d'ADN viennent s'hybrider sur les brins d'ADN.
- élongation : une enzyme polymérase, la Taq polymérase, complète la synthèse du brin d'ADN à partir de l'amorce grâce aux oligonucléotides présents dans le milieu de réaction.

Un thermocycleur, permet d'automatiser la réaction PCR en programmant des cycles consécutifs de montée et de baisse de température.

RT-PCR :

La RT-PCR permet de faire une PCR à partir d'ARN qui est rétro transcrit par une transcriptase inverse en ADN complémentaire (ADNc). Ce dernier est utilisé pour réaliser une PCR.

RT-PCR ou PCR en temps réel :

La PCR en temps réel est une révolution dans l'utilisation de la PCR, cette technique consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle (temps réel) grâce à un marqueur fluorescent. Elle permet par son principe de faire des mesures quantitatives (expliquant l'appellation PCR quantitative, qPCR) mais elle nécessite des thermocycleurs particuliers.

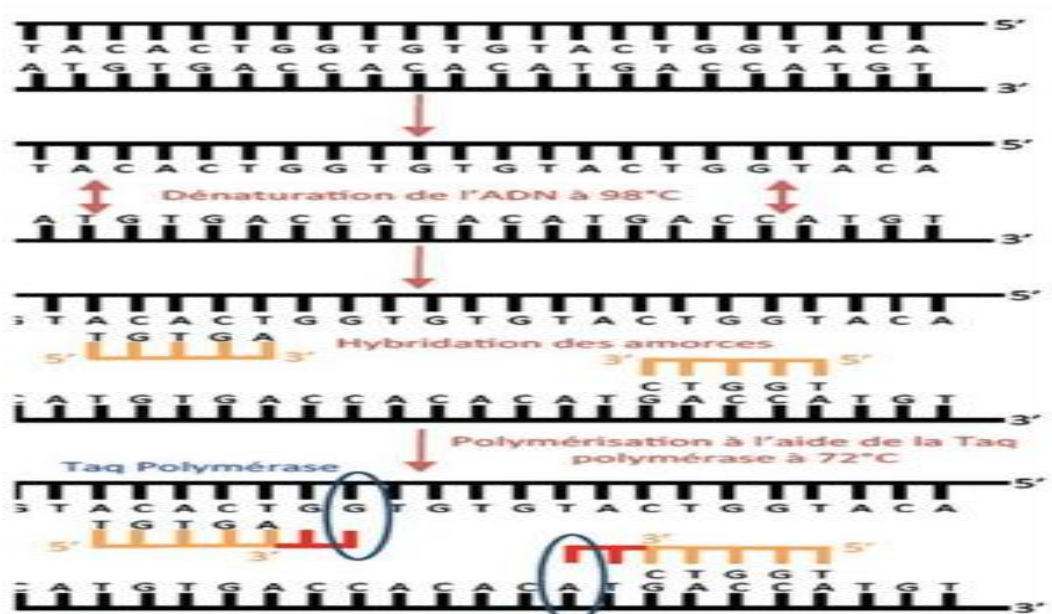


Figure 07: les étapes de la PCR.

VI. Le traitement de leucémie aigue lymphoblastique :

Le traitement LAL est différent d'un patient à un autre par rapport à l'âge et l'évaluation de la maladie. La chimiothérapie est le traitement principal de la leucémie lymphoblastique aiguë (LLA). (Kebriaei P *et al* .2019) et la greffe de cellules souches hématopoïétiques (GCSH) et aussi l'immunothérapie.

1. Traitement ciblé :

Le traitement ciblé a recours à des médicaments pour cibler des molécules spécifiques, comme des protéines, présentes à la surface ou à l'intérieur des cellules cancéreuses. (Goekbuget N *et al*.2013).

4.1 Les inhibiteurs des tyrosines kinases :

Parmi les thérapies ciblées indiquées en cas de LAL Phi+ les inhibiteurs de tyrosines kinases ITK qui est administré en parallèle avec la chimiothérapie pour favoriser la rémission après la phase d'induction du traitement, qui bloquent les substances chimiques appelées tyrosine kinases. Le blocage de ce processus entraîne le blocage de la division cellulaire et peut réduire le risque de récurrence du cancer, tel que l'Imatinib.

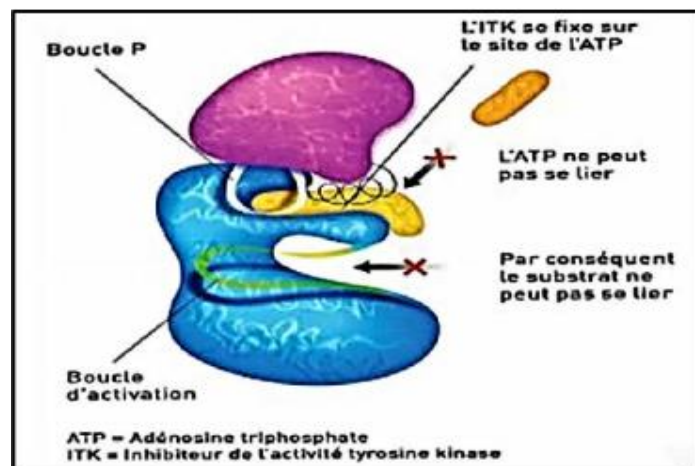


Figure 12 : Mode d'action des inhibiteurs de la tyrosine kinase (Dine *et al*.2013).

Matériel et Méthode

Notre étude est faite sur 22 patients, parmi ces patients ont fait la RT-PCR que chez 14 patients ainsi qu'il y a 45.45% positif et 54.54% patient non déterminé. Selon la disponibilité du réactif en a contrôlé que 2 patients l'un autre eux resté toujours positive et le second est négative.

L'objectif :

Les objectifs principaux de notre étude :

- Notre objectif était d'évaluer la technique de transcription inverse et de réaction en chaîne par polymérase (RT-PCR) pour la détection de transcrire BCR_ABL, en plus de FNS, CMF, Fish, cytogénétique.
- Étudier et comparer les résultats de la PCR réalisés sur deux types de prélèvement différents (une ponction de moelle et sang périphérique) pour résoudre les difficultés de validation technique.
- Décrire l'intérêt de transcrit BCR-ABL par la RT-PCR, et les caractéristiques biologique et cytogénétique des LALB et les différentes méthodes de diagnostic et de traitement.

Matériel et méthode :

Type de l'étude :

Il s'agissait d'une étude rétrospective descriptive (traitement de dossiers médicaux) et analytique des prélèvements sanguins (l'hémogramme et RT-PCR) menée sur une période allant de 2022 à 2023. Notre travail a été réalisé au niveau du Laboratoire central de l'ESH de lutte contre le cancer Blida.

Population d'étude :

Il s'agit d'une étude réalisée sur des adultes atteints de leucémies aiguës lymphoblastiques type B (LAL B). Ces patients sont hospitalisés au niveau du service d'hématologie du centre de lutte contre le cancer de Blida, on a recruté tous les patients ayant bénéficié d'une RT-PCR pour la recherche du gène BCR-ABL entre juillet 2022 et juillet 2023.

Le facteur inclusion :

- Tout adulte dont l'âge était supérieur ou égal à 23 ans (≥ 23 ans) atteint de LAL a été inclus dans l'étude.

Le facteur exclusion :

- Patients âgés de MOINS de 20 ans.
- Les leucémies aiguës myéloblastiques

Matériel:

Non biologique:

Les automates :

Thermocycler, centrifugeuse, Vortex, Spectrophotométrie, L'automate de FNS (Sysmex XT-4000i)

Les autres : micropipette ; eppindof (microtube) ; Portoir ; eau distillée blouse et les gants.

Matériel Biologique :

Le Prélèvement et Recueil des données :

Le Prélèvement fait au niveau du Laboratoire centrale de l'ESH de lutte contre le cancer Blida, Nous recoller les échantillons prélevés au niveau de sang périphérique et de la moelle Osseuses sur des tube contient de EDTA ; puis en fait FNS et le frottis sanguin et un extraction le jour même de prélèvement chaque patient dispose d'une a un fiche de renseignements dont on réalise le recueil des données (identité du patient ; données cliniques; données biologiques ; données cytologiques ; diagnostic suspecté).

Méthode :

Les informations nécessaires de notre étude tel que : l'hémogramme et myélogramme, La cytométrie en flux, cytogénétique (Fish) ainsi que le diagnostic suspecté ; Nous avons prenez les informations d'après les dossiers des malades.

La technique RT-PCR :

Revers Transcription :

Principe de la RT-PCR : La RT-PCR est une technique qui permet de faire une PCR (réaction en chaîne par polymérase) à partir d'un échantillon d'ARN. L'ARN est tout d'abord rétro transcrit grâce à une enzyme appelée transcriptase inverse, qui permet la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc). Ce dernier est ensuite utilisé pour réaliser une PCR.

Mode opératoire :

Volume final à préparer est de 20ul

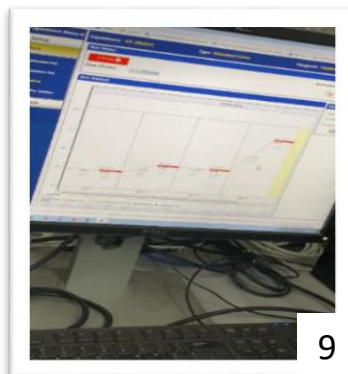
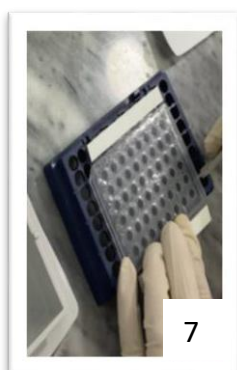
- 1) Laisser les composants du kit décongeler sur la glace
- 2) Prépare the RT master mix dans un bain de glace selon le protocole ci-dessous.

Composition (Without RNase Inhibitor)	Volume
RT Buffer	2.0ul
dNTP Mix (100 mM)	0.8ul
RT Random Primers	2.0ul
Multi Scribe™ Reverse Transcriptase	1.0ul
Nuclease-free H ₂ O	4.2ul
Total per réaction	10.0ul

- 3) Placer le master mix 2X RT sur de la glace et mélanger doucement.
- 4) Mettre 10 L de 2X RT master mix dans chaque puits
- 5) Puis ajouter 10 ML de RNA des patients dans chaque puits
- 6) Serrer les puits avec un film adhésif
- 7) Bien mélanger afin d'éliminer d'éventuelles bulles d'air
- 8) Placer la plaque dans le thermocycler
- 9) Régler le Template selon le schéma :
- 10) Placer le master mix 2X RT sur de la glace et mélanger doucement.
- 11) Mettre 10 L de 2X RT master mix dans chaque puits
- 12) Puis ajouter 10 ML de RNA des patients dans chaque puits
- 13) Serrer les puits avec un film adhésif
- 14) Bien mélanger afin d'éliminer d'éventuelles bulles d'air
- 15) Placer la plaque dans le thermo cycler
- 16) Régler le Template selon le schéma :

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

- 17) Conservation de L'ADN complémentaire pendant 4 heures dans un temps



Étude statistique :

L'analyse statistique a été réalisée par l'Excel et SPSS version 21. En utilisant l'analyse descriptive puis les comparaisons des moyennes pour établir la relation entre les différentes variables qualitatives.

Résultat
et
Discussion

I. La caractéristique de la population :

Notre étude a été réalisée au niveau de laboratoire centrale de centre anti cancer de Blida (CAC) et porte sur 14 patient analysés par RT-PCR sur 22 patients sur l'ensemble de l'étude.

La population étudiée est représenté par les patients atteints de la leucémie aigue lymphoblastique chez l'adulte.

I.1. Répartition des patients selon leur sexe :

Dans notre série, les 22 patients au moment du diagnostic se répartissent en 12 femmes avec pourcentage (55%) et 10 hommes avec pourcentage de (45%). Soit un sexe ratio H/F de 0.83 avec léger prédominance féminine.

La répartition des cas selon leur sexe donne les résultats présentés dans la figure :

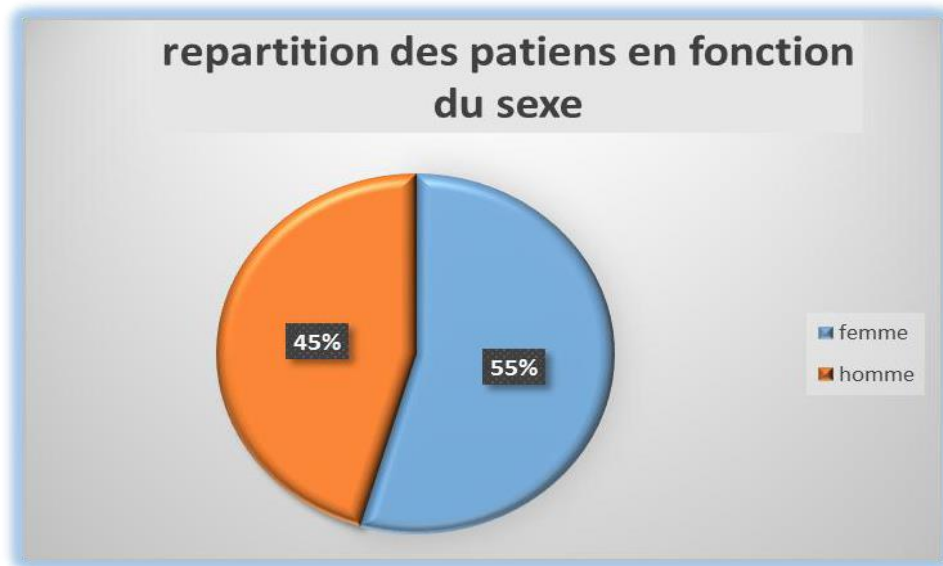


Figure 13: la répartition des patients selon leur sexe

Ces résultats sont cohérents avec les résultats observés dans une étude similaire de **(Shalini L et al.2023)** qui a trouvé une prédominance féminine avec 22femme (84,6%) et 4homme (15,4%) et sexe ratio (0,18).

Par contre, les résultats sont diamétralement opposés à ceux de l'étude de **(Zouaoui Z et al. JAN2010-Déc2013)** qui à trouver une légère prédominance masculine avec (207 femme et 341homme et sexe ratio de 1,6).

Puis une autre étude menée par **(S Hamdiet et al.2009-2013)** qui montre une prédominance masculine (579 hommes et 381 femmes avec sexe ratio 1,51).

I.2. La répartition des patients selon l'âge :

L'âge de nos patients au moment du diagnostic allait de 22 à 70 ans, avec un âge moyen de 45,71 ans $\pm$ 15,17.

L'âge de nos patients au moment du diagnostic allait de 22 à 70 ans, avec un âge moyen de 45,71 ans $\pm$ 15,17.

Nous avons effectué une répartition des malades selon 4 tranches d'âge, La répartition des patients selon les tranches d'âge montrent que :

- L'incidence la plus élevée s'observe entre : 40-60 ans avec 11 cas observés soit 50% suivie par la tranche d'âge entre 20 et 40 ans avec 7 cas soit 32%.
- L'incidence la plus faible s'observe entre 20-40ans, avec 4 cas observés soit 18%, et aucuns résultats 0% s'observe entre 0-20 ans.

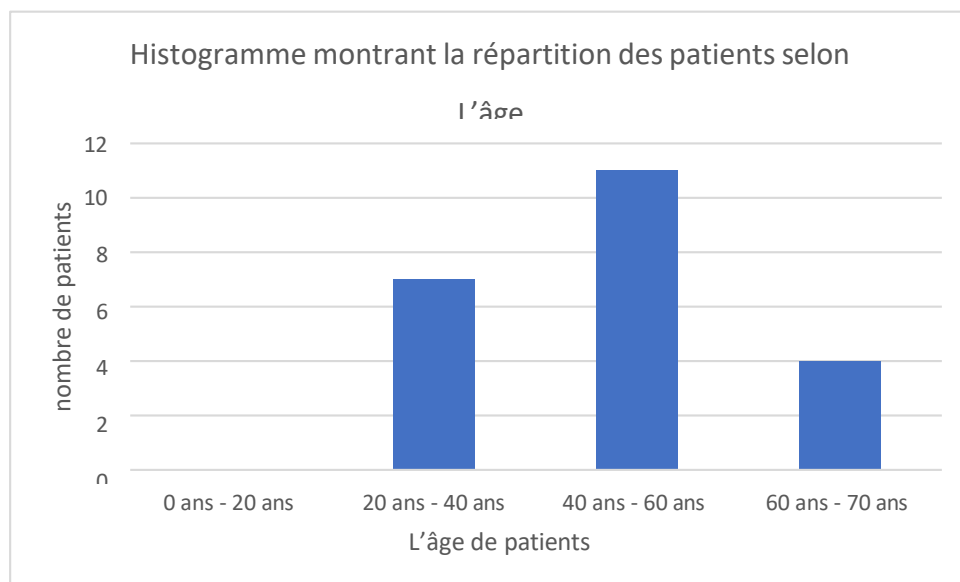


Figure 14: Histogramme montrant la répartition des patients selon l'âge

Les patients ont été répartis par tranches d'âge d'un intervalle de 20ans selon la règle de **Sturge et Yule**. Les résultats montrent que les tranches d'âge les plus touchées sont celles comprises entre [40-60ans] et [20-40 ans] avec des fréquences de 50%et 32%respectivement.

La tranche d'âge la moins touchée est [60-70ans] ans avec une fréquence de 18%. Nos résultats montrent une certaine similitude avec celle de (**S.Hamdi et al. 2009-2013**) avec un pic de fréquence dans la tranche d'âge 50 – 59 ans. Par contre une étude faite par (**Nirina et al. 2015**) à l'hôpital de Madagascar, montre que la tranche d'âge la plus touchée est de [0 -15 ans] ans

alors que là moins touchée est celle de [46-55 ans] (Nirina *et al.* 2015).

II. Répartition des LAL selon le statut hématologique :

a. Globule blanc :

Le taux de globule blanc a varié de $1,5$ à $405 \times 10^3/\text{UL}$ avec une moyenne de $83,82 \pm 112,85$, la majeure partie des patients (64%) représente une hyperleucocytose, alors que 27% avaient un taux de GB normal et 9% seulement avaient une leucopénie.

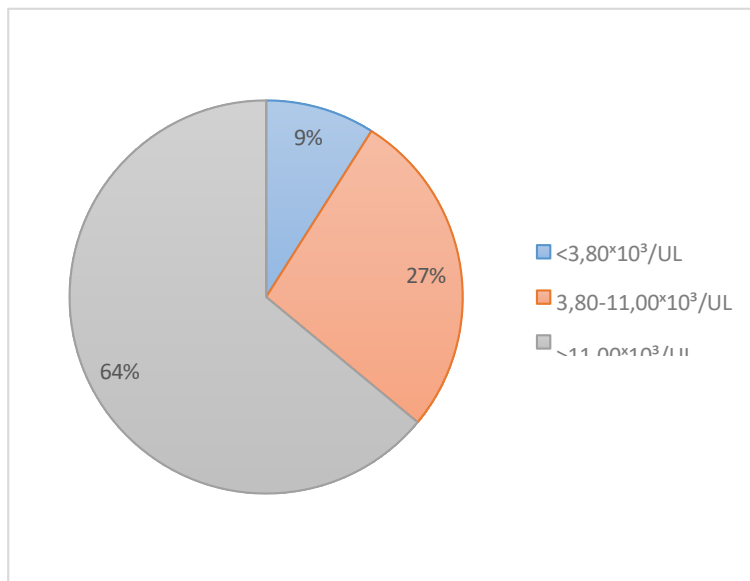


Figure 15 : Répartition des patients selon le nombre de globules blancs.

Notre étude montre, une hyperleucocytose observée chez tous les patients avec LALB, nos résultats sont semblables avec ceux de l'étude tunisienne (Nejia Braham *et al.* 2011), qui à montrer que tous les patients présentent un taux de GB élevée (hyperleucocytose) .

b. Hémoglobine :

Le taux d'hémoglobine varie entre 5,80 et 10,40g/dl, tous les patients de notre étude ont une anémie avec des taux d'Hg $<11,5\text{g/dl}$ (100%) avec une moyenne de la concentration d'Hg est de $8,44 \pm 1,43$.

Taux d'hémoglobine	Norme 11,5-16g/dl	Anémie <11,5g/dl	Polyglobulie >16g/dl
Population	0	22	0
Total %	0%	100%	0%

Tableau 02 : représente la répartition des patients selon le taux d'hémoglobine

Les patients sous LALB présenté un taux très faible d'hémoglobine ce qui indique la présence d'une anémie associé à une thrombopénie, notre étude concordent avec ceux de (Sophie *et al.* 2007)(Dambia *et al.*2016).

C.Les plaquettes :

Le taux de plaquettes a varié entre 12000 à 216000/UL, une thrombopénie est retrouvée chez 91% des patients, alors que 9% des sujets ont un taux de plaquettes normal.

Taux de plaquettes sanguines	Norme 120000-521000/UL	Thrombopénie <120000/UL	Thrombocytose >521000/UL
Population %	2	20	0
Total %	9%	91%	0%

Tableau 03: représente la répartition des patients selon le taux des plaquettes

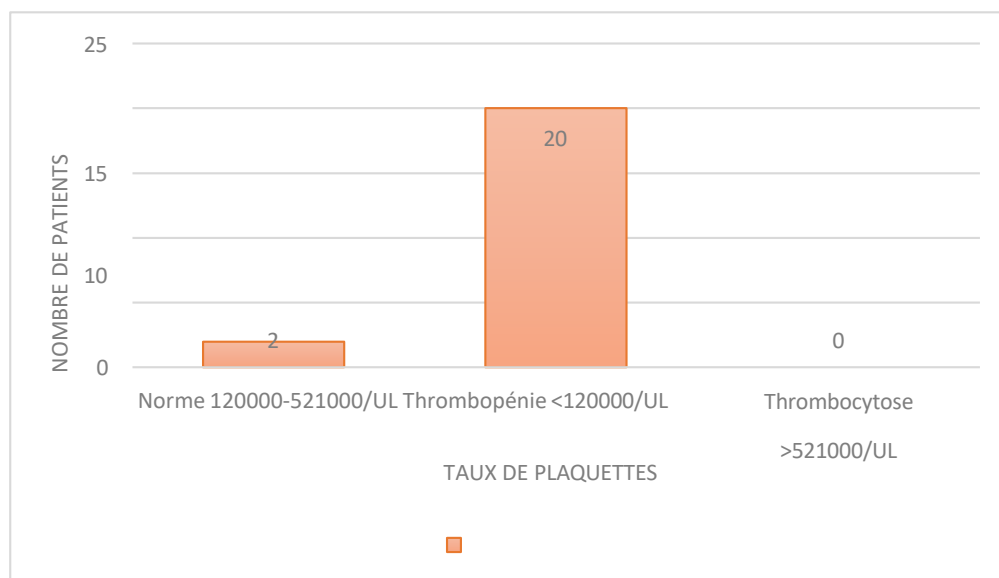


Figure 15: Répartition des patients selon le taux des plaquettes

Selon (Kassouf *et al.*2018) (Dambia *et al.*2016) Une thrombopénie présentée chez tous les malades cette diminution est due à l'envahissement de la moelle par lymphocytes B anormaux nos résultats sont semblables à ces études.

III. Les résultats des frottis sanguins et médullaires :

1/Frottis sanguin : les résultats sont des photos de frottis sanguin réalisé au niveau de laboratoire central de CAC observé par microscope optique.

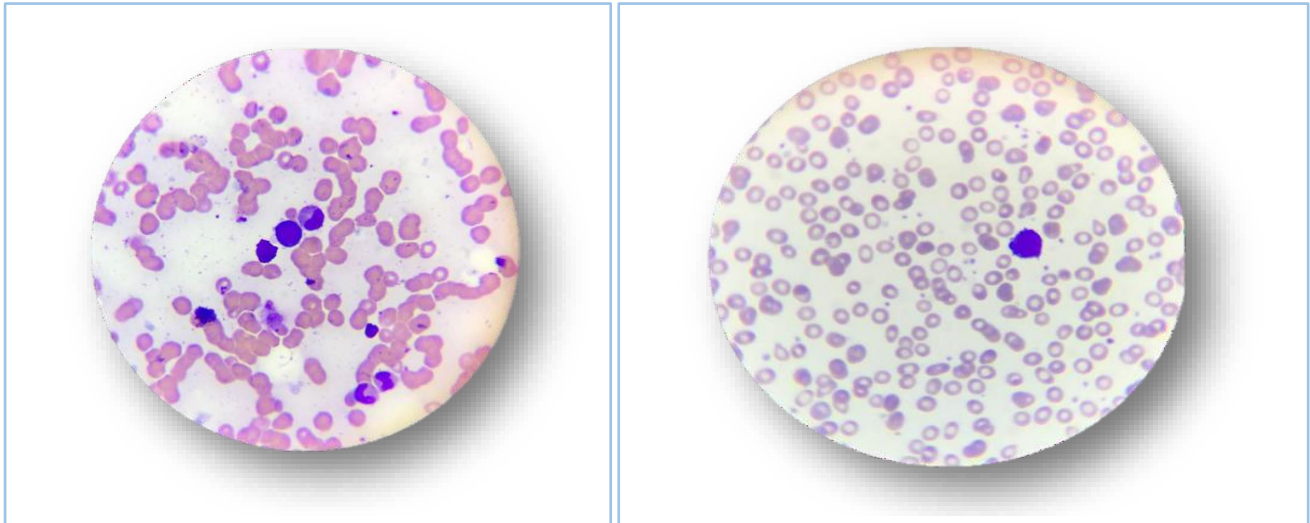


Figure18 A : figure représente des frottis sanguins des patients observés par microscope optique à G100X.

On a remarqué que le frottis A contient plusieurs cellules blastiques par rapport au deuxième frottis qui contient une seule cellule blastique, cela est dû aux différences individuelles entre les patients.

Blastes sanguin :

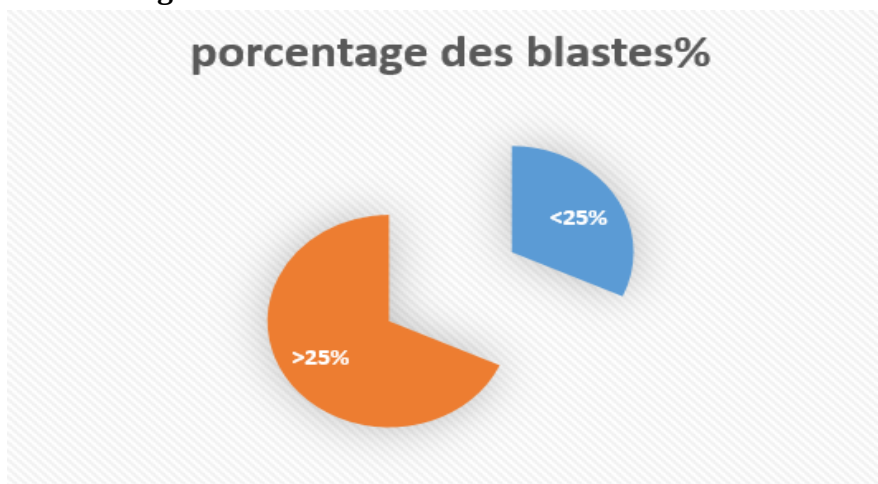


Figure 16: Répartition des patients selon les blastes sanguins.

D'après les résultats de **figure16** nous avons constaté qu'il y a une prédominance de patient avec un taux de blaste >25% (**Dambia et al.2016**).

2/ Frottis médullaire :

Les résultats sont des photos de frottis médullaire réalisé au niveau de laboratoire centrale de CAC observé par microscope optique selon les critères de FAB l'examen morphologique des frottis de moelle a permis de dénombrer le pourcentage des blastes et la classification de LAL(N Braham Jmili *et al.*2011).

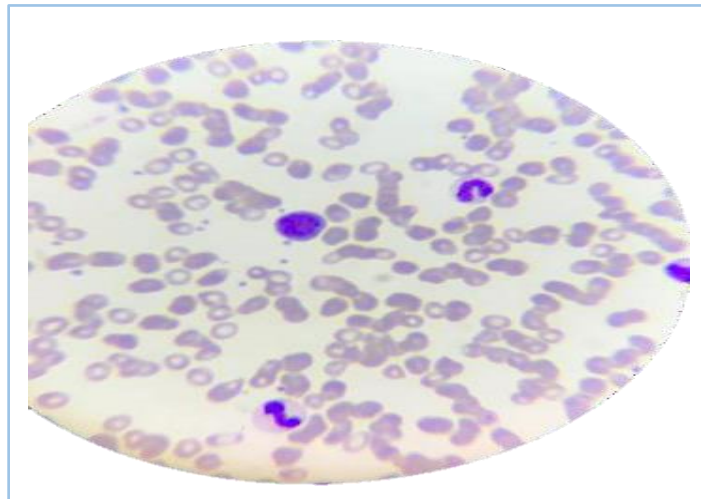


Figure 19B : figure représente un frottis médullaire d'un patient observé par microscope optique a G100X.

A. Blastes de la moelle osseuse :

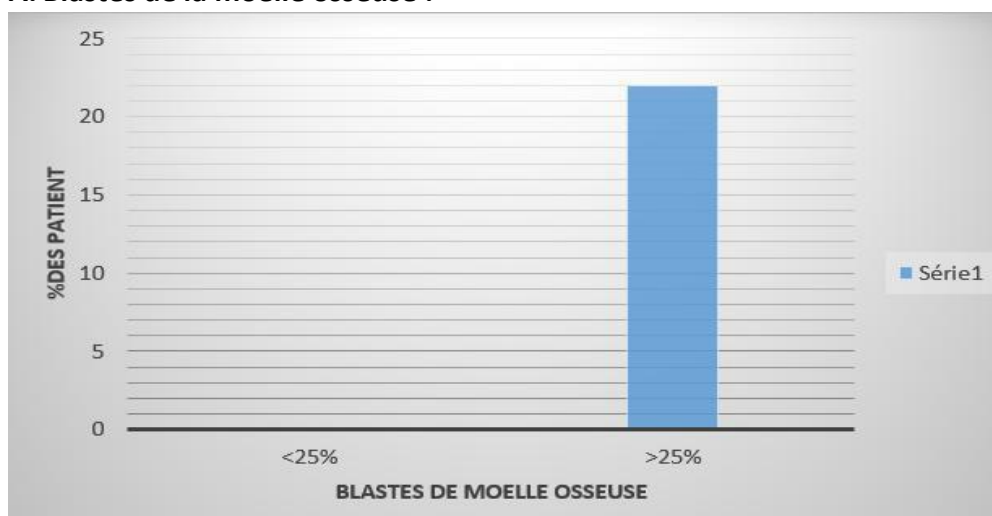


Figure17: répartitions des patients selon les blastes de la moelle.

Ont à remarque que le taux des cellules blastique chez tous les patients sont supérieur à 25%

ces résultats même de tel qui indiqué dans le littérature (**Dambia *et al.*2016**).

IV. Caractéristique cytogénétique :

IV.1.1 Résultat de la CMF :

Le diagnostic des types de LAL B est représenté dans le tableau, ci-dessous :

Tableau 4 : répartitions des patients selon les résultats de CMF

Type de LAL	LAL Pro B	LAL Prépré B	LAL Pré B	LAL B mature
Nombre de patient	5	14	2	1
Pourcentage	23%	64%	9%	5%

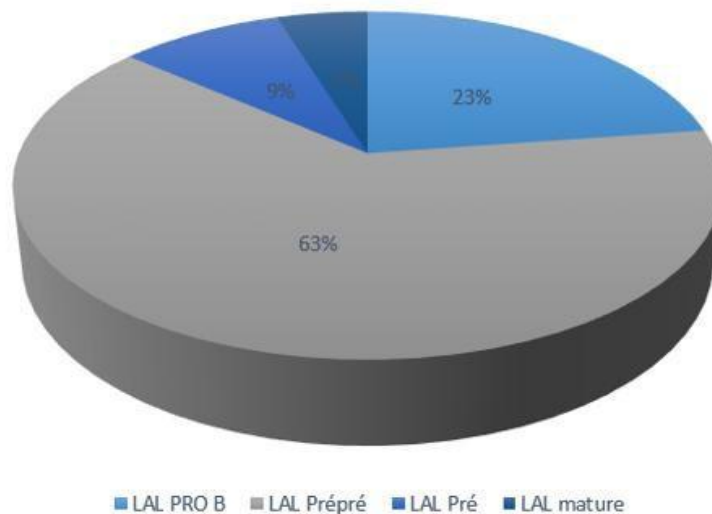


Figure 20: répartitions des patients selon les résultats de CMF .

On note que 64% des cas, on une LAL Prépré B. qui représente le pourcentage le plus élevée, suivie par les LAL Pro B avec 23% de la population, le pourcentage le plus faible (5%) est noté chez les LAL B mature.

D'autre part nous n'avons pas enregistré des cas de LAL pro B.

Ces résultats sont les même que celle de **Benjelloum S**, alors que celle **d'Oukid** de **2015** et celle du **Braham** de **2009** montre qu'il ya une prédominance de Pré B.

Nos répartitions des types de LAL sont similaires avec les répartitions trouvées dans le littérature avec prédominance de LAL Prépré B.

IV.2 Répartition des patients selon les résultats de Fish :

Ont observé 12 patients avec « Phi+ » et 10 autre avec « Phi-» comme présenté dans le tableau suivant :

	Phi+	Phi-
Nombre de patients	12	10
Moyenne	54,5	45,5

Tableau 08: représente la comparaison entre BCR-ABL et l'hémogramme.

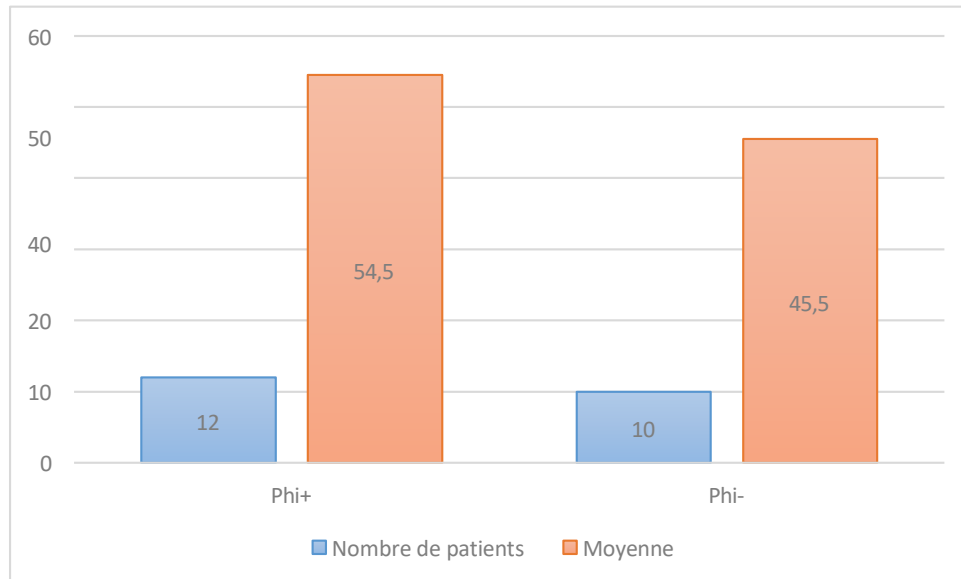


Figure 21: Répartition des patients LALB selon les résultats de Fish

Notre étude comprend 12 patients avec « Phi+ » et 10 autres avec « Phi - ».

Nos résultats montrent une certaine similitude avec celle de (C Preudhomme *et al.*1993) qui a trouvé 11 patients avec « Phi+ » et 2 autres avec « Phi- » dans une population de 39 patients, d'autre part dans l'étude faite en Italie de (G Specchia *et al.*1995) le nombre des patients avec Phi- est plus élevé que ceux de Phi+.

Remarque :

Permet nos patients deux ont une discordance entre les résultats de cytogénétique classique et la Fish avec absence du signal BCR-ABL par la technique de cytogénétique classique et présence du signal dans la Fish (Phi+). Cela est dû à la différence de résolution entre les deux techniques avec une résolution meilleure pour la Fish par rapport à la cytogénétique classique.

On a aussi pu diagnostiquer une LAL B chez un patient atteint de trisomie 21 qui a 24 ans, ce résultat est confirmé par les données bibliographiques sur les facteurs de risque génétiques de LAL B (Deschler *et* Lubbert.2006).

I. Répartition des patients selon les résultats de biologie moléculaires :

Nous avons effectué la technique RT-PCR sur sang périphérique pour 14 patient les résultats sont soit 45,45% positif et 54,54% Non déterminé.

Après des recherches approfondies nous avons trouvé que le problème des résultats non déterminer peut-être résolu par la réalisation de la technique sue un prélèvement de moelle osseuse et pas le sang périphérique (Pour les patients dont des résultats non déterminés on a réalisé un prélèvement de moelle et refaire la RT-PCR).

D'après la recommandation établie par le Groupe Français de cytogénétique hématologique (GFCH) l'examen de la moelle osseuse est toujours préférable à celui du sang périphérique (**Laurence Baranger et al 2004**) chez les patients atteint de LALB pour des résultats plus fiable.

Les résultats de la technique ont été résumés dans ce tableau :

Tableau 06 : représente les patients analysés par le sang périphérique au moment de diagnostic :

Résultats de RTPCR	Positif (+)	Non déterminé
Nombre des patients	5	6
Pourcentage	45,45%	54,54%

Les 3 patients ne restent non pas été envoyé au moment de diagnostic.

V. 1 Les résultats de la détection des types de transcrit *BCR-Abl* (mutation) :

La **figure 22** représente la détection des types de transcrit responsable de la mutation dans leucémie aigue lymphoblastique des patients avec RT-PCR, On a eu des résultats suivants :

- Deux patients (40%) on le transcrit « m- BCR-ABL ».
- Deux patient qui ont la mutation « M-BCR-ABL » (40%).
- Un patient qui a la double population « m-M-BCR-ABL ».

D'après l'étude de (**Bor-Sheng et al.2002**) il y'a une prédominance de transcrit **m-BCR-Abl** avec 20 patients suivie par transcrit M-BCR-ABL avec 12 patients, D'après le littérateur le transcrit m-BCR-ABL est plus fréquent chez les patients de LAL B.

On constate une discordance entre nos résultats et celle décrite dans la littérature cella est du très probablement à la taille réduite de notre échantillon.

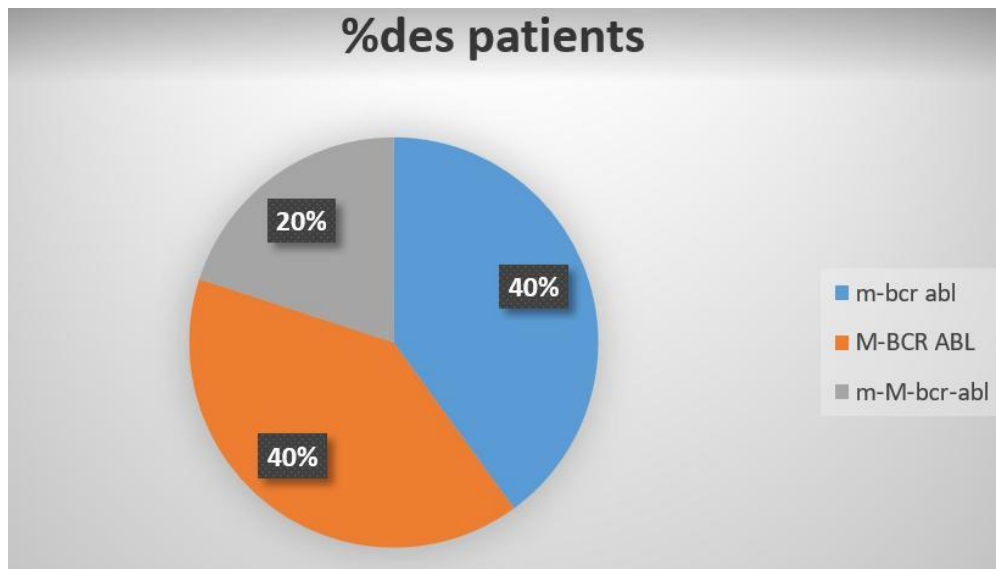


Figure 22 : représente les types des transcrit BCR-ABL

PCR de contrôle :

Selon la disponibilité de réactif on a pu contrôler que deux patients l'un d'autre eux est resté toujours positif et le seconde est négatif.

- Pour le patient dont la PCR revient négative ; cela est dû la réponse au traitement par inhibiteurs de tyrosine kinase.
- Le deuxième cas dont transcrits est un **M- BCR-Abl** et dont les résultats restent positifs on a réalisé une investigation afin d'avoir des explications pour la non repense au traitement et d'après l'interrogatoire il s'est avéré que c'est un malade non discipliner et qui n'a pris son traitement.

D'après (**Dine et al. 2013**) l'utilisation des thérapies ciblées tel que l'imatinib qui est un inhibiteur de tyrosines kinases **ITK** administré en parallèle avec la chimiothérapie pour favoriser la rémission après la phase d'induction du traitement, bloquent les substances chimiques appelées tyrosine kinases.

VI. Comparaison entre les résultats de BCR-ABL et les autres variables :

Etude comparative fait par l'logicielle de SPSS version 21.

1. La comparaison entre les résultats de *BCR-ABL* et l'âge :

1. La comparaison entre les résultats de *BCR-Abl* et l'âge :

Variable	BCR-ABL	Effectif	Moyenne	Ecart type	Valeur P
Age(ans)	BCR-ABL(+)	12	47,1	16,76	0.715
	BCR-ABL(-)	10	44,7	13,99	

Tableau 07 : représente la comparaison entre BCR-Abl et l'âge.

La moyenne d'âge des patients *BCR-Abl* (+) $47,1 \pm 16,76$ et la moyenne *BCR-Abl*(-) et $44,7 \pm 13,99$. Il ne semble pas avoir une différence significatifs dans la moyenne d'âge entre les deux groupe ($p=0.715$). Notre résultats sont similaire de l'étude de (G.Specchia et I.2009) qui n'a pas trouver des différence significatif dans la moyenne d'âge entre les patients *BCR-Abl*(+) et *BCR-Abl*(-).

La comparaison entre les résultats de BCR-ABL et l'hémogramme :

L'hémogramme	BCR-ABL	Effectif	Moyenne	Ecart type	Valeur P
GB	+	12	110.25	127,31	0.238
	-	10	52.1	88,63	
HG	+	12	8,25	1.67	0.518
	-	10	8,67	1.14	
PLQ	+	12	51333,33	45575.7	0.476
	-	10	68200	63185.4	

Tableau 08: représente la comparaison entre BCR-ABL et l'hémogramme.

D'après le **Tableau 08** de la comparaison entre BCR-ABL et l'hémogramme on note qu'il ya pas une différence significative entre les deux groupes dans les valeurs moyennes de l'HG, GB te PLQ avec des p value de 0.238 et 0.518 et 0.476 respectivement.

Conclusion

Notre étude repose sur la recherche de transcrits du gène de fusion BCR-Abl, qui joue un rôle important dans le diagnostic et le suivi de la LAL B et dans la sélection de thérapies ciblées chez les patients atteints de leucémie lymphoblastique aiguë. En outre, une surveillance régulière des niveaux de BCR-ABL chez les patients peut surveiller la progression de la maladie, évaluer l'efficacité du traitement et identifier les rechutes, et les techniques biomoléculaires de diagnostic et de surveillance du transcrit BCR-ABL s'avèrent utiles pour garantir de meilleurs soins aux patients atteints de LAL B.

En effet, de par sa sensibilité et sa standardisation, la RT-PCR constitue un outil puissant pour évaluer l'efficacité des traitements et donc surveiller la maladie résiduelle.

La RT-PCR peut mesurer de faibles niveaux de transcription de BCR-ABL. Cela améliore les opportunités de traitement et les taux de survie de ces patients. Pour obtenir des résultats plus fiables grâce à la technologie RT-PCR, il est préférable d'utiliser des échantillons de moelle osseuse provenant de patients atteints de LAL B, et l'évaluation moléculaire de la maladie résiduelle peut désormais mieux stratifier le risque de rechute et mieux déterminer le placement de l'allogreffe.

D'après nos résultats, nous concluons que :

- Dans notre étude, on a une prédominance féminine. Le transcrit le plus fréquent chez les patients de LAL B
- C'est le m-BCR ABL, aussi elle est fréquente chez les patients âgés que l'adolescent.
- Nous constatons une hyperleucocytose et aussi un taux très faible d'hémoglobine, et présence d'une anémie associée à une thrombopénie et dû à l'envahissement de la moelle osseuse par les lymphocytes B anormaux.

En conclusion, le pronostic favorable et le développement de nouvelles thérapies, notamment ciblées, ont permis des progrès en termes de survie et de qualité de vie dans le diagnostic et le traitement de la LAL B chez l'adulte.

Liste des Références

A: American Society of Clinical Oncology (ASCO) . Cancer.net: Leukemia- Acute Lymphocytic - ALL. 2017 : <https://www.cancer.net> :<https://www.cancer.org/> 2011.

American Cancer Society . Treating Acute Lymphocytic Leukemia (ALL. (2021)

B :

Belot A et al. Cancer incidence and mortality in France over the period 1980- 2005. Rev Epidemiol Sante Publique 2008;56:159-175.

Béné MC, Nebe T, Bettelheim P, Buldini B, Bumbea H, Kern W, et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. Leukemia. 2011;25(4):567-74.

Benosman Chahrazed , 2011thèse présenté a l'université BORDEAUX1 Contrôle de la dynamique de la leucémie myéloïde chronique par Imatinid .

Blackburn L., Bender S., Brown S., 2019.Seminars in Oncology Nursing , The Ohio State University Comprehensive Cancer Center ;Éditeur: Elsevier ,Vol 35, Issue 6

C Preudhomme 1, P Fenaux, J L Lal, P Lepelley , C Sartiaux, M Collyn-d'Hooghe , M Zandecki , A Cosson, J P Jouet, J.-P. Kerckaert, Philadelphie négative, BCR-ABL positive leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) chez 2 des 39 patients avec analyse cytogénétique et moléculaire combinée,juillet 1993;7(7):1054-7.

C Preudhomme¹, P Fenaux, J L Lal, P Lepelley , C Sartiaux, M Collynd'Hooghe , M Zandecki , A Cosson, J P Jouet, J.-P. Kerckaert,

C. Debru, P. Triadou. Histoire de la médecine et des sciences Les leucémies aiguës : une vue historique des classifications médecine/sciences 1996 ; 12 : 491-5.

C:

Cox MC, Maffei L, Buffolino S, Del Poeta G, Venditti A, Cantonetti M, Aronica G, . Aquilina P, Masi M, Amadori S. A comparative analysis of FISH, RT-PCR, and cytogenetics for the diagnosis of bcr-abl-positive leukemias. Am J Clin Pathol. 1998 Jan;109(1):24-31. doi: 10.1093/ajcp/109.1.24. PMID: 9426514.

Cancer Institute; 2021: <https://www.cancer.gov/>.

Chevallier P, Huguet F, Raffoux E, et al. Vincristine, dexamethasone and epratuzumab for older relapsed/refractory CD22+ B-acute lymphoblastic leukemia patients: a phase II study. Haematologica. 2015 Apr;100(4):e128-31.

Cilloni D., Saglio G., (2012) -Molecular pathways: BCR-ABL, Clin.Cancer. Res., 18(4): 930-937.

Costello R, Venton G , Colle J et al. Leucémies aiguës myéloïdes de l'adulte.

D:

Delhommeau F., 2016. Hématopoïèse et sa régulation normale, Elsevier Masson.Pp 16.

Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. Cancer : Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society. 2006;107(9):2099-107.

Doumbia M, Uwingabiye, J., Bissan, A., Rachid, R., Benkirane, S., & Masrar, A. . . Aspects épidémiologiques, cliniques, cytologiques et immunophénotypiques des leucémies aiguës chez les enfants : expérience du laboratoire d'hématologie du Centre Hospitalier Universitaire IBN Sina. Pan African Medical Journal, (2016).23(1).

Doumbia M, Uwingabiye, J., Bissan, A., Rachid, R., Benkirane, S., & Masrar, A. . . Aspects épidémiologiques, cliniques, cytologiques et immunophénotypiques des leucémies aiguës chez les enfants: expérience du laboratoire d'hématologie du Centre Hospitalier Universitaire IBN Sina. Pan African Medical Journal, (2016).23(1).

E: Engelhardt M. Précis d'hématologie et d'oncologie. Paris: Springer Paris;
EMC : 13- 018-G-50. 2018.

F:

Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. N Engl J Med 1999;341(3):164-72.

Farnault L, Boudjarane J, Baccini V, Costello R.Leucémies aiguës lymphoblastiques de l'adulte. Encycl Méd Chir Hématologie 2015;13-018-G-40.

Fondation ARC pour la recherche contre le cancer « Que sont les leucémies de l'adulte ? »
12/11/2018. Disponible sur le site de la Fondation ARC pour la recherche contre le cancer.
Dernier accès le 20/02/2019

French- American-British (FAB) cooperative group. Proposals for the classification of acute leukaemias. BritJ Haemat 1976; 33: 451-458.

G. Specchia, D. Mininni, A. Guerrasio, G. Palumbo, D. Pastore & V. Liso (1995) PH Positive Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults: Molecular and Clinical Studies, Leukemia & Lymphoma, 18:sup1, 37-42,

G:

Goekbuget N, Hoelzer D . Diagnosis and Treatment of adult acute lymphoblastic leukemia. Wiernik PH, Goldman JM, Dutcher JP & Kyle RA (eds.). Neoplastic Diseases of the Blood. 5th ed. Springer; 2013: 20: pp. 331-354

H:

Hamdi S. Etude des lymphomes non hodgkiniens del'adulte au CHU de Sétif : aspects épidémiologiques, cliniques, biologiques et évolutifs (Thèse de Doctorat en médecine). Juin 2005.

Harisson T., 1993. Principe de médecine interne. Médecine-sciences. Flammarion. 5ème éd. Paris.

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

Hiddemann W. Handbook of Acute Leukemia Adis. (2016);(1st ed. 2016 éd.).

I :

Iacobucci I, Mullighan CG. Genetic Basis of Acute Lymphoblastic Leukemia. J Clin Oncol. 2017 Mar 20;35(9):975-983. doi: 10.1200/JCO.2016.70.7836. Epub 2017 Feb 13. PMID: 28297628; PMCID: PMC5455679

Inaba H et al. Acute lymphoblastic leukaemia. Lancet 2013;381:1943-1955

Institut Curie « Cancers du sang : les leucémies chroniques » 26/03/2017. Disponible sur le site de l'Institut Curie. Dernier accès le 20/02/2019

Institut national du cancer « Les cancers en France », édition 2017, collection

J :

Jmili, N. B., Souguir, S., Yacoub, S., Khelif, A., & Kortas, M. (2009, September). Etude du profil antigénique des blastes au cours des leucémies aiguës lymphoblastiques: analyse de 152 cas par cytométrie en flux. In *Annales de Biologie Clinique* (Vol. 67, No. 5, pp. 543-551). Jean-claude Kaplan Marc delpech .biologie moléculaire et médecine.3édition,2007.

K:

Kebriaei P, Ravandi F, de Lima M, Champlin R. Management of acute leukemias. DeVita VT Jr., Lawrence TS, Rosenberg SA, eds. DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology. 11th ed. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer; 2019: 102:1742–1763.

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

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

. Kurzrock. R.. Shtalrid. M.. Romero. P. et ti/. (1987) A novel c-abl protein product in philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 325. 631-635

L :

La greffe Ezzone SA . Principles and techniques of blood and marrow transplantation. Yarbro, CH, Wujcki D, & Holmes Gobel B. (eds.). *Cancer Nursing: Principles and Practice*. 7th ed. Sudbury, MA: Jones and Bartlett; 2011: 18: pp. 504-512.

Lainey É. Diagnostic biologique des leucémies : exemple des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL). In : *Cancérologie de l'enfant*. 2017 ; 30.

Les Données, Avril 2018

Leukemia & Lymphoma Society of Canada. Blood and Marrow Stem Cell Transplant. <https://www.llscanada.org/>

Leukemia Treatment(PDQ®) – Patient Version. Bethesda, MD: National

M :

Mauvieux.L, Lessard.M, Lioure.B. Les leucémies aiguës de l'enfant ; *Maladies du sang et transfusion*. Université Louis Pasteur, Faculté de Médecine. Module 07 ; 2005-2006 ; DCEM3, module 17: 97-110.

Maynadié M, Troussard X. Épidémiologie des leucémies aiguës. *Revue francophone des laboratoires*. 2015;2015(471):29-33.

Michel G. Leucémie aiguë lymphoblastique de l'enfant et de l'adolescent : clinique et traitement. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris) Pédiatrie. 2008. 4-080-D-10.

Mullighan CG., Goorha S., Radtke I., Miller CB., Coustan-Smith E., Dalton JD., Girtman K., Mathew S., Ma J., Pounds SB., Su X., Pui CH., Relling MV., Evans WE., Shurtleff SA., Downing JR., (2007) - Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia, *Nature*, 446 (7137): 758-764.

Mullighan CG., Goorha S., Radtke I., Miller CB., Coustan-Smith E., Dalton JD., Girtman K., Mathew S., Ma J., Pounds SB., Su X., Pui CH., Relling MV., Evans WE., Shurtleff SA.,

Downing JR., (2007) - Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia, Nature, 446 (7137): 758-764.

N:

National Comprehensive Cancer Network . NCCN Guidelines for Patient: Acute Lymphoblastic Leukemia . 2021 : <https://www.nccn.org/>

Nejia Braham Jmili, Halima Sendi, Abderrahim Khelif. Leucémie aiguë lymphoblastique T PH1+ avec monocytose : à propos d'un cas. Annales de Biologie Clinique. 2011;69(4):473-475. doi:10.1684/abc.2011.0595.

Nirina MH, Rakotoarivelo Z, Ntoezara A, Rasolonjatovo A, RakotoAlson A, Rasamindrakotroka A. Épidémiologie et diagnostic des leucémies aiguës à l'hôpital Ravoahangy Andrianavalona Antananarivo Madagascar. Journal Africain du Cancer/African Journal of Cancer. 2015;7(4):186-9

Novartis Pharmaceuticals Canada Inc.. Product Monograph: https://pdf.hres.ca/dpd_pm/00059488.PD.Kymriah

P:

Pane F., Intrieri M., Quintarelli C., Izzo B., Muccioli GC., Salvatore F., (2002) - BCR/ABL genes and leukemic phenotype: from molecular mechanisms to clinical correlations, Oncogene, 21(56): 8652-8667.

PDQ® Adult Treatment Editorial Board. Adult Acute Lymphoblastic

PDQ® Adult Treatment Editorial Board. Adult Acute Lymphoblastic Leukemia

Treatment(PDQ®) – Patient Version. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2021:

<https://www.cancer.gov/>.

Pfizer Canada Inc.. Product Monograph: Besponsa.

https://pdf.hres.ca/dpd_pm/00044248.PDF.

Philadelphie négative, BCR-ABL positive

PoplackDG. Hoffman R, Benz EJ Jr, Shat Shattil SJ, Furie B and Cohen HJ til. Clinical manifestations of acute lymphoblastic leukaemia.Hematology basic principles and practice.New York : Churchill Livingstone 1999 : 776-784.

R :

Rea D, Cayuela JM. Leucémie myéloïde chronique. Encycl Méd Chir Hématologie 2014;13-011-B-10.

Reference patterns for age- related changes and disease- induced shifts. Cytometry Part B: Clinical Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology. 2004;60(1):1-13.

Reference:

Roberts KG, Li Y, Payne-Turner D, Harvey RC et al. Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med. 2014 Sep 11;371(11):1005-15

Rose-Inman H, Kuehl D. Acute leukemia. Hematology/Oncology Clinics. 2017;31(6):1011-28.

S.Hamdi Approche épidémiologique des Lymphomes Non-Hodgkiniens (LNH) extraganglionnaires en algérie (période 2009-2013).

S:

Score J., Calasanz M. J., Ottman O., Pane F., Yeh R. F., et al., (2010) - Analysis of genomic breakpoints in p190 and p210 BCR-ABL indicate distinct mechanisms of formation, Leukemia, 24(10): 1742-1750

Score J., Calasanz M. J., Ottman O., Pane F., Yeh R. F., et al., (2010) Analysis of genomic breakpoints in p190 and p210 BCR-ABL indicate distinct mechanisms of formation, Leukemia, 24(10): 1742-1750.

Score J., Calasanz M. J., Ottman O., Pane F., Yeh R. F., et al., (2010) - Analysis of genomic breakpoints in p190 and p210 BCR-ABL indicate distinct mechanisms of formation, Leukemia, 24(10): 1742-1750

Secker-Walker LM, Craig JM, Hawkins JM, Hoffbrand AV., (1991) - Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia in adults: age, distribution, BCR breakpoint and prognostic significance, Leukemia, 5(3): 196–199.

Secker-Walker LM, Craig JM, Hawkins JM, Hoffbrand AV., (1991) - Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia in adults: age, distribution, BCR breakpoint and prognostic significance, Leukemia, 5(3): 196–199.

Seiter K. Medscape Reference: Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) Treatment & Management. New York, NY: WebMD LLC; 2021: <https://www.medscape.com/>

Seiter K. Medscape Reference: Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL)(Treatment & Management. New York, NY: WebMD LLC; 2021: <https://www.medscape.com/>

Société Française d'Hématologie (SFH) « La leucémie myéloïde chronique» Information patient, Mars 2009.

Sorel N, Cayssials É, Brizard F, Chomel JC. Actualisation des traitements et du suivi moléculaire dans la prise en charge de la leucémie myéloïde

Stainy A. Les leucémies aiguës lymphoïdes. In : Sebahoun G, ed. Hématologie clinique et biologique. Paris : Arnette, 2005 : 277-84.

Sophie Bustany, Michelle Malet, Veronique Salaun, Dina Naguib, Ghislaine Plessis, Xavier Troussard. La leucémie peu différenciée (MO): aspect hématologique, immunophénotypique, cytogénétique, incidence pronostique expérience de Caen. *RevFrLab*. 2007;37(395):51–58.

T:

Turgeon ML. Clinical Hematology : Theory & Procedures, Enhanced Edition : Theory & Procedures. Jones & Bartlett Learning. (2020). Enhanced Edition (6e éd.).

V:

Van Lochem E, Van der Velden V, Wind H, Te Marvelde J, Westerdaal N, Van Dongen J. Immunophenotypic differentiation patterns of normal hematopoiesis in human bone marrow Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2009;114(5):937-51.

W:

Wäsch R, Digel W, Lübbert M. Leucémie aigue lymphoblastique In : Mertelsmann R, Engelhardt M. Précis d'hématologie et d'oncologie. Paris: Springer Paris; 2011.p. 413-427. Weinberg O, Seetharam M, Ren K And al. Clinical Characterization Of Acute Myeloid Leukemia With Myelodysplasia-Related Changes As Defined By The 2008 WHO Classification System. *Blood*. 2009 Feb 26; 113(9):1906-8.

Y :

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

Z: Z.Zouaoui.tude épidémiologique nationale des leucémies aiguës lymphoblastiques de l'adulte (LAL) : travail coopératif du groupe algérien d'étude des LAL sur une période de 04 ans (jan2010- dec 2013) .

Site de referene:

principe de Fns:

<https://www.sysmex-europe.com/products/products-detail/xt-4000i.html>

Guide of sysmex XT-4000i

<http://www.mcours.net/fra6/fatslfra6nap442.pdf>

<http://ephytia.inra.fr/fr/C/23575/Veg-Di-g-PCR>

Principe de thermocycleur:

Applied Biosystems StepOne™ Système de PCR en temps réel Guide des réactifs

http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_055743.pdf

Principe de la centrifugeuse :

Thermo percentage [-https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LED/manuals/50120987-e](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LED/manuals/50120987-e)

20 Scientific%20SL%2016_SL%2016R-fr.pdf

Thermo Scientific SL 16 / 16R Centrifugeur 'e d'emploi Venir nous rendre visite en ligne afin de vous enregistrer pour la garantie: the. sher.com/labwarranty 50120987-e 03 / 2020

Principe de vortex:

<https://store.microbiotech.dz/index.php/produit/agitateur-vortex-numerique-neuation/>

les reference de different kite utilise dans notre etude:

PureLink™ Total RNA Blood. Purification Kit.For isolating total RNA from whole blood.

Catalog no. K1560-01.Version B.4 April 2005.25-0756 43 Références bibliographiques.

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures. © 2015 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified. TaqMan is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc., used under permission and license. CO014515 0315

APPLIED BIOSYSTEMS. TaqMan® Gene Expression Assays. Part Number 4333458 Rev. N11/2010.

Annexes



Thermo cycler

Le système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™ (système StepOne™) s'appuie sur le principe de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

Il utilise des réactifs PCR basés sur le principe de la fluorescence pour assurer :

La détection quantitative des séquences cible d'acide nucléique (cibles) par une Analyse en temps réel.

Les automates :

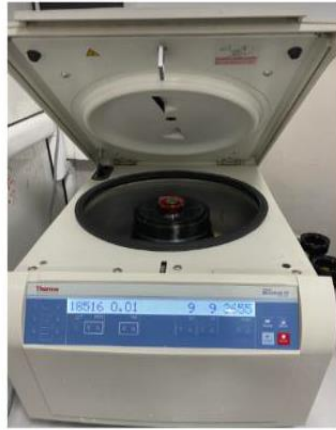


Thermo cycler

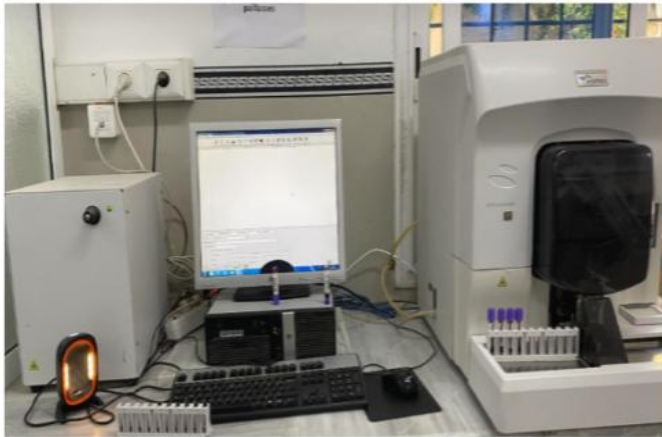
Le système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™ (système StepOne™) s'appuie sur le principe de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

Il utilise des réactifs PCR basés sur le principe de la fluorescence pour assurer :

La détection quantitative des séquences cible d'acide nucléique (cibles) par une Analyse en temps réel.



**Centrifugeuse
Thermo Scientific
SL16/16R**



L'automate de FNS (Symex XT-4000i) :

Le sysmex XT-4000i utilise la technique de fluorescence cytométrique et la technologie hydrodynamique centrée. Cette technique est très Sensible aux constituants du sang, pour quantifier les éléments figurés du sang ainsi que les fluides d'organisme et permet aussi de distinguer des globules rouges, les globules blancs et les plaquettes



Spectrophotométrie

Spectrométrie et spectrophotométrie sont des méthodes d'analyse grâce auxquelles on parvient à déterminer le taux d'absorbance d'une Substance chimique, c'est-à-dire sa capacité d'absorption de la lumière.



Vortex:

L'Agitateur Vortex numérique NEUATION est fait pour être utilisé en toute sûreté sur votre paillasse. Il possède un affichage LED et une plage de vitesse réglable de 300 jusqu'à 4200 tr/min. il permet également le réglage du temps d'exécution et du temps d'arrêt par l'utilisateur.

Les kits utilisés dans notre étude :

Les protocoles énumérés ci-dessous sont tirés de kits au niveau du laboratoire central de l'ESH de lutte contre le cancer Blida

Isolation RNA :

Pure Link™ Total RNA Blood kit

Revers Transcription :

PureLink™ Total RNA Blood Purification Kit

La détection de la BCR-ABL1 Mber et BCR-ABL1 mber :

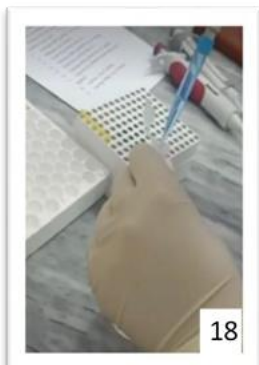
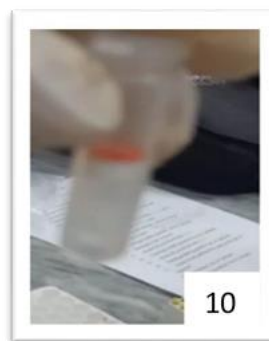
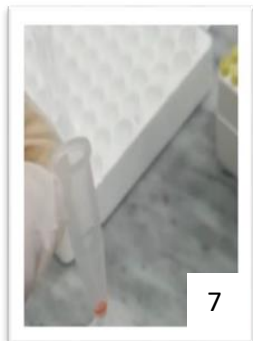
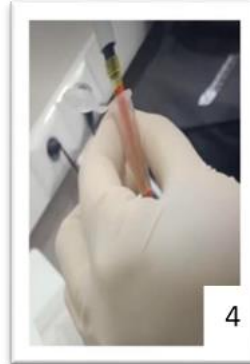
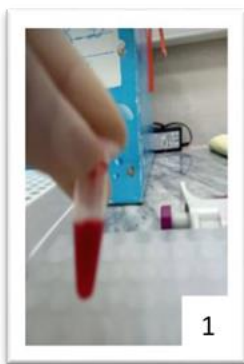
TaqMan® Gene Expression Assays

Isolation RNA :

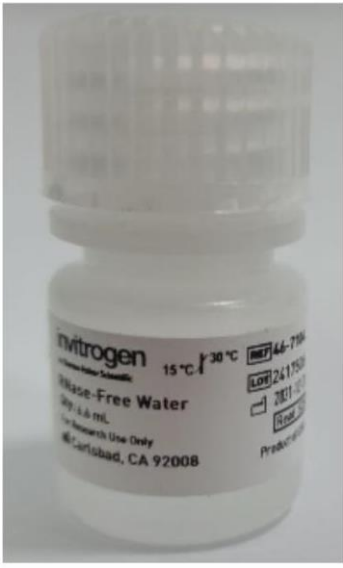
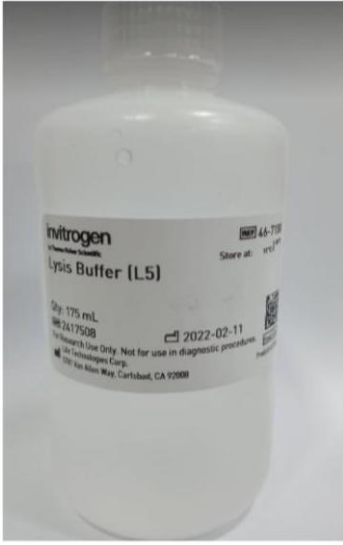
Les étapes d'Isolation RNA :

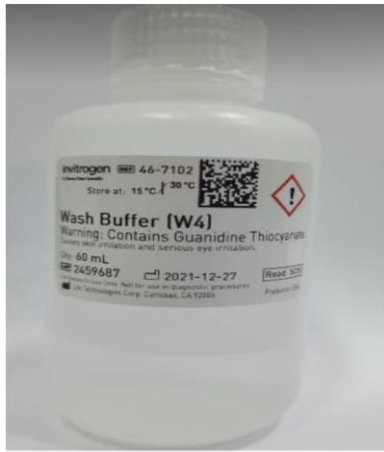
1. Dans un tube stérile (eppendorf) ajouter 100 ul du sang frais + 500 ml de Lysis Buffer (L5).
2. Incubation 10 min sur glace (vortex 2-3 times).
3. Centrifuger à 4°C pendant 10 min à 400×g.
4. Éliminer le surnageant.
5. Resuspendre le culot (leukocytes) dans 200 ul de (L5) + vortex
6. Centrifuger à 4°C pendant 5 min à 400×g.
7. Éliminer le surnageant.
- Si le culot est encore rouge refaire l'étape pour avoir un culot blanc.
8. Resuspendre le culot en 350 ul de Lysis Buffer (L3) + vortex.
9. Ajouter 350 ml de l'éthanol à 70 % + vortex.
10. Préparer le filtre spin cartilage + collection tube et transféré le lysat du step 9.
11. Centrifuger à 8000×g pendant 1 min à t° ambiante.
12. Recharger le tube collecteur.
13. Ajouter 700 ul de Wash buffer (W4).

14. Centrifuger à 8000×g pendant 30 sec, à t° ambiante.
15. Ajouter 500 ul de Wash buffer (W5).
16. Centrifuger 8000x g pendant 30 sec, à t° ambiante.
17. Ajouter 30-100 ul RNase-Free water au filtre dans un eppendorf.
18. Incubation 1 min à t° ambiante.
19. Centrifuger 8000g 1 min a t° ambiante.
20. La quantification de l'ARN à l'aide d'un spectrophotomètre
21. Conservation de l'ARN dans une température -80°C.



Kit d'isolation RNA :

	RNase_Free water
	Lysis Buffer (L5)



Wash buffer (W4)

	Lysis Buffer (L3)
	Wash buffer (W5)

Revers Transcription :

Pure Link™ Total RNA Blood Purification Kit Composition du

Kit:

Composition (Without RNase Inhibitor)	Conditionnement	Stokage
RT Buffer	01 tube	-15°C /-20°C

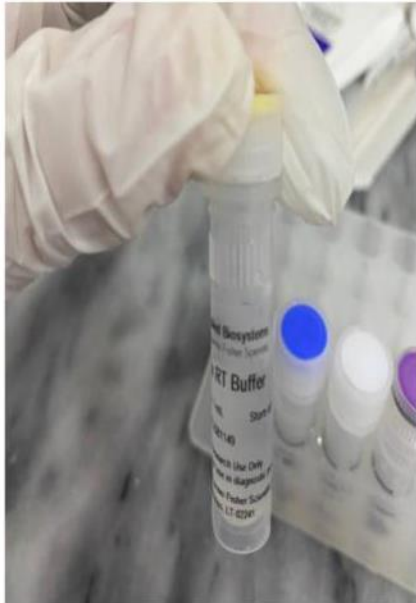
dNTP Mix (100 Mm	01 tube	
RT Random Primers	01 tube de 0.2ml	
MultiScribe™M Reverse Transcriptase	02 tubes de 0.1 ml	
Nuclease-free H2O		



Echantillon d DNc



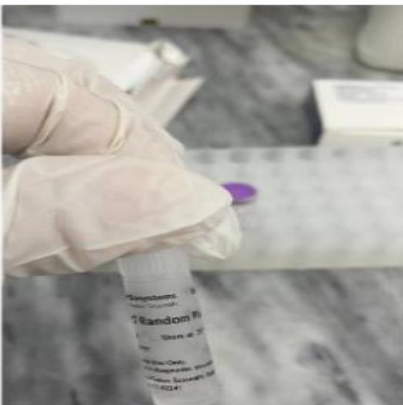
Multscible Reverse transcriptase



RT Buffer



dNTP MIX



RT Random primers

	Nuclease - free water
---	-------------------------------------

La détection de la BCR-ABL1 Mber et BCR-ABL1 mber :

Préparer le mélange réactionnel et charger la plaque TaqMan® Gene Expression Assays

1.a) Décongeler sur de la glace et remettre complètement en suspension en agitant doucement au vortex, puis centrifuger brièvement pour amener le liquide au fond du tube des :

- TaqMan® Gene Expression Assay (20X)
- échantillons d'ADNc

2.b) Mélanger le réactif Master Mix en faisant doucement tourner le flacon

3.c) Calculez le nombre de réactions dont vous avez besoin pour chaque dosage.

Assurez-vous d'inclure pour chaque échantillon d'ADNc

- TaqMan® Gene Expression Assay (FAM)
- Control endogène (FAM)
- Control négatif

d) Pour chaque échantillon (à analyser en cinq exemplaires) suivez les volumes suivants

PCR reaction mix	Component Volume per 20-uL reaction (ML)
TaqMan® Gene Expression Assay (*3)	1,0ul
TaqMan® Gene Expression Master Mix	10,0ul
cDNA patients	4.0ul
RNase-free water	5.0ul

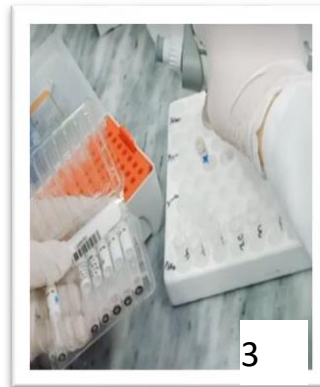
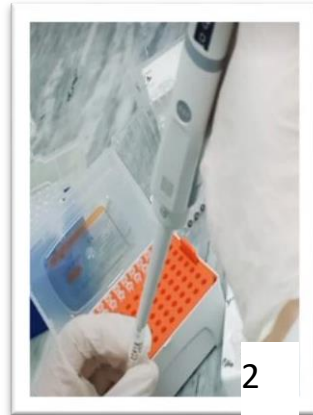
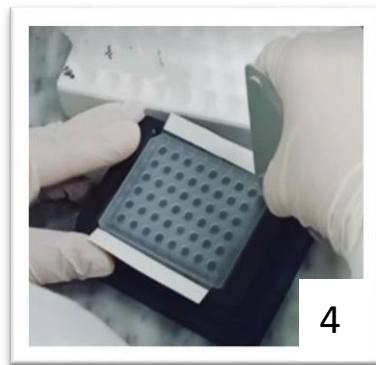
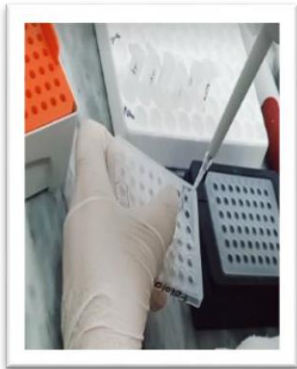
Contrôle positif :

PCR reaction mix	Component Volume per 20-uL reaction (ML)
Control endogène	1.0ul
TaqMan® Gene Expression Master Mix	10.0ul
CDNA patients	4.0ul
RNase-free water	5.0ul

Contrôle négatif :

PCR reaction mix	Component Volume per 20-uL reaction (ML)
RNase-free water	1.0ul
TaqMan® Gene Expression Master Mix	10.0ul
CDNA patients	4.0ul
RNase-free water	5.0ul

1. f) Scellez la plaque avec le film adhésif.
2. g) Centrifuger brièvement la plaque.
3. h) Charger la plaque dans l'instrument



- Créer un Template et exécuter la réaction :

1. Créez un Template en utilisant le programme correspondant à « la courbe standard relative ou la méthode CT comparative » et les données suivantes :

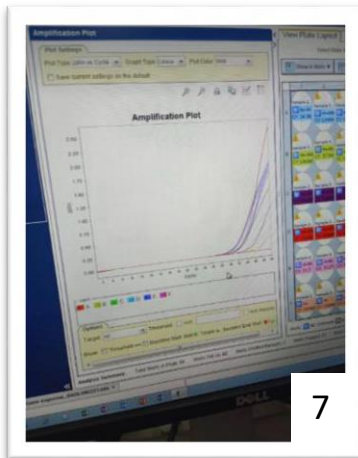
Standard	48-196- well Fast	• Rxn. Volume: 20 pL • Ramp Speed: Fas	Hold	50	2 :00
			Hold	95	10 :00
			CYCLE (40cycle)	95	0 :15
				60	1 :00

2. Exécutez la plaque.

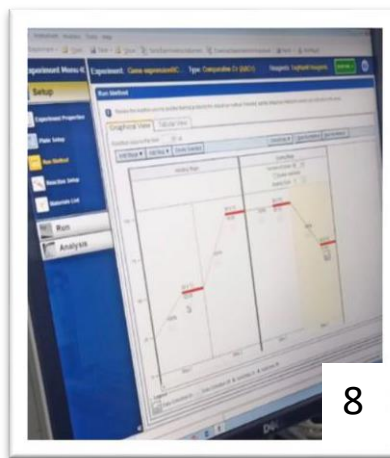
- Analysez les résultats

L'analyse des données des tests d'expression génique TaqMan vous oblige à :

- 7• Afficher les tracés d'amplification pour l'ensemble de la plaque.
- 8• Définissez les valeurs de référence et de seuil.



7



8



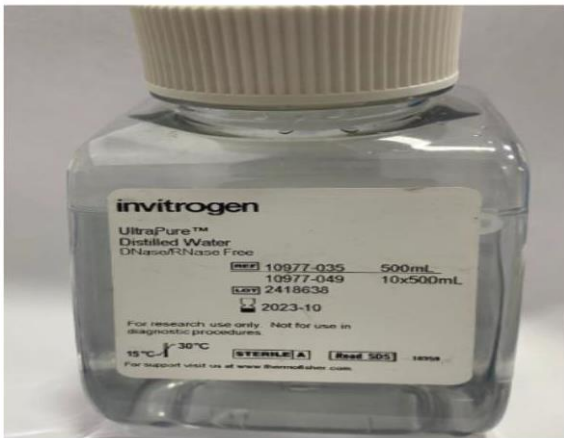
**Universal PCR
Master Mix**



**TaqMan® Mutation
Detection Assays**



RT_PCR
"applied biosystems"

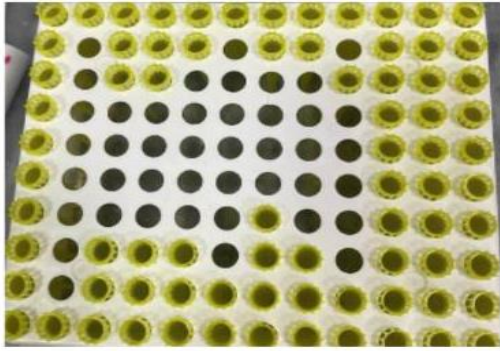


RNase-free water

1) Les autres :



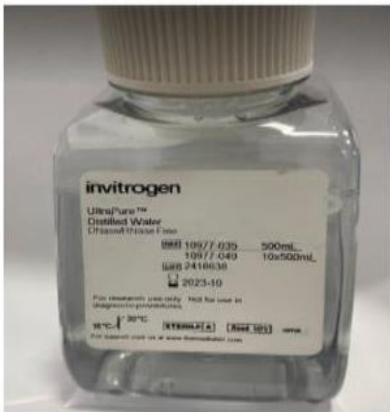
Micropipette



Emboutes jaunes



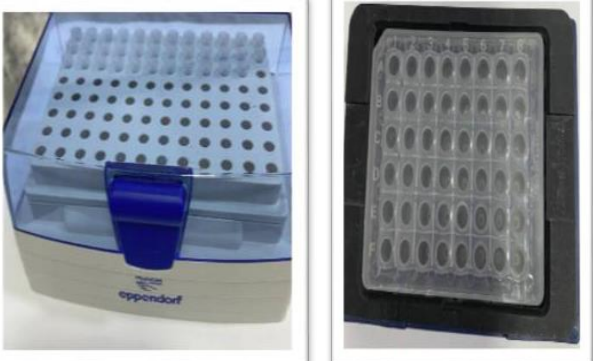
Eppendorf Spin cartridges



L'eau distillée



Tubes collecteur

	Echantillon d DNc
	Portoir