

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTERE DE L'ENSEICNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECGERCHE**  
**SCIENTIFIQUE**  
**UNIVERSITE SAAD DAHLAB – BLIDA 1**



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de biologie et physiologie cellulaire

## **Mémoire de fin d'études**

En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV  
Filière Sciences Biologiques.

**Option : Génétique**

**Thème**

# **La Rt-PCR dans le diagnostic et suivi des LMC**

Présenté par :

- **NOUAS MANEL**
- **OULD MOULOUD HANA**

**Date de soutenance :**

**13/09/2021**

**Devant le jury :**

<b>Nom</b>	<b>Garde /Lieu</b>	<b>Qualité :</b>
• Mme AISSANI.R	MAA/USDB1	Présidente
• Mr BESSAD.M. A	MCB/ USDB1	Examinateur
• Mme HAMEL.H	MAA/ USDB1	Promotrice
• Mme BENCHABANE.S	MAA/USDB1	Co Promotrice

**Promotion : 2021-2022**

## **Remerciements**

*Nous tenons à remercier le Professeur **BOUDJDOUBE** qui nous a acceptés pour faire notre stage pratique au sein de son laboratoire d'hématologie.*

*Nous désirons adresser toutes nos reconnaissances à la promotrice de ce mémoire*

***Dr. HAMEL** pour sa patience, et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter notre réflexion et ses orientations précises tout au long de notre recherche.*

*Nous tenons à remercier notre Co-promotrice **M<sup>me</sup>. BENCHABANE** pour son aide durant la période de travail.*

*Nous souhaitons adresser nos remerciements à notre chef d'option **Mr. MOHAMED SAID**, Pour la richesse et la qualité de son enseignement et qui déploie de grands efforts pour assurer à ses étudiants une formation actualisée.*

*Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury **Mr. BESSAD** et **M<sup>me</sup> AISSANI** Pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en examinant notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.*

*Nos remerciements vont également à tous les enseignants de l'université **SAAD DAHLEB BLIDA** et particulièrement à ceux du département de Biologie.*

# Dédicace

A mon très cher père **NADJIB**,

Tu as toujours été pour moi un exemple du père respectueux, honnête, de la personne méticuleuse, je tiens à honorer l'homme que tu es grâce à toi j'ai appris le sens du travail et de la responsabilité, je voudrais te remercier pour ton amour, ta générosité, ta compréhension... ton soutien fut une lumière dans tout mon parcours.

Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que tu as déployés pour mon éducation et ma formation. Je t'aime papa et j'implore le tout-puissant pour qu'il t'accorde une bonne santé et une vie longue et heureuse.

A ma très cher Mère, **KENNOUDI RATIBA**,

Aucune dédicace très chère maman, ne pourrait exprimer la profondeur des sentiments que j'éprouve pour vous, vos sacrifices innombrables et votre dévouement firent pour moi un encouragement.

Vous avez guetté mes pas, et m'avez couvé de tendresse, ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Vous m'avez aidé et soutenu pendant de nombreuses années avec à chaque fois une attention renouvelée. Puisse Dieu, tout puissant vous combler de santé, de bonheur et vous procurer une longue vie.

A ma unique très chère sœur, **SAMAH**,

Il était grand temps que je te dise à quel point tu es importante pour moi, toi qui m'a assisté dans les moments difficiles et m'a pris doucement par la main pour traverser des épreuves pénibles.... Je te suis très reconnaissante, et je ne te remercierai jamais assez pour ton amabilité, ta générosité et ton soutien moral et ton aide précieuse, je t'aime énormément ma sœur.

. A mon beau-frère **BERRANI KAMEL**,

Je ne te remercierai jamais assez pour tous ce que tu as fait pour moi, tu es mon vrai frère que je n'en ai pas, sans oublier ma petite boule de sucre **ALAA**, j'espère qu'elle sera la source de nos bonheurs et qu'elle sera une femme réussite et forte.

Son oublié ma petite tante d'amour, **KENNOUDI CHAIMA**, Merci d'être là quand ça ne va pas, merci de me prêter ton épaule quand j'en ai de besoin, merci d'apaiser mes pleurs peu importe la situation, tu as toujours les mots qu'il faut et tu sais reconnaître les moments où j'ai simplement besoin d'une oreille attentive pour m'écouter.

Et bien sur la meilleure pour la fin, ma petite très chère **NEMER SALSABILA**, meilleurs vœux de succès dans tes études, que dieu te garde et protège, je t'aime énormément ma sœurette.

Et à toute la famille **NOUAS** et **KENNOUDI**.

# Dédicace

Que la prière et le salut soit sur le prophète.

Que ce présent mémoire présente mon aviné. Je dédie ce travail :

A mes chers parents : **Malika et Djamel,**

Il y a tant de choses à en sécher tout l'encre de ce monde mais aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect et mon profond amour. Je ne vais jamais oublier vos sacrifices pour moi...  
Votre générosité sans limite, vos sacrifices, votre présence et vos conseils qui m'ont beaucoup servi dans mes études.

Vos récoltez dans ce travail les fruits de vos efforts, votre présence faisait naître en moi l'espoir nécessaire pour aller de l'avant. Que Dieu vous garde et vous procure santé, longue vie et bonheur éternel.

A mes sœur et frère : **wissem, abir, zohir, fouzi**

A ma tante nadia et ses enfants : **Ichrak, issam et fares**

A mes amies : **Nafissa, yamsine et sirine**

Ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des sœurs et des amies sur qui je peux compter. En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

Je dédie ce travail, **OULD MOULOU HANA**

## Résumé

La leucémie myéloïde chronique fait partie des maladies du sang regroupées sous le nom de « syndromes myéloprolifératifs », caractériser par une anomalie génétique acquise : la translocation t (9 ; 22) ou le chromosome Philadelphie et son oncogène BCR-ABL.

Ce travail en objectif de connaitre l'intérêt de biologie moléculaire (Rt-PCR) dans le diagnostic et le suivi des maladies avec une leucémie myéloïde chronique.

Nous avons effectué une étude prospective portant 8 patients atteints de la leucémie myéloïde chronique aux niveaux CAC laboratoire central-Blida.

En utilisant des techniques de la biologie moléculaire pour détecter les transcrit et pour déterminer l'efficacité du traitement.

Tous nos patients sont diagnostiqués en phase chronique, nous avons 6 femmes et 2 hommes on note une prédominance féminine avec un sexe ratio H/F=0,33

Cliniquement, la splénomégalie était le principal symptôme retrouvés chez nos patients elle a été observée dans 75% des cas.

Biologiquement, l'hémogramme a montré une hyperleucocytose importante chez tous nos patients 100%, le taux de plaquettes dans notre série est varié entre 117000/mm<sup>3</sup> et 386000/mm<sup>3</sup>.

Le suivi moléculaire permet à obtenir deux sous-groupes selon les résultats de PCR quantitatif : répondeurs qui ont le type de transcrit Mbcr et non répondeur qui ont le type de transcrit M-mbcr

En conclusion, Rt-PCR est la meilleure technique pour le diagnostic et le suivi des patients atteints de LMC.

**Mots clé : Rt-PCR, LMC, transcrit, BCR-ABL**

---

## Abstract

Chronic myeloid leukemia is one of the blood diseases grouped under the name of "myeloproliferative syndromes", characterized by an acquired genetic anomaly : the t translocation (9; 22) or the Philadelphia chromosome and its oncogene BCR-ABL.

This work is for the purpose of knowing the interest of molecular biology (Rt-PCR) in the diagnosis and monitoring of diseases with chronic myeloid leukemia.

We performed a prospective study involving 8 patients with chronic myeloid leukemia at CAC central laboratory-Blida levels.

By using molecular biology techniques to detect the transcripts and to determine the effectiveness of the treatment.

All our patients are diagnosed in the chronic phase, we have 6 women and 2 men, we note a female predominance with a sex ratio M/F=0.33.

Clinically, splenomegaly was the main symptom found in our patients ; it was observed in 75% of cases.

Biologically, the blood count showed significant hyperleukocytosis in all our patients 100%. The platelet rate in our series varied between 117,000/mm<sup>3</sup> and 386,000/mm<sup>3</sup>.

Molecular monitoring allows to report two subgroups according to the results of quantitativePCR : responders who have the type of transcript Mbcr and non-responders who have the type of transcript M-mbcr

In conclusion, Rt-PCR is the best technique for the diagnosis and monitoring of CML patients.

**Keywords : Rt-PCR, LMC, transcript**

### ملخص

ابيضاض الدم النخاعي المزمن هو أحد أمراض الدم المصنفة تحت اسم "متلازمات التكاثر النقوي" ، وتتميز بشذوذ أو أو كروموسوم فيلادلفيا وجينه الورمي مكتسب: إزفاء(22;9)توراثي .  
تشخيص ورصد أمراض ابيضاض الدم (RT-PCR) يهدف هذا العمل إلى معرفة مدى اهتمام البيولوجيا الجزيئية النخاعي المزمن

أجرينا دراسة استباقية شملت 8 مرضى مصابين بسرطان الدم النخاعي المزمن في مستويات المختبر المركزي في البلدية – CAC

باستخدام تقنيات البيولوجيا الجزيئية لاكتشاف النصوص وتحديد فعالية العلاج اكتشفنا أن تم تشخيص جميع مرضانا في المرحلة المزمنة، ولدينا 6 نساء ورجلين، ونلاحظ غلبة للإناث بنسبة جنس

$$M / F = 0.33$$

سريريا، كان تضخم الطحال هو العَرَض الرئيسي الموجود في مرضانا، وقد لوحظ في 75% من الحالات. بيولوجياً، أظهر تعداد الدم زيادة كبيرة في عدد خلايا الدم البيضاء لدى جميع مرضانا بنسبة 100%،

يتراوح معدل الصفائح الدموية في سلسلتنا بين 117000 / مم<sup>3</sup> و 386000 / مم<sup>3</sup> ، ويتراوح معدل الصفائح الدموية بين 120000 / مم<sup>3</sup> و 300000 / مم<sup>3</sup>

الكلمات الرئيسية

، نسخة LMC ، Rt-PCR

# Sommaire

## Résumé

## Abstract

## Liste des figures

## Liste des tableaux

Introduction .....	14
<b><i>I. Revue bibliographie</i></b> .....	<b>1</b>
Historique .....	2
I.1. Rappel sur hématopoïèse : .....	4
I.1.1. Le déroulement d'hématopoïétique : .....	4
I.2.1 Définition d'hémopathie maligne : .....	8
I.3 Définition de LMC : .....	6
I.4Epidémiologie : .....	6
I.5Etiologie : .....	6
I.6.Les gènes BCR-ABL normaux : .....	6
I.6.1 Présentation du gène ABL1 et sa protéine : .....	6
I.6.2 Présentation du gène BCR et sa protéine : .....	7
I.6.3. Fonction de la protéine BCR : .....	11
I.7 Physiopathologie : .....	12
I.7.1.Chromosome Philadelphie : .....	12
I.7.2Gène BCR-ABL et protéine de fusion : .....	13
I.7.3 Voies de signalisation intracellulaire conduisant à la leucémogénèse: .....	14
I.8.Diagnostic de la leucémie myéloïde chronique : .....	16
I.8.1Circonstances de découverte et tableau clinique : .....	16
I.8.2. Hémogramme + frottis sanguin : .....	16
I.8.3Myélogramme : .....	17
I.8.4. Examen cytogénétiques : .....	17
I.8.5 Examens de biologie moléculaire : .....	20
I.9.Traitement de LMC : .....	25
I.9.1Avant l'ère de la thérapeutique ciblée : .....	25
I.9.2Thérapeutique ciblée : .....	26
I.10 Evolution de la maladie : .....	28

I.11 Evaluation de réponse au traitement :.....	28
I.11.1 Objectif : .....	28
I.11.2 Niveaux de repenses : .....	29
II.13. Scores pronostiques : .....	31
<b>II. Matériel et méthodes .....</b>	<b>32</b>
II.1 matériel : .....	33
II.1.1 matériel biologique : .....	33
II.1.2 matériel non biologique : .....	33
II.2 Méthodes : .....	35
II.2.1 extractions d'ARN : .....	35
II.2.2. Transcription inverse : .....	37
II.2.3. PCR qualitative: .....	39
II.2.4. PCR quantitative : (Pour la quantification de Mbc) .....	41
<b>III. Résultats et discussion .....</b>	<b>45</b>
III.1 La caractéristique démographique de la population étudiée : .....	46
III.1.1 Répartition les patients selon le sexe : .....	46
III 1.2 Répartition des patients selon l'âge : .....	46
III.2. Caractéristique des patients clinco-biologiques : .....	47
III.2.1 Selon les données cliniques : .....	47
III.2.2 Selon le plan biologique : .....	48
III.2.3 frottis sanguin : .....	50
III.3. Biologie Moléculaire : .....	50
III 3.1 recherches de transcrits BCR-ABL par PCR en temps réel : .....	50
III.3.2 le type de transcrit : .....	51
III 3.3 Phases des maladies : .....	52
III.3.4 score des maladies : .....	52
Score calculé pour établir les facteurs pronostiques dans la LMC. Ce score doit être calculé au moment du diagnostic, et avant tout traitement .....	52
<b>V. Bibliographie .....</b>	<b>58</b>
<b>VI. Annexe .....</b>	<b>64</b>



## Liste des abréviations

**SCH** : cellule souche hématopoïétique.

**ABL 1** : ABL proto-oncogene1, non-receptor tyrosine kinase.

**ARNm** : Acide ribonucléique messenger.

**FISH** : Fluorescence in Situ Hybridation.

**ITK** : Inhibiteur de tyrosine kinase.

**CS** : Cellule souche.

**BCR** : breakpoint cluster région.

**Mbcr** : Major breakpoint cluster region.

**mbcr** : minor breakpoint cluster region.

**LMC** : leucémie myéloïde chronique.

**µbcr** : micro breakpoint cluster region.

**PCR** : Polymerase chain reaction.

**Ph** : Philadelphie.

**GAB2** : Protéine de liaison associée à GRB2.

**Crkl**: sarcoma virus CT10 oncogene homolog-like.

**MEK**: MAPK Erk Kinase.

**MAP-kinase**: mitogene activator protein kinase.

**NFκB** : Nuclear factor of kappa light polypeptide gene.

**STAT Signal** : Transducers and Activators of Transcription.

**PI3K** Phosphatidylinositol-3 Kinase.

**SOS** : protéine Son Of Sevenless

**SH** : src-homology domain

**AKT** : serine/thréonine kinase 1.

**IL** : interleukine.

**RCyP** : Réponse cytogénétique partielle.

**RMM** : réponse moléculaire majeure.

**RCyC** : Réponse cytogénétique complète.

**RQ-PCR** : real-time quantitative polymerase chain reaction.

**CAC** : l'aboratoire central

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> Les 4 type de leucémie	9
<b>Figure 2 :</b> Les progénitures	5
<b>Figure 3 :</b> Précurseurs.	6
<b>Figure 4 :</b> Les cellules matures.	7
<b>Figure 5:</b> Représentation schématique de la protéine Abl.	7
<b>Figure 6 :</b> Représentation schématique de la protéine Bcr.	11
<b>Figure 7 :</b> Les grandes étapes de leucémogénèse.	12
<b>Figure 8 :</b> Formation de chromosome Philadelphie	12
Figure 9: Variant protéiques Bcr-Abl en fonction des points de cassure.	13
<b>Figure 10 :</b> Voies de signalisation cellulaire.	14
<b>Figure 11 :</b> Hémogrammes de patients LMC en phases A) chronique et B) blastique	17
<b>Figure 12 :</b> Caryotype médullaire montrant la présence de la t (9;22) (q34;q11).	18
<b>Figure 13:</b> Photos d'une FISH sur une cellule en interphase.	19
<b>Figure 14:</b> Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles.	22
<b>Figure 15:</b> A: Hydrolyse de sondes (Hydrolysis probes: Taqman assay)	23
<b>Figure 16 B:</b> Hybridation de 2 sondes (Hybridization probes)	24
<b>Figure 17:</b> Balises moléculaires (Molecular Beacons).	24
<b>Figure 18 B:</b> Amorces scorpion (Scorpion primer).	25
<b>Figure 19:</b> Représentation simplifiée du mécanisme d'action de l'imatinib montrant la liaison au domaine d'activation de la kinase de l'oncoprotéine bcr-abl occupant l'adénosine triphosphate (ATP)	27
<b>Figure 20:</b> real time PCR instrument du laboratoire d'hématologie du CAC Blida (Originale ,2022)	34
<b>Figure 21 :</b> A. Centrifugeuse B. spectrophotomètre C. Vortex (originales ; 2022)	34
<b>Figure 22 :</b> différents photos originaux sur Fixation ARN	36
<b>Figure 23:</b> des photos originales sur différentes étapes de Transcription inverse	38
<b>Figure 24 :</b> Préparation le mélange réactionnel et charger la plaque (originale 202)	40
<b>Figure 25:</b> création Template (Original, 2022)	40
<b>Figure 26 :</b> On définit la valeur de référence de seuil et les traces. (Original, 2022)	41

<b>Figure 27:</b> des photos originales(2022) sur différentes étapes de quantification Mbc.	
(original, 2022)	42
<b>Figure 28:</b> répartition de patient LMC selon le sexe.	46
<b>Figure 29:</b> Répartition des patients selon l'âge.	47
<b>Figure 30:</b> distribution des patients selon l'origine.	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>Figure 31 :</b> distribution des patients selon l'ancienneté des patients	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>Figure 32:</b> répartition des patients selon le présent et l'absence de splénomégalie.	47
<b>Figure 33 :</b> taux des globules blancs.	48
<b>Figure 34:</b> répartition des patients selon le taux d'hémoglobine.	49
<b>Figure 35:</b> répartition des patients selon le taux de plaquettes	49
<b>Figure 36:</b> répartition des patients selon le taux de blastes.	50
<b>Figure 37:</b> pourcentage positive-Négatives de nos anciens patients LMC.	50
<b>Figure 38 :</b> pourcentage positive-Négatives de nos nouveaux patients LMC	51
<b>Figure 39:</b> Le type de transcrit de notre sérié et Mbc M-mbc, Mbc.	51
<b>Figure 40:</b> Score des patients.	52
<b>Figure 41:</b> Le Type de traitement.	53
<b>Figure 42 :</b> Suivi des patients.	53

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Principaux variants moléculaires et leurs équivalents protéiques BCR-ABL1 .....	13
<b>Tableau 2:</b> les phases de LMC sans traitement .....	28
<b>Tableau 3 :</b> niveaux de repense de lmc sans traitement. ....	29
<b>Tableau 4:</b> Réponses hématologiques, cytogénétiques et moléculaires au cours du traitement par inhibiteurs de tyrosine kinase .....	30
<b>Tableau 5:</b> réactive pour faire PCR quantitative. ....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
<b>Tableau 6:</b> Volume de préparation un mélange de de pH-adjusted Lysis/Binding.....	36
<b>Tableau 7:</b> Les volumes pour préparation RT mix.....	38
<b>Tableau 8:</b> Profil de température pour les appareils Applied Biosystems et ABI PRISM .....	38
<b>Tableau 9:</b> les volumes pour chaque control.....	39
<b>Tableau 10 :</b> Les données de Template.....	40
<b>Tableau 11:</b> Préparation du mélange de qPCR pour Mbc.....	41
<b>Tableau 12 :</b> Profil de température pour les appareils Applied Biosystems et ABI PRISM pour Mbc.....	42
<b>Tableau 13:</b> Préparation de mélanges qPCR. ....	43
<b>Tableau 14 :</b> Profil de température pour les appareils Applied Biosystems et ABI PRISM pour mbc.....	43
<b>Tableau 15 :</b> Les résultats de nos patients (Mbc-abl et mbc-abl). ....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

## **Introduction**

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une hémopathie maligne appartenant au groupe des syndromes myéloprolifératifs (selon la classification OMS de 2016) (1)

Elle fut le premier processus néoplasique associé à une anomalie génétique acquise et spécifique du clone tumoral qu'est le gène de fusion BCR-ABL.

Sur le plan cytogénétique, elle est caractérisée par la présence d'une anomalie chromosomique dans plus de 95% des cas, le chromosome Philadelphie découvert dans les années 60, qui résulte de la translocation réciproque entre les bras longs des chromosomes 9 et 22 : t (9-22) (q34;q11), qui fusionne le gène codant pour la tyrosine kinase c-abl (homo-logue cellulaire de l'oncogène viral Abelson) situé sur le chromosome 9 au gène « break point cluster région (BCR) » situé sur le chromosome 22, donnant naissance à un gène de fusion BCR-ABL1.

Ce gène de fusion code pour une protéine chimérique anormale BCR-ABL1 de 210 kDa (p210) ayant une forte activité. (2)

Le diagnostic de la leucémie myéloïde chronique (LMC) est établi à l'aide de la cytogénétique à la recherche de la translocation t (9 ; 22) et de la biologie moléculaire à la recherche du transcrite de fusion BCR-ABL1 indispensable également à la quantification pour permettre ensuite un suivi moléculaire adapté. La technique de RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) est actuellement la méthode la plus recommandée en raison de sa sensibilité, sa rapidité et de sa capacité de détecter plusieurs transcrits simultanément dans une seule réaction de PCR. (3)

Le monitoring quantitatif par Rt-PCR de l'expression du transcrite Bcr-Abl peut permettre de les identifier précocement et rapidement.

En effet, le transcrite Bcr-Abl est détectable en Rt-PCR. La quantification a été rendue possible par le développement des techniques de PCR quantitative et notamment de PCR quantitative en temps réel.

Cet outil a permis de développer la quantification dans les laboratoires de routine ce qui en fait un instrument très utile pour le suivi des patients atteints de LMC. (4)

**L'objectif de notre travail** est l'intérêt de Rt PCR dans le diagnostic et le suivi des patients atteint de leucémie myéloïde chronique.

# *I. Revue bibliographique*



## Historique

Les premières descriptions de la leucémie myéloïde chronique (LMC), ou comme on l'appelait à l'époque début, la leucémie granulocytaire chronique, remonte à 1845.

A cette époque, presque simultanément, deux pathologistes indépendants, John Bennett et Rudolf Virchow, ont publié rapports de cas de patients atteints de splénomégalie, d'hypertrophie du foie et de leucocytose.

Cependant, peu ou pas de choses étaient connues sur la maladie. C'est Virchow lui-même qui le premier les symptômes étaient le résultat d'altérations de l'hématopoïèse normale.

Peu de temps après, Ernst Neumann a identifié la leucémie comme une maladie originaire de la moelle osseuse.

Cependant, près de 100 ans se sont écoulés avant que de nouvelles connaissances sur la maladie ne soient acquises. Seulement en 1960 Peter Nowell et David Hungerford, après avoir amélioré une méthode de visualisation des chromosomes dans les cellules mitotiques (caryotypage), ont-ils rapporté l'identification d'une « minute chromosome » chez des patients atteints de leucémie granulocytaire chronique, ce qui représente la première découverte d'un lien entre les chromosomes et le cancer.

Ce chromosome est devenu plus tard connu comme le "chromosome de Philadelphie (Ph)".

En 1973, Janet Rowley, tout en utilisant des méthodes de coloration telles que la fluorescence quinacrine et les bandes de Giemsa, ont observé que le chromosome minute était le résultat de la translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22 (t(9;22)).

Il s'agissait de la première démonstration d'une translocation chromosomique responsable d'un cancer. Cette translocation se produit généralement dans les cellules souches hématopoïétiques (CSH), qui se situent au sommet de la hiérarchie hématopoïétique.

Quelques années plus tard, Nora Heisterkamp et Jim Groffen ont montré que l'homologue humain de l'Abelson murin l'oncogène viral de la leucémie (v-Abl), ABL1, était situé dans la région du chromosome 9, qui translocation vers le chromosome 22 (5)

En 1998, les laboratoires Novartis ont commercialisé un médicament anti tyrosine kinase qui va agir précisément au niveau de la protéine ab11.

Ce médicament est l'imatinib (Glivec). Il a révolutionné le traitement de la leucémie myéloïde chronique. Depuis, d'autres médicaments sont disponibles pour soigner la LMC : en 2006 et 2007, le dasatinib (Sprycel) des laboratoires Bristol-Myers Squibb, le nilotinib (Tasigna) des laboratoires Novartis et enfin le bosutinib (Bosulif) des laboratoires Pfizer et le ponatinib (Iclusig) des laboratoires Ariad. (6)

## **I.1. Rappel sur hématopoïèse :**

L'**hématopoïèse** est le processus physiologique de renouvellement permanent des cellules sanguines : l'érythropoïèse pour les globules rouges, la leucopoïèse pour les leucocytes (globules blancs), et la thrombocytopoïèse pour les plaquettes. (7)

### **I.1.1. Le déroulement d'hématopoïétique :**

Toutes les cellules sanguines, sont produites à partir d'une même **cellule souche** totipotente, Après plusieurs divisions, les cellules souches engagées à la différenciation, ce dernier devient un **progéniteur** qui devient spécifiques d'une seule lignée. On aboutit alors aux précurseurs, Ces **précurseurs** se divisent ensuite est devient matures, La maturation terminale aboutit aux **cellules matures** fonctionnelles qui passent dans le sang.

### **L'hématopoïèse comporte 4 compartiments :**

- Les cellules souches
- Des progéniteurs
- Des précurseurs
- Des cellules matures

### **➤ Les cellules souches hématopoïétique (CSH) :**

Cette petite population cellulaire responsable de la production de toutes les lignées sanguines et du maintien de leur homéostasie au cours de la vie d'un individu, grâce à deux propriétés clés : l'**auto renouvellement** et la **différenciation**. (14)

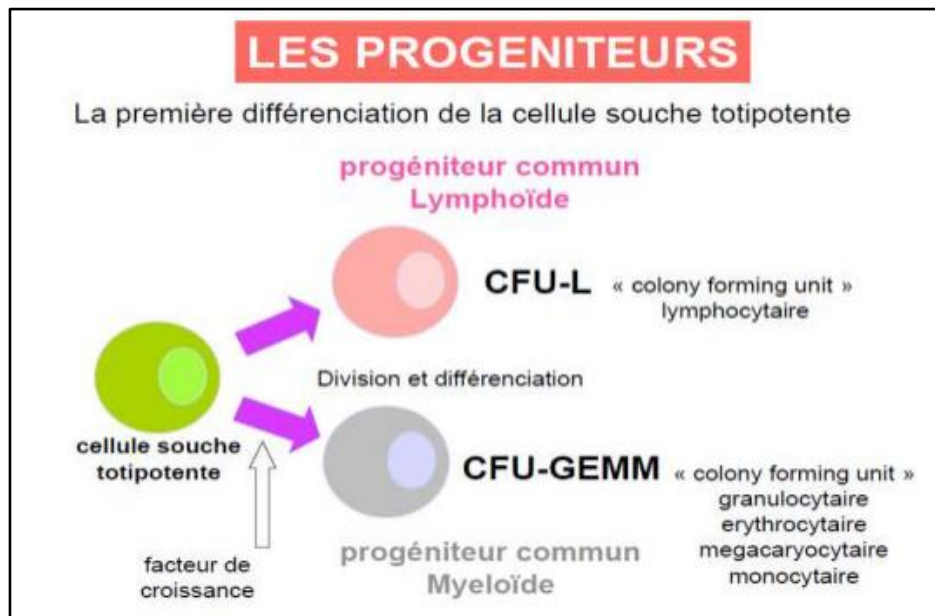
- ✓ **L'auto-renouvellement** : ça veut dire que la division d'une cellule souche donne naissance à deux cellules filles qui sont identiques à la cellule mère.
- ✓ **La différenciation** : exprime la possibilité, sous l'influence de facteurs de Croissance, de se diviser en s'engageant de façon irréversible vers plusieurs ou Une lignée. (14)
- ✓ **La cellule souche totipotente** :

La cellule souche totipotente c'est une cellule qui peut par différenciation donner tous les types cellulaires de l'organisme y compris les types cellulaires liés aux annexes embryonnaires (le placenta, le cordon ombilical ou la poche amniotique). (8)

➤ **Les progéniteurs :**

La première différenciation d'une cellule souche après sa mise en cycle se fait vers la lignée lymphoïde ou vers la lignée myéloïde, **Caractérise par :**

- Perte de la capacité d'auto renouvellement.
- Capacité importante de prolifération, Différenciation : engagement progressif et irréversible dans une lignée (9)



**Figure 1 :** Les progénitures (10)

➤ **Les précurseurs :**

Les précurseurs hématopoïétiques sont les premières cellules morphologiquement identifiables qui perdus toute capacité d'auto renouvellement.

- Les différents précurseurs :
  - Les myéloblastes (Futurs polynucléaires).
  - Les proérythroblastes (Futurs hématies).
  - Les mégacaryoblastes (Futurs plaquettes).
  - Les lymphoblastes (Futurs lymphocytes).

- Les monoblastes (Futurs monocytes).

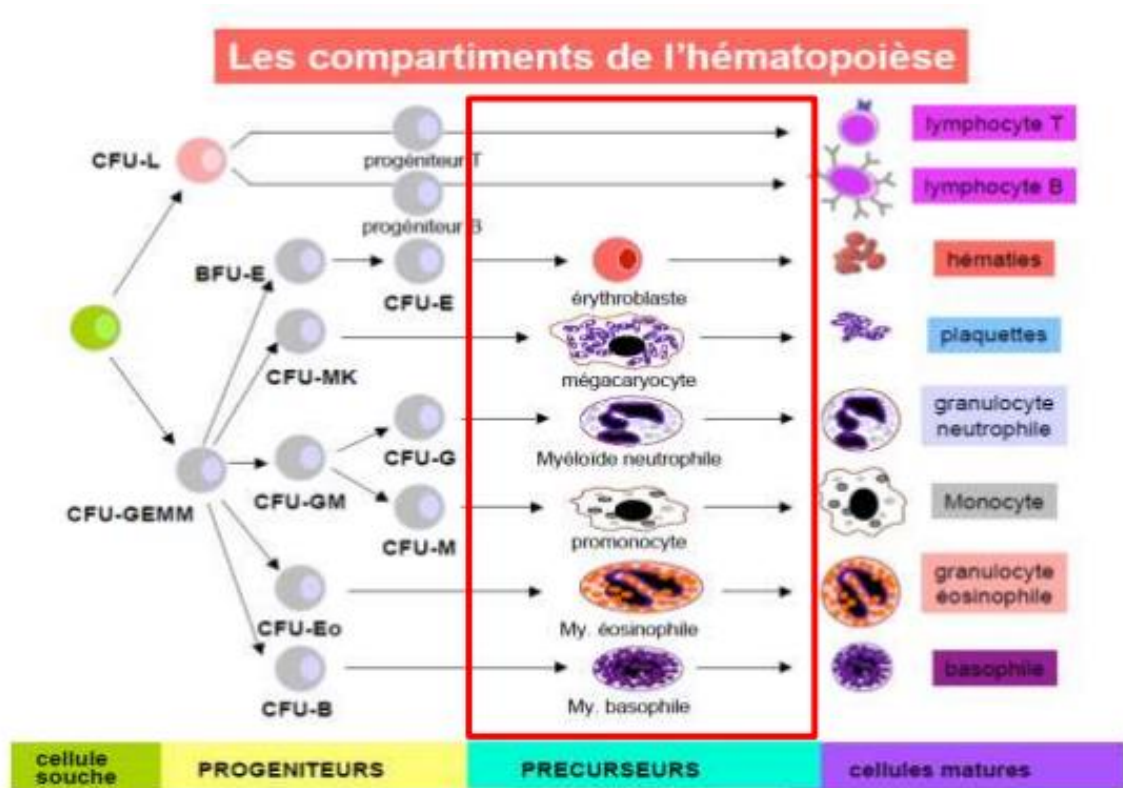


Figure 2 : Précurseurs. (16)

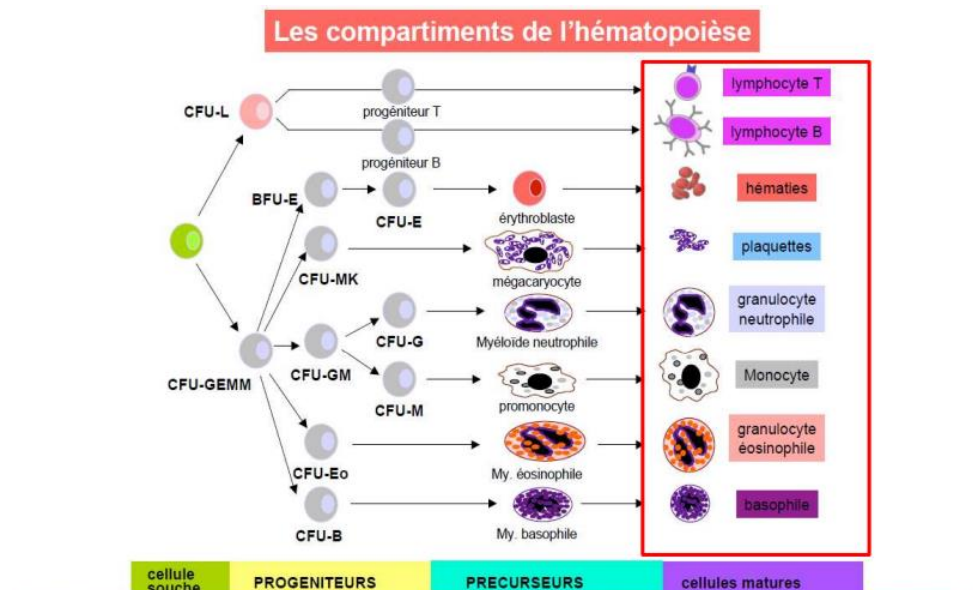
➤ **Les cellules matures :**

Ce dernier compartiment regroupe l'ensemble des cellules sanguines en cours de maturation et comporte les deux lignées issues de la différenciation des progénitures : la lignée myéloïde et la lignée lymphoïde.

**a- Lignée myéloïde** La myélopoïèse, qui commence à la 12e semaine, est à l'origine des lignées: érythrocytaire, plaquettaire, granulocytaire et monocyttaire.

**b- Lignée lymphocytaire** La lymphopoïèse, qui débute à la 11e semaine, aboutit à la formation de précurseurs des lymphocytes immunocompétents.

Les CFU-L se différencient en deux lignées T et B. Les cellules issues de la lignée T migrent dans le thymus à la 11e semaine. Ils prolifèrent dans la zone corticale où ils se différencient en prothymocytes, en thymocytes puis en lymphocytes T. Les lymphocytes B achèvent leur maturation dans la moelle osseuse (11)



**Figure 3 :** Les cellules matures. (16)

### I.2.2 La régulation d'hématopoïèses :

Ils jouent un rôle important pour obtenir une hématopoïèse correcte et régulée Outre les cellules de l'hématopoïèse.

**-Les vitamines et les oligo-éléments :** sont indispensables à l'hématopoïèse.

Certains, comme la vitamine B12 et l'acide folique, sont nécessaires à la synthèse de l'ADN et donc à la division cellulaire.

D'autres, comme le fer, sont nécessaires à la fabrication de protéines spécifiques de lignées, comme la synthèse de l'hémoglobine.

**-Les facteurs de croissance médullaires :**

Ce sont des substances (glycoprotéines) qui agissent comme des hormones.

A l'exception de l'érythropoïétine (EPO), tous les facteurs de croissance sont synthétisés par un grand nombre de cellules présentes dans divers organes :

Cellules endothéliales, fibroblastes, monocytes / macrophages, lymphocytes.

Ils portent aussi le nom de cytokines et pour ceux synthétisés par les lymphocytes, de lymphokines et d'interleukines (IL).

Ces cytokines reconnaissent leurs cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques.

**-Les facteurs multipotents :**

Ils permettent la survie et la différenciation des CSH.

Ce sont l'IL 3 et le GM-CSF (*Colony Stimulating Factor*) que l'on retrouve à tous les stades de différenciation de la lignée myéloïde.

**-Les facteurs de promotion :**

Ils augmentent le nombre de CSH et les sensibilisent à l'action des autres facteurs de croissance. Ce sont principalement l'IL1, l'IL4, l'IL6 et le SCF (*Stem Cell Factor*).

**Les facteurs restreints :**

Ils agissent sur les cellules souches déjà engagées en favorisant la multiplication cellulaire et la maturation des précurseurs. Ce sont le G-CSF, le M-CSF, l'IL4, l'IL5, l'IL6, l'IL7, l'EPO et la TPO. (12)

**I.2 Rappel sur hémopathie maligne :**

**I.2.1 Définition d'hémopathie maligne :**

Une hémopathie maligne est un cancer des tissus hématopoïétiques caractérisé par un trouble de la multiplication et de la différenciation des cellules d'une lignée sanguine. (13)

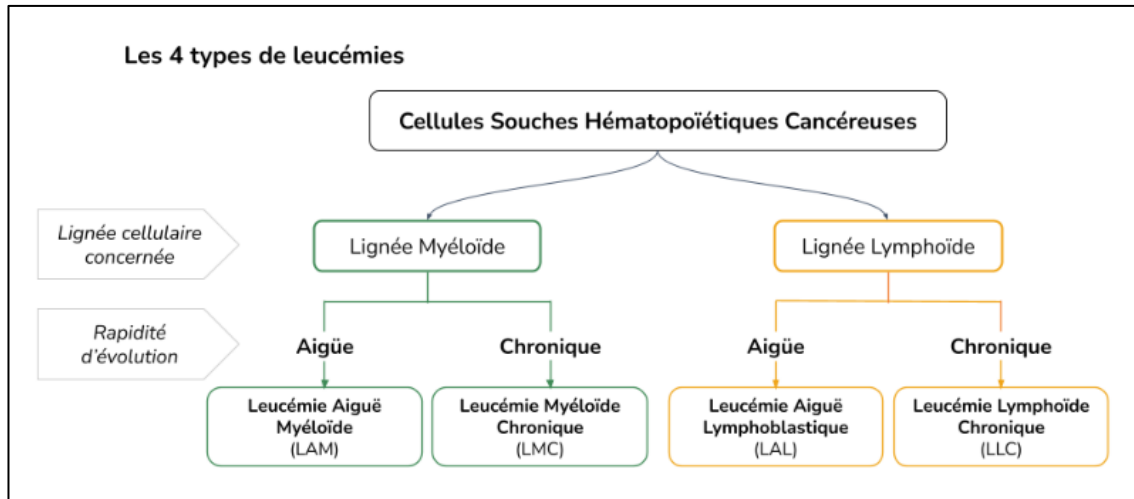
Les hémopathies malignes comprennent **trois grands groupes :**

- **Les leucémies.**
- **Les syndromes myélodysplasiques.**
- **Les lymphomes.**

**I.2.1.1 Les leucémies :**

La leucémie est définie comme étant une prolifération monoclonale maligne de cellules hématopoïétiques de la lignée blanche, Cette prolifération atteint **soit :**

- **La lignée lymphoïde**, donnant une leucémie aiguë lymphoïde ou une leucémie lymphoïde chronique.
- **Soit la lignée myéloïde** donnant une leucémie aiguë myéloïde ou leucémie myéloïde chronique. (14)



**Figure 4:** Les 4 type de leucémie (15)

### I.2.1.2 Les syndromes myélodysplasiques :

Les syndromes myélodysplasiques constituent un ensemble d'hémopathies myéloïdes clonales caractérisé par une hématopoïèse inefficace et se traduisant par des cytopénies périphériques. (16)

### I.2.1.3 Les lymphomes :

Le lymphome est une tumeur composée de tissu adénoïde (tissu ganglionnaire) typique, développée soit dans les organes contenant déjà ce tissu (rate, ganglions), soit dans les organes qui en sont dépourvus. (17)

## I.2.2 La classification de leucémie myéloïde chronique selon OMS 2016 :

(Voir annexe01)

- Tumeurs myéloprolifératives
- Tumeurs myéloïdes/lymphoïdes avec éosinophilie et réarrangement PDGFRA, PDGFRB ou FGFR1, ou avec PCM1-JAK2
- Tumeurs myélodysplasiques/myéloprolifératives (MDS/MPN)
- Syndromes myélodysplasiques (SMD)
- Leucémie myéloïde aiguë (LMA) et néoplasmes apparents
- Tumeur blastique des cellules dendritiques plasmacytoïdes
- Leucémies aiguës de lignée ambiguë
- Leucémie/lymphome B-lymphoblastique
- T-lymphoblastic leukemia/lymphoma (18)



### **I.3 Définition de LMC :**

Syndrome myéloprolifératif chronique caractérisé par une prolifération prédominante de la lignée granuleuse associée à une anomalie cytogénétique spécifique, la translocation t(9 ; 22) appelée aussi chromosome Philadelphie. (19)

### **I.4Epidémiologie :**

Dans les pays occidentaux, l'âge médian des patients atteints de LMC est d'environ 57 ans. Les patients âgés de plus de 70 ans représentent plus de 20 % et les enfants et adolescents < 5 % En Asie et en Afrique, l'âge médian au diagnostic est < 50 ans, reflétant en partie l'âge médian inférieur de la population. (20)

### **I.5Etiologie :**

L'étiologie de la leucémie myéloïde chronique semble inconnue. Certaines associations avec des facteurs environnementaux ont été signalées, mais dans la plupart des cas, aucun des facteurs étiologiques n'a pu être identifié. (21)

Les expositions nucléaires et radiologiques, y compris les radiations thérapeutiques, ont été associées au développement de la LMC. (22)

En outre, il a été montré que de fortes doses de radiations ionisantes peuvent conduire à la formation *in vitro* d'un gène BCR-ABL. (23) L'exposition à des produits chimiques n'a pas toujours été associée à un risque accru de la LMC.

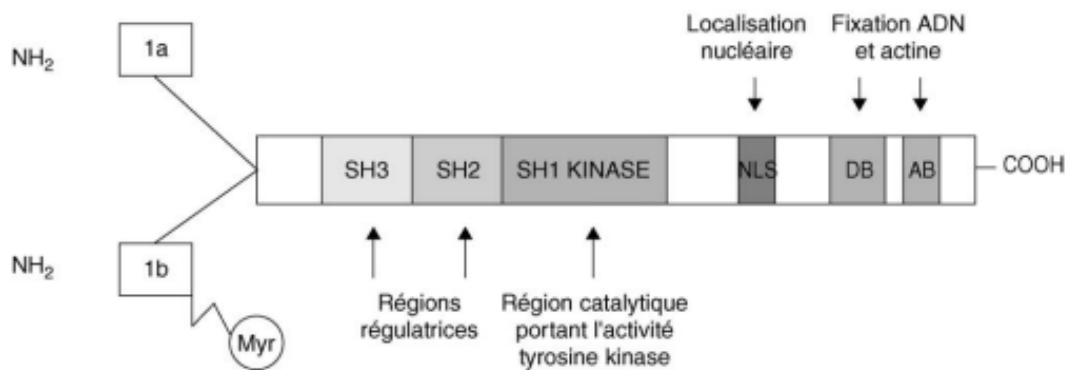
### **I.6.Les gènes BCR-ABL normaux :**

#### **I.6.1 Présentation du gène ABL1 et sa protéine :**

L'oncogène Abelson (c-ABL) est localisé sur le chromosome 9 en position 9q34. Son nom est dérivé de son homologue viral, le gène Abelson (v-ABL), responsable d'une leucémie chez la souris.

Deux variétés de protéines d'environ 145 kDa sont synthétisées en fonction du premier exon, 1a ou 1b. (24)

La protéine contenant l'exon 1b est « myristoylée » (c'est-à-dire modifiée par un groupement lipide de type acide gras saturé sur un résidu glycine), ce qui entraîne sa localisation à la membrane plasmique. L'absence de ce résidu glycine dans la forme 1a (majoritaire) entraîne une localisation nucléaire prédominante (24)



**Figure 5 :** Représentation schématique de la protéine Abl. La forme 1b possède un groupement myristoyl (Myr), qui joue un rôle important dans l'auto-inhibition de la protéine. NLS est un domaine de localisation nucléaire, DB (DNA binding) est un domaine de fixation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et AB (actin binding) de fixation de l'actine. (24)

#### I.6.1.1. La structure d'ABL1 :

La structure de la protéine cellulaire Abl est hautement conservée.

Comme la plupart des protéines induisant un signal intracellulaire, la protéine Abl possède des domaines d'homologie SH (Src homology) semblables à ceux de la protéine Src.

**Le domaine SH3** est un régulateur négatif **du domaine SH2**, qui est pour sa part un régulateur positif **du domaine SH1**, support de l'activité tyrosine kinase de la protéine Abl (Fig. 5).

Dans la **partie C-terminale** de la protéine, il existe une séquence de localisation nucléaire (NLS pour nuclear localization signal) ainsi que des domaines lui permettant de se fixer aux filaments d'actine et à l'acide désoxyribonucléique (ADN). (24)

#### I.6.1.2. Fonction de la protéine ABL :

La protéine Abl joue un rôle important dans la croissance et la prolifération

Cellulaire, participant à la transduction du signal initiée par certains récepteurs aux facteurs de croissance. (24)

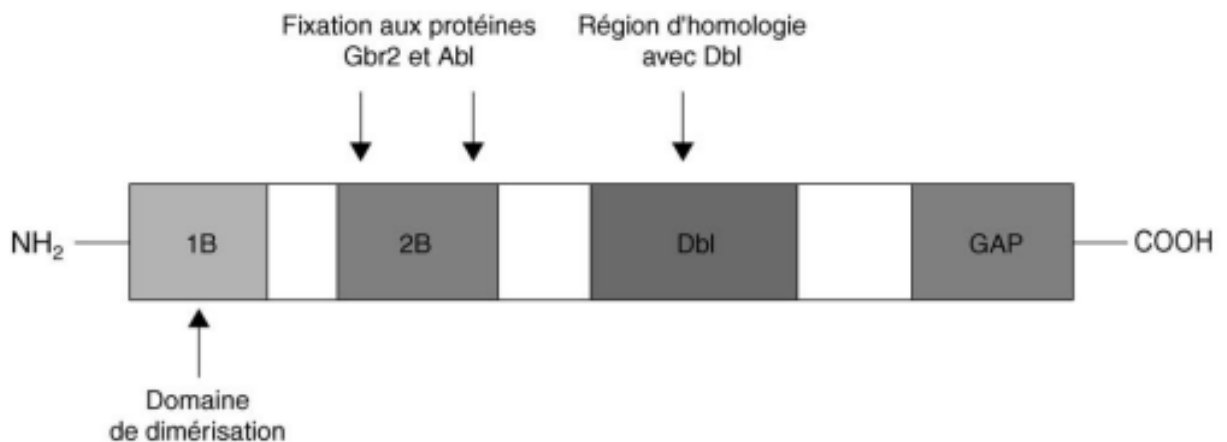
#### I.6.2 Présentation du gène BCR et sa protéine :

Le gène BCR, positionné sur le bras long du chromosome 22, a été découvert en clonant la région appelée major-breakpoint cluster région (M-BCR) où ont lieu la majorité des points de cassure dans la LMC.

Il s'étend sur 135 kb, comprend 23 exons et permet la transcription de deux types d'ARN messagers dont les poids moléculaires sont respectivement de 4,5 et 6,7 kb et qui codent une protéine de 160 kDa, d'expression ubiquitaire. (24)

La protéine Bcr est constituée de plusieurs domaines.

- **la partie N-terminale**, le domaine 1B constitue une région importante puisqu'il permet la dimérisation de la protéine Bcr-Abl conduisant à l'ouverture de l'activité kinase, et le domaine 2B comprend deux sites de liaison aux domaines SH2 comme ceux portés par la protéine Abl et la protéine Grb2.
- **La région centrale** présente un domaine d'homologie avec les protéines Dbp (facteur d'échange guanosine triphosphate [GTP]/guanosine diphosphate [GDP]).
- **La partie C-terminale de Bcr**, absente dans la protéine de fusion Bcr-Abl, a une fonction GAP (GTPase-activating protein) pour les protéines G de type Rac. Cette deuxième partie, qui n'intéresse pas la protéine chimérique Bcr-Abl, joue en réalité un rôle dans la bactéricide des polynucléaires. (24)



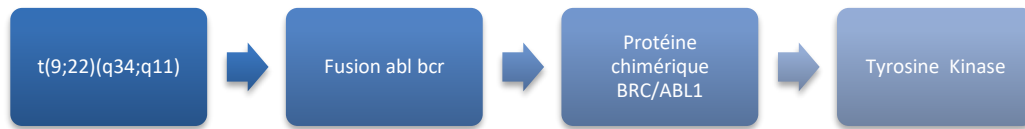
**Figure 6** : Représentation schématique de la protéine Bcr. La région 1B correspond aux 63 premiers acides aminés de Bcr et elle est nécessaire à la dimérisation de la protéine. (24)

### I.6.3. Fonction de la protéine BCR :

Les fonctions réelles de la protéine Bcr sont néanmoins, peu connues. (24)

## I.7 Physiopathologie :

La pathogénèse de la LMC peut se résumer de manière simple comme laisse présager (Figure 7)



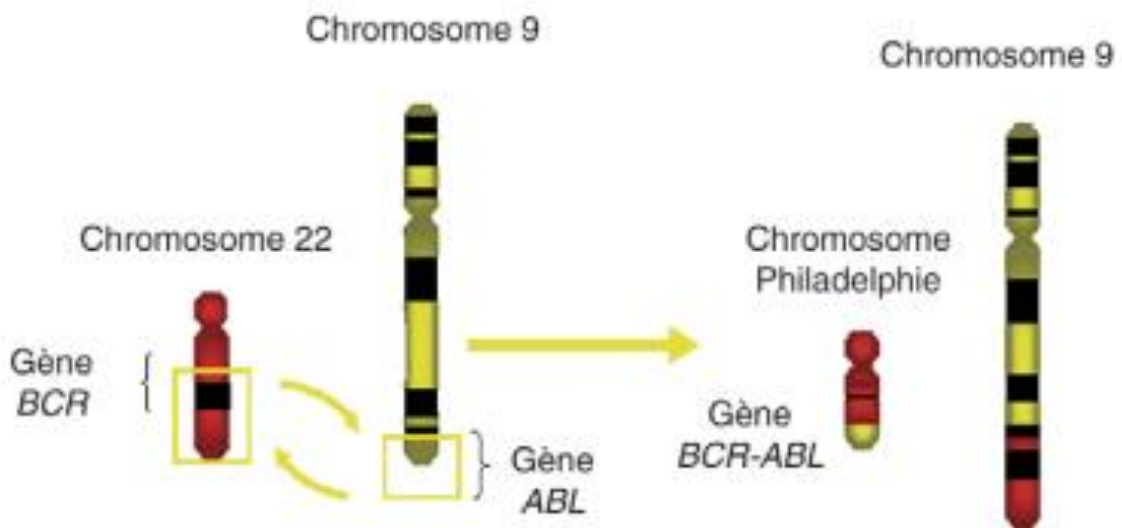
**Figure 7 :** Les grandes étapes de leucémogénèse.

### I.7.1.Chromosome Philadelphie :

Le chromosome de Philadelphie a été le premier cohérent Anomalie chromosomique identifiée dans le cancer .

C'est un échange d'ADN entre les longs bras des chromosomes 9 et 22; L'anomalie t (9; 22) conduit à un échange de ADN entre les chromosomes 9 et 22. la partie 3 du Gene ABL est déplacé du chromosome 9 (sa position normale) sur le chromosome 22 et juxtaposée au segment proximal du gène BCR perturbé sur Chromosome 22.

Le résultat est un gène chimérique BCR-ABL. (25)



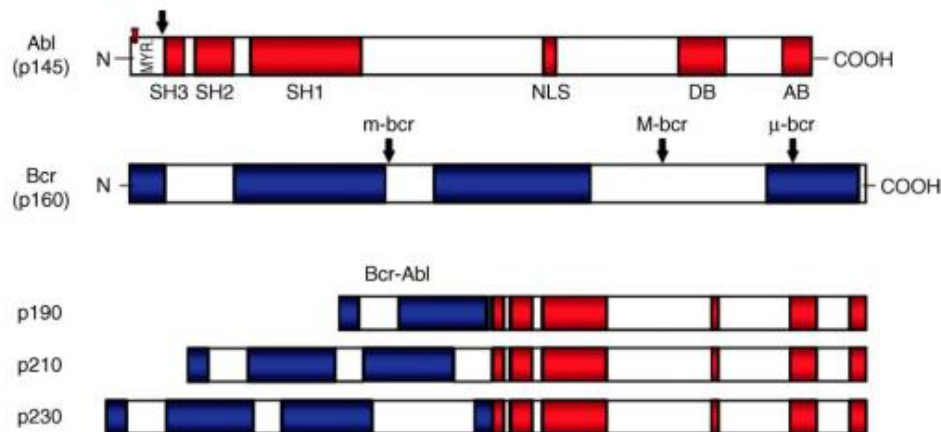
**Figure 8 :** Formation de chromosome Philadelphie (24)

### I.7.2 Gène BCR-ABL et protéine de fusion :

Les réarrangements les plus fréquemment retrouvés au cours de la LMC sont les produits de fusion du gène ABL rompu entre les exons 1 et 2 et du gène BCR rompu dans une région où les points de cassure sont variables :

Points de cassure au sein du gène BCR	Région du gène BCR	Type de transcrit	Taille de la protéine chimérique (kDa)
Entre exon 1 et exon 2	<b>m-BCR (minor breakpoint cluster region)</b>	e1a2	190
Entre exon 13 (ou b2) et exon 14 (ou b3)	<b>M-BCR (major breakpoint cluster region)</b>	e13a2 (b2a2)	210
Entre exon 14 (ou b3) et exon 15 (ou b4)		e14a2 (b3a2)	
Entre exon 17 et exon 20	<b>μ-BCR (micro breakpoint cluster region)</b>	e19a2	230

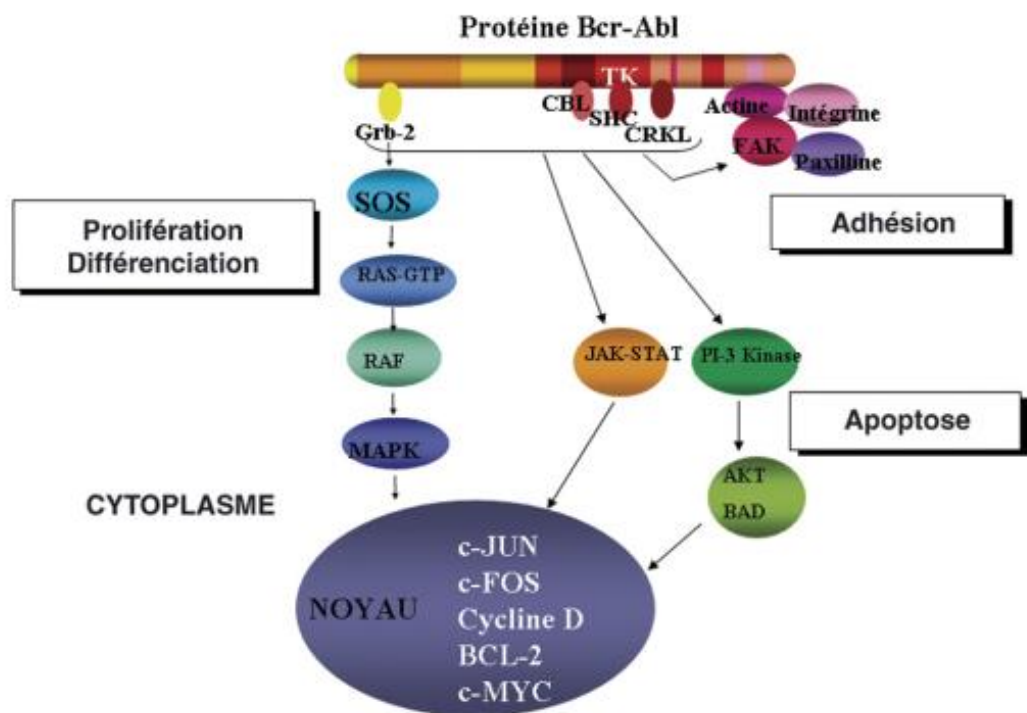
**Tableau 1:** Principaux variants moléculaires et leurs équivalents protéiques BCR-ABL1 en fonction des points de cassure au sein du gène BCR (lorsque le point de cassure d'ABL1 se situe dans l'intron 1)



**Figure 9:** Variant protéiques Bcr-Abl en fonction des points de cassure. Les différents points de cassure dans le gène Bcr conduisent à la synthèse de trois variants protéiques différents (24).

### I.7.3 Voies de signalisation intracellulaire conduisant à la leucémogénèse:

La phosphorylation d'un nombre très important de substrats est responsable des propriétés de la cellule leucémique, ce qui la distingue d'une cellule normale. En effet, l'auto activation et la perte de la régulation de l'activité tyrosine kinase entraînent l'activation, directe ou indirecte, et le recrutement de voies de signalisation impliquées dans les processus de prolifération, d'apoptose, de différenciation et d'adhésion cellulaire.(24)



**Figure 10 :** Voies de signalisation cellulaire. La protéine Bcr-Abl active différentes voies de signalisation. Pour simplifier sont représentées ici les principales. Cependant, de très nombreux substrats protéiques ont été identifiés comme étant directement ou indirectement phosphorylés par l'activité kinase de Bcr-Abl. (24)

#### ➤ Altérations des propriétés d'adhésion induites par la protéine Bcr-Abl dérégulée :

Les cellules tumorales immatures présentent une diminution de leur adhésion au stroma médullaire et à la matrice extracellulaire.

L'adhésion cellulaire est médiée par différentes familles de molécules comme les intégrines. L'expression de ces molécules d'adhésion n'est pas modifiée mais leur fonction et le signal qu'elles induisent sont dérégulés.

Ainsi, la phosphorylation par Bcr-Abl de protéines comme Crkl, la paxilline ou la talline, jouerait un rôle important dans cette dérégulation. (24)

➤ **Activation de signaux mitotiques :**

L'autophosphorylation du résidu tyrosine 177 de la protéine Bcr-Abl permet la fixation de la protéine Grb-2 qui, liée à Sos, stabilise la forme activée de Ras. Cependant, deux autres protéines, substrats de Bcr-Abl, peuvent aussi activer Ras : Shc se liant à SH2 et Crkl se liant à SH3.

**Ras** activée, via les protéines Raf, Mek et Erf, active à son tour d'autres gènes induisant un signal prolifératif.

Une autre voie, celle de **Jak Kinase**, joue aussi un rôle important. En effet, Bcr-Abl peut activer, via Grb-2, les protéines STAT sans passer par la phosphorylation des Jak kinases.

De même, la voie des PI3 kinases peut aussi être activée via Grb2, induisant un signal prolifératif et anti apoptotique via Akt. (24)

➤ **Inhibition de l'apoptose :**

Bcr-Abl bloque le relargage du cytochrome c par la mitochondrie, ce qui induit l'inactivation de la voie des caspases.

Cet effet est dû en partie à la phosphorylation de la protéine pro apoptotique Bad ou à l'hyper expression de la protéine anti apoptotique Bcl-2 via des voies de signalisation Ras ou PI3 kinase-dépendantes.

D'autres partenaires moléculaires, telles les protéines STAT ou encore la voie NFkB, interviennent dans l'inhibition d'apoptose induite par BCR-ABL. (24)

➤ **Instabilité génomique ou génétique :**

Cette instabilité génétique est illustrée par la progression de la maladie vers les crises blastiques.

Elle peut être mise en évidence par les expériences suivantes : la méthode des microsatellites et l'étude de la perte d'hétérozygotie.

Les microsatellites sont des séquences d'ADN contenant un nombre variable de répétitions de bases nucléiques en tandem. Ces séquences étant non codantes, elles subsistent de manière définitive les mutations induites par une instabilité génétique ; elles en sont donc un miroir direct. La perte d'hétérozygotie reflète tout autant cette instabilité.

En effet, tout gène muté sur un seul de ses allèles peut être désactivé, afin qu'il ne soit plus transcrit. Dans ce cas, toute transcription et donc toute traduction protéique ne provient plus que d'un seul allèle, ce qui définit la perte d'hétérozygotie.

Dans le cas de la LMC, on détecte cette instabilité génétique qui se manifeste de manière accrue lors du passage de la phase chronique vers les phases avancées (accélérée et blastique) de la maladie. (24)

## **I.8. Diagnostic de la leucémie myéloïde chronique :**

### **I.8.1 Circonstances de découverte et tableau clinique :**

Le mode lent de développement de la maladie fait qu'elle s'installe de façon insidieuse. Le plus souvent le **diagnostic** est porté de manière fortuite à l'occasion d'une numération- formule sanguine (NFS) de « routine ».

La maladie peut aussi se révéler par **son symptôme** cardinal comme:

- **La splénomégalie (SPMG)** retrouvée dans plus **de 50%** des cas de LMC.
- **D'autres signes généraux non spécifiques à la maladie.**
- **une thrombopénie** tels que des saignements, liées à une thrombocythémie, notamment les complications thrombotiques, ou plus fréquemment, des complications à type de goutte du fait de taux élevés d'acide urique.(26)

### **I.8.2. Hémogramme + frottis sanguin :**

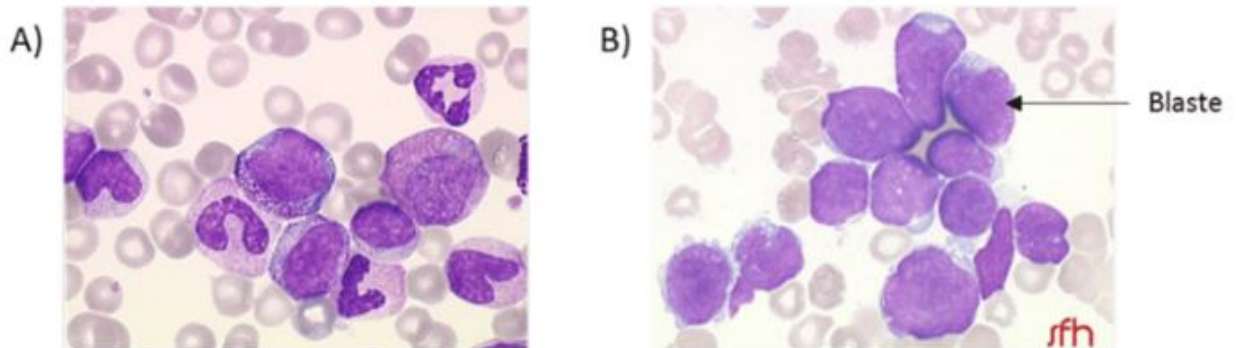
- **L'hémogramme** est l'examen le plus important car il permet à lui seul d'évoquer le diagnostic.
- **L'hyperleucocytose** est franche, **supérieure à 20 000/mm<sup>3</sup>**

Majoritairement composée de PNN, associée à une basophilie et à une éosinophilie

- **La myélémie** est constante et harmonieuse  $\geq 20\%$ , sans hiatus de différenciation,
- **La bastose** est faible lors de la phase chronique ( $< 5\%$ ).



- **L'hyperleucocytose** a été observée chez tous les patients avec un taux moyen de **196,9 G/L** et des extrêmes allant de **54 à 284 G/L**. (26)



**Figure 11** : Hémogrammes de patients LMC en phases A) chronique et B) blastique (27)

### **I.8.3 Myélogramme :**

#### **Nécessaire au diagnostic pour :**

- Définir le pourcentage des blastes (phase d'accélération ou blastique débutante)
- Ponction médullaire facile à réaliser ; os de dureté normale
- Frottis médullaires

#### **Le frottis médullaire doit être richement cellulaire, présentant les critères suivants**

- Excès d'éosinophiles et de basophiles, en parallèle de l'excès sanguin.
- Hyperplasie globale de la lignée granuleuse, habituellement sans excès de blastes (si blastes > 5%, envisager une phase accélérée).
- Erythroblastopénie, classiquement < 10 %.
- Les mégacaryocytes sont en nombre normal ou augmenté, souvent de taille réduite et avec noyau peu segmenté. (28)

### **I.8.4. Examen cytogénétiques :**

#### **I.8.4.1 Cytogénétique conventionnelle (caryotype) :**

Le **caryotype** permet l'observation et la classification des chromosomes. Leur analyse est effectuée sur des cellules cultivées et bloquées en mitose au cours de cycles cellulaires où les chromosomes sont bien individualisés et peuvent être visualisés au microscope.

Cette observation se fait après l'utilisation de colorations et de marquage chromosomique.

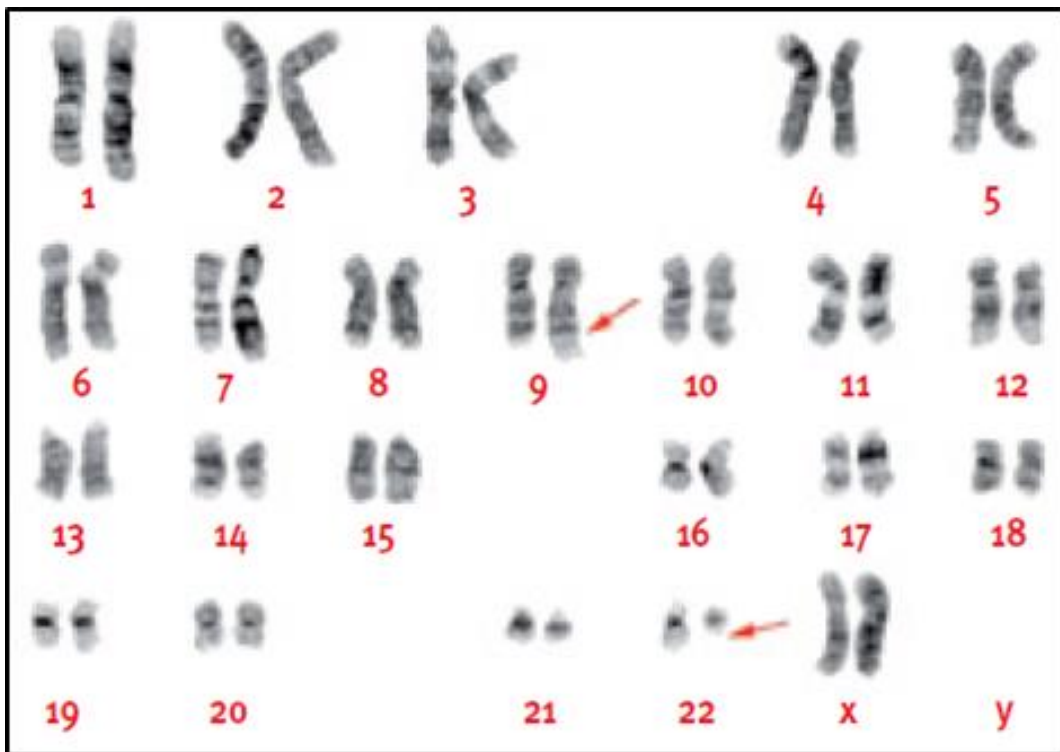
La classification des chromosomes ou caryotype est basée sur des critères morphologiques et des critères de coloration. Il est à noter que dans le cadre de la recherche du gène de fusion BCR-ABL, l'analyse cytogénétique se fait sur biopsie ou aspiration de moelle osseuse.

**Les avantages du caryotype sont les suivants :**

- Possibilité de visualiser la totalité du Génome.
- . Possibilité de visualiser des cellules ou des chromosomes individuels

**Les limites du caryotypage sont les suivantes :**

- La résolution est limitée à environ 5 Mb (millions de bases).
- Il est nécessaire de disposer d'une source de cellules en croissance active. (29)



**Figure 12 :** Caryotype médullaire montrant la présence de la t(9;22)(q34;q11). Chaque chromosome dérivé de la translocation est signalé par une flèche rouge : le dérivé du chromosome 9 présente un gain en position terminale du bras long, et le dérivé du chromosome 22 est raccourci (chromosome Philadelphie). (30)

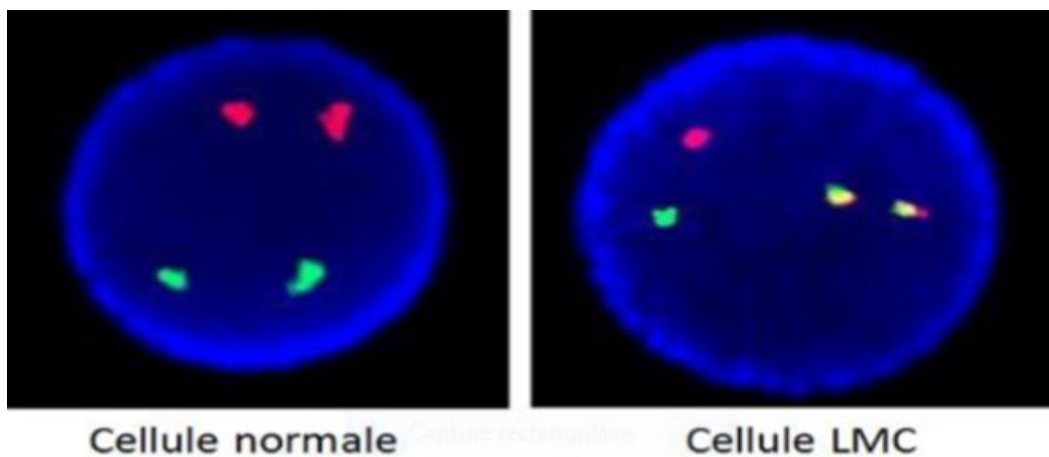
**I.8.4.2 Fluorescence in situ hybridation ou FISH :**

Cette technique est basée sur la propriété des séquences de l'ADN de se fixer

Spécifiquement à leurs séquences complémentaires. (31)

Elle permet de visualiser directement le gène de fusion BCR-ABL1 dans le noyau (FISH interphasique) ou sur la mitose (FISH métaphasique) par un mélange des signaux rouges et verts (cette partie sera approfondie dans la section FISH).

La FISH n'est pas systématique dans le diagnostic de la LMC, cependant elle est Nécessaire dans le cas des LMC à chromosome Ph négatif, et doit être couplée au Caryotype dans des conditions particulières, par exemple quand l'anomalie est trop Complexe pour visualiser un chromosome Ph, ou lorsqu'il n'y'a pas de mitose après la culture.



**Figure 13:** Photos d'une FISH sur une cellule en interphase. Sonde BCR en vert, sonde ABL en rouge, détection de gène de fusion BCR-ABL en jaune. (32)

**La FISH doit être proposée en première intention dans les conditions suivantes :**

- Présence d'une variante de t(9,22)
- Présence de chromosome Ph masqué
- Échec de caryotype
- Pour le suivi afin confirmer une rémission cytogénétique complète et pour évaluer

Une réponse partielle. (33) (34)

Ainsi l'intérêt de la **FISH** par rapport au **caryotype** est sa sensibilité plus élevée pour le diagnostic et le suivi, sa capacité de diagnostiquer les formes complexes de la LMC à

chromosome Philadelphie négatif, et également de remplacer le caryotype dans les cas d'échec de la culture cellulaire.

Cette technique est plus rapide, moins laborieuse et permet l'analyse d'un nombre conséquent de cellules que le caryotype conventionnel. (35)

**- Avantages de la technique FISH :**

- Elle peut faire une sonde à partir de quasiment tout type d'ADN.
- Sa résolution est bien supérieure à celle du marquage des bandes G pour identifier les délétions, les insertions et les points de cassure des translocations.
- Elle peut utiliser des tissus archivés et des cellules, quel que soit leur stade du cycle cellulaire.
- Elle peut analyser les résultats cellule par cellule.
- Ses délais plus rapides, étant donné qu'il n'est pas nécessaire de mettre les cellules en culture pour obtenir des cellules en métaphase. (29)

**- Limites de la technique FISH :**

- Il n'est possible de visualiser que la région du génome complémentaire de la sonde utilisée. (29)

**I.8.5 Examens de biologie moléculaire :**

Les examens de biologie moléculaire doivent être pratiqués sur sang périphérique.

La recherche par Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) des différents variantes du transcrit de fusion BCR-ABL. (36)

**I. 8.5.1. RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymérase Chain Réaction) :**

La RT-PCR est la méthode de choix pour la détection des différents réarrangements BCR- ABL.

Grâce à l'utilisation de plusieurs amorces de manière simultanée, elle permet de détecter tous les réarrangements connus et non connus.

Compte tenu de la grande dispersion des points de cassure sur l'ADN génomique, l'amplification directe de l'ADN est impossible.

Il est nécessaire d'amplifier l'ARN après l'avoir transformé en ADN complémentaire au moyen d'une enzyme d'origine rétrovirale, la transcriptase inverse.

La réaction d'amplification enzymatique peut ensuite être effectuée **en utilisant deux amorces**, l'une complémentaire de la **séquence bcr**, l'autre complémentaire de la **séquence c-abl**.

Il est possible d'augmenter la spécificité et la sensibilité de la technique en amplifiant le produit de la réaction de PCR au moyen d'un couple d'amorces internes.

**L'analyse des produits de PCR peut s'effectuer soit :**

- ✓ directement sur gel d'agarose après coloration au bromure d'ethidium,
- ✓ soit après transfert par la méthode de Southern et hybridation avec un oligonucléotide spécifique de chacune des jonctions bcr et abl.

Le marquage de ces sondes oligonucléotidiques peut être isotopique (phosphore 32) ou non. (37)

#### **I.8.5.2. PCR en temps réel:**

##### ➤ **Principe :**

La technologie de **la PCR en temps réel** est basée sur la détection quantitative d'un «reporter» fluorescent.

L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR.

**Les avantages de PCR :**

- Une grande sensibilité.
- Une gamme très étendue de linéarité.
- Détection simultanée de plusieurs cibles.
- Possibilité de multiplex.

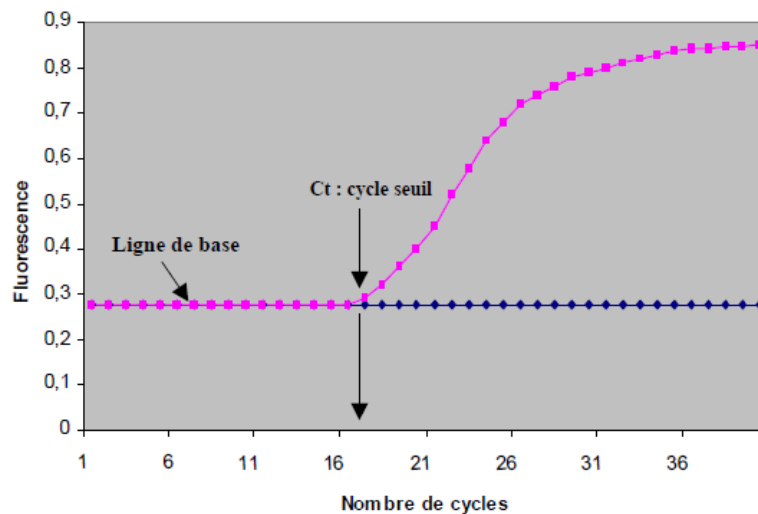
**Inconvénient de PCR :**

- Prise d'essai importante d'environ 1ml.
- Appareillage spécifique.

➤ **Cycle seuil (Threshold cycle) :**

Le concept du « cycle seuil » est à la base d'une quantification précise et reproductible pour les techniques fluorescentes en PCR. Les valeurs de fluorescence sont enregistrées au cours de chaque cycle et représentent la quantité d'amplicons produits en un point précis dans la réaction).

Ce point est défini comme étant le cycle seuil (Ct) et apparaîtra toujours au cours de la phase exponentielle d'amplification. (38)



**Figure 14:** Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles. (38)

**I.8.5.2.1 Technologies de détection :**

Tous les systèmes de PCR en temps réel reposent donc sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent pendant le processus d'amplification et l'augmentation du signal d'émission fluorescente est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits durant la réaction.

Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons :

➤ **les agents se liant à l'ADN double brin (ex. SYBR Green I) :**

SYBR Green I Leur émission fluorescente augmente lorsque qu'ils sont liés à l'ADN double brin. Pour être utilisés dans une réaction de PCR en temps réel, ces agents doivent rencontrer deux exigences : augmenter en fluorescence lorsque lié à l'ADN double brin et ne pas inhiber la réaction de PCR. Le SYBR Green I, dont le mécanisme

de liaison n'est pas bien défini, est l'agent le plus fréquemment utilisé. Ses avantages sont qu'il est économique, facile à utiliser. (38)

➤ **Les sondes fluorescentes :**

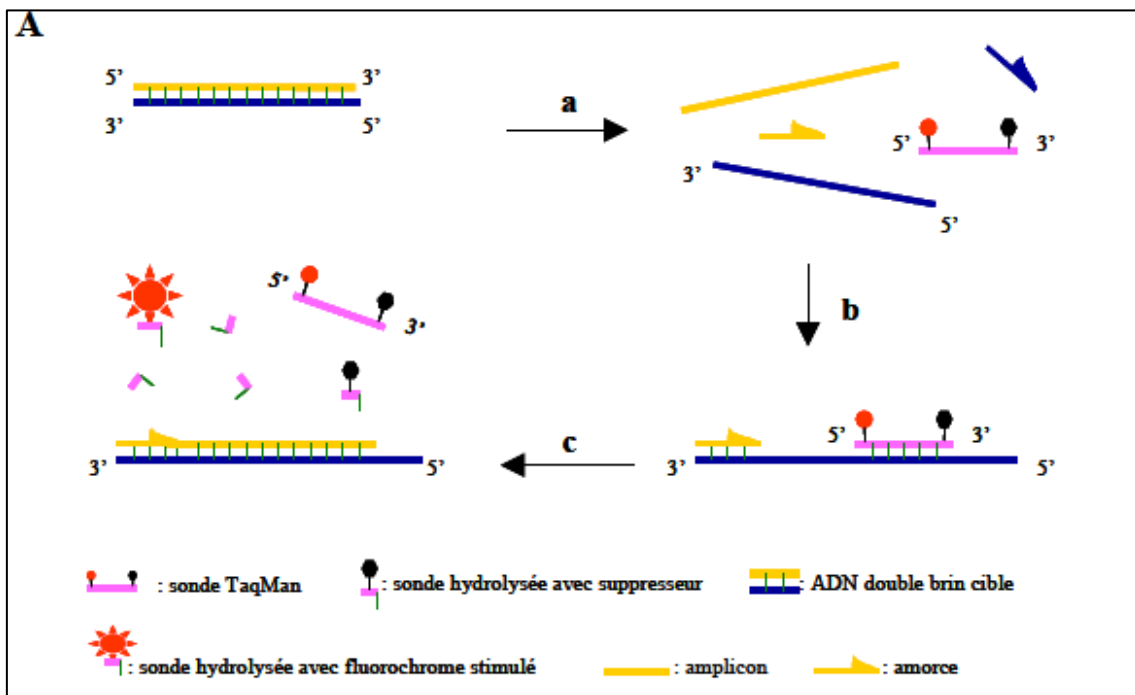
Pour cette dernière catégorie, il existe présentement quatre technologies principales :

- **Hydrolyse de sondes (Taqman assay),**
- **Hybridation de 2 sondes (HybProbes),**
- **Balises moléculaires (MolecularBeacons).**
- **Amorces scorpion (Scorpion primers).**

Ces différentes technologies de détection auraient une sensibilité équivalente.

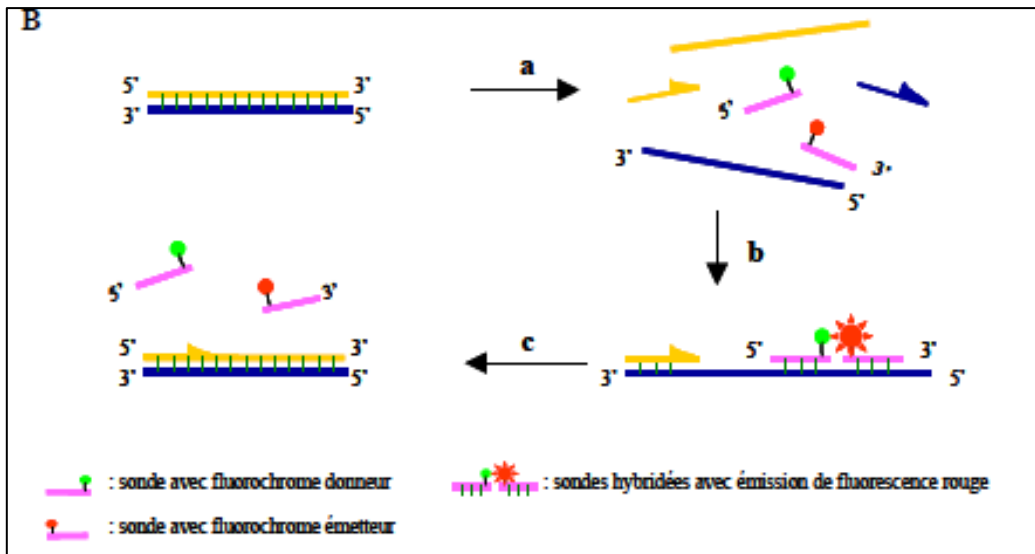
Cependant, ces technologies présentent des différences au niveau de la spécificité. (38)

➤ **La sonde Taqman :**



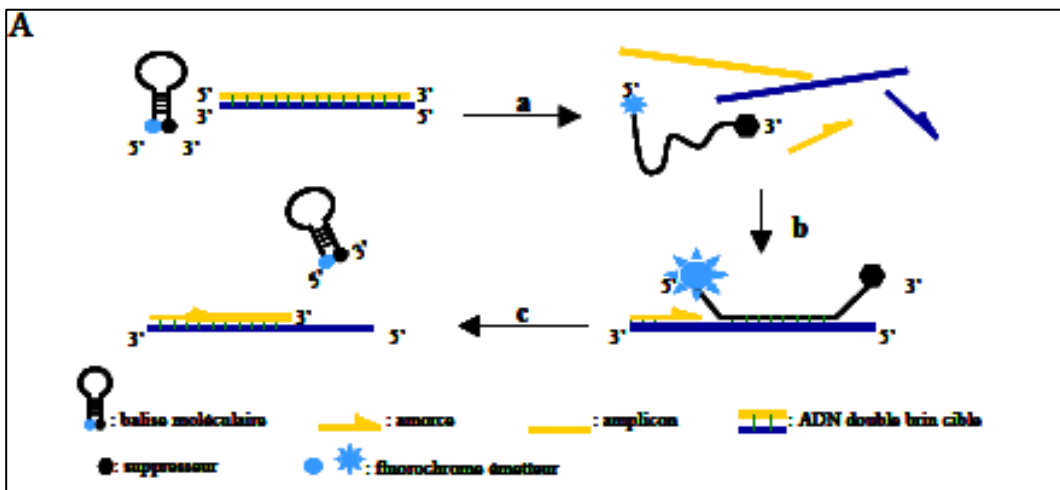
**Figure 15:** A: *Hydrolyse de sondes (Hydrolysis probes: Taqman assay)* (a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. (b) À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute. (c) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence. (38)

➤ **Hybridation de 2 sondes (Hybridization probes) :**



**Figure 16 B:** Hybridation de 2 sondes (**Hybridization probes**) (a) Durant l'étape de dénaturation, les deux sondes demeurent séparées et en solution. (b) À la température d'appariement, les sondes s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'émission de fluorescence rouge par le principe FRET. (c) Les sondes retournent libres en solution. (38)

➤ **Balises moléculaires (sonde d'hybridation en épingle à cheveux: Molecular Beacons) :**

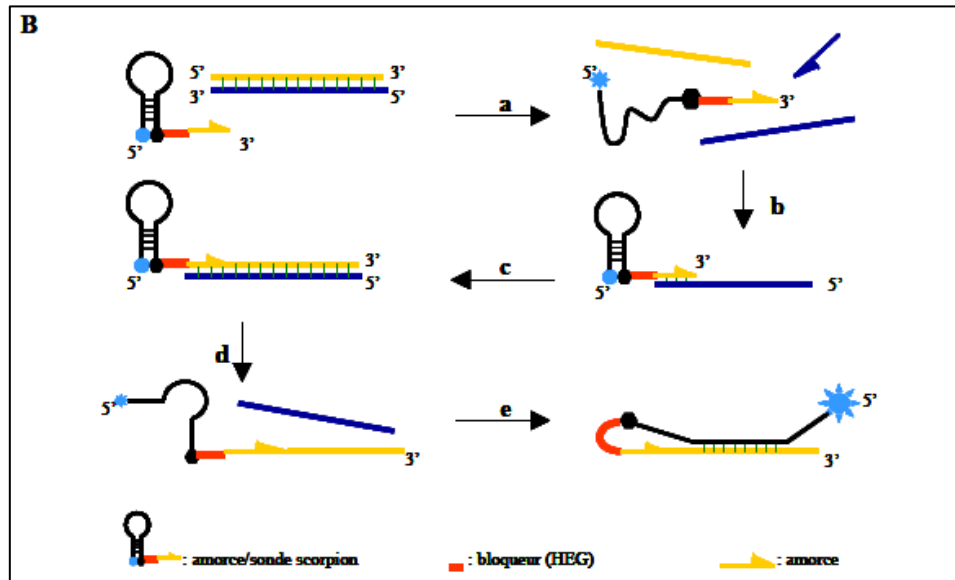


**Figure 17:** Balises moléculaires (*Molecular Beacons*). (a) Durant l'étape de dénaturation, la balise moléculaire est sous forme relaxée et libre en solution mais la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. (b) Lorsque la sonde s'hybride à sa



séquence cible, le fluorochrome émetteur est suffisamment éloigné de son suppresseur pour permettre l'émission de fluorescence (c) À l'étape de polymérisation, la balise moléculaire retourne en solution sous forme d'épingle à cheveux. (38)

➤ **Amorces scorpion (Scorpion primer: self-fluorescing amplicon) :**



**Figure 18 B:** Amorces scorpion (*Scorpion primer*). (a) Durant l'étape de dénaturation, la balise moléculaire est sous forme relaxée et libre en solution mais la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. (b) L'amorce scorpion se fixe à sa séquence complémentaire cible. (c) Polymérisation du brin complémentaire. (d) Dénaturation des brins d'ADN. (e) Hybridation de la séquence complémentaire de la partie balise moléculaire à sa séquence cible permettant l'émission de fluorescence. (38)

**I.9.Traitement de LMC :**

Le traitement de la LMC a changé de manière progressive depuis sa découverte, passant d'une chimiothérapie à visée symptomatique à une thérapie ciblée c'est à dire le ciblage de l'anomalie génétique à l'origine de la maladie.

**I.9.1Avant l'ère de la thérapie ciblée :**

La LMC a bénéficié de plusieurs armes thérapeutiques. L'arsenic au début du 20e siècle, puis le busulfan et l'hydroxyurée (Hydréa), ont été utilisés mais n'étaient que palliatifs afin d'améliorer la qualité de vie des patients en phase chronique, mais ne permettaient pas de stopper ou de ralentir de manière significative la progression de la

maladie vers ses formes avancées. Par ailleurs, selon les dernières recommandations du ELN, l'hydroxyurée peut être utilisée temporairement jusqu'à ce qu'un diagnostic soit établi. (39)

Dans les années quatre-vingt, le seul traitement curatif de la LMC reconnu chez les patients jeunes était la greffe allogénique de CSH (ou transplantation allogénique de CSH (allogenic stem cell transplantation (alloSCT))). L'allogreffe est devenue ensuite dans les années quatre-vingt-dix, le traitement de première ligne pour tous les patients éligibles en phase chronique et en phase d'accélération précoce. (40)

Le traitement par l'INF alpha est devenu dans les années quatre-vingt-dix un traitement de première ligne chez les patients ne pouvant pas bénéficier d'une allogreffe car il permettait d'induire une RCyC. (41)

### **I.9.2Thérapeutique ciblée :**

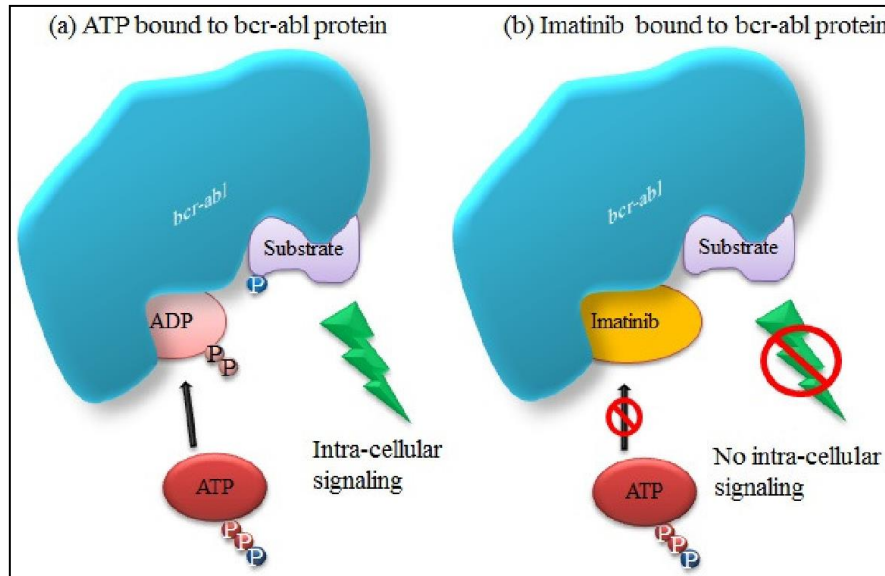
La LMC a été un modèle pour le développement des thérapies ciblées. Son pronostic a été radicalement transformé par la découverte des ITK. Ces molécules sont des inhibiteurs compétitifs de l'ATP et bloquent l'activation de la kinase BCR-ABL1. Ils ont largement fait la démonstration de leur supériorité en terme de survie, de tolérance et d'efficacité sur tous les autres traitements précédemment décrits (42)).

Trois générations d'ITK ont été développées pour une prise en charge de la LMC en première ou seconde ligne :

#### **➤ ITK de première génération (ITK1),**

**Imatinibmesylate (Glivec®) :** fait partie des inhibiteurs de la transmission du signal intracellulaire. Il cible spécifiquement l'ATK de l'oncoprotéine ABL, du récepteur cKit (récepteur du stem cell factor) et du récepteur au PDGF (PDGFR) (112).

Les travaux de Drucker et al en 1996, ont montré que cette molécule était capable d'inhiber spécifiquement la prolifération de lignées cellulaires murines et humaines transformées par BCR-ABL1). (43)



**Figure 19:** Représentation simplifiée du mécanisme d'action de l'imatinib montrant la liaison au domaine d'activation de la kinase de l'oncoprotéine bcr-abl occupant l'adénosine triphosphate (ATP) (44)

➤ **ITK de deuxième génération (ITK2):**

**Le dasatinib (Sprycel®):** Le dasatinib se lie aux conformations actives et inactives du DTK de la protéine BCR- ABL1. C'est un ITK2 ayant un spectre d'action plus large inhibant non seulement BCR- ABL1 mais aussi c-Kit, PDGF (platelet-derivedgrowth factor) et les kinases SRC qu'on peut retrouver activées lors des transformations lymphoblastiques de la maladie.

**Le nilotinib (Tasigna®) :** Le nilotinib possède aussi une activité anti c-Kit et PDGF. C'est un ITK2 structurellement analogue à l'IM mais qui présente in vitro une activité plus puissante sur BCR-ABL1 non muté et muté, à l'exception des mutations T315I, E255V/K et Y253H. (45)

**Le bosutinib (Bosulif®):** Le bosutinib possède une activité antiproliférative sur les cellules portant BCR-ABL1 sensibles ou résistantes à l'IM, y compris les mutants Y253F, E255K et D276G, mais pas le mutant T315I. Il possède également une activité anti c-Kit, PDGF et anti SRC kinases. (46)

➤ **ITK de troisième génération (ITK3):**

**Le ponatinib (Iclusig™):** Il s'agit d'un puissant ITK actif sur les formes ABL mutées ou non, y compris la mutation T315I présente chez jusqu'à 20% des patients de LMC résistants aux autres ITK. (47)

### I.10 Evolution de la maladie :

Sans traitement, cette maladie évolue en trois phases :

**Tableau 2:** les phases de LMC sans traitement (48)

<b>Phase chronique</b>	<b>➤ Phase accélérée :</b>	<b>➤ Phase aigüe :</b>
Cellules blastiques : < 15 % du total dans le sang.	Cellules blastiques : $\geq 15$ % du total dans le sang ou la moelle osseuse.	Cellules blastiques : $\geq 30$ % du total dans le sang ou la moelle osseuse.
Cellules blastiques et promyélocytes : < 30 % du total dans le sang et moelle osseuse.	Cellules blastiques et promyélocytes : $\geq 30$ % du total dans le sang ou moelle osseuse.	Maladie extra médullaire avec cellules blastiques immatures
Basophiles : < 20 % du total dans le sang et la moelle osseuse.	Basophiles : $\geq 20$ % du total dans le sang ou la moelle osseuse.	
Plaquettes : $> 100 \times 10^9$ cellules par Aucune anomalie chromosomique supplémentaire au moment de diagnostic	Thrombocytopénie persistante ( $< 100 \times 10^9$ plaquettes par L) sans rapport avec la thérapie Anomalies chromosomiques clonales à Philadelphie, cellules à chromosome positif, voie majeure, sous traitement.	

### I.11 Evaluation de réponse au traitement :

#### I.11.1 Objectif :

Une fois le traitement commencé, les médecins proposeront un suivi dont les objectifs sont les suivants :

- ✓ Détecter une éventuelle progression, une rechute ou un retour de la leucémie, le plus tôt possible ;
- ✓ Évaluer les effets secondaires du traitement et les traiter ;
- ✓ Apporter un soutien psychologique et fournir des informations afin de favoriser le retour à une vie normale. Les visites de suivi avec le médecin devront inclure les éléments suivants :
  - ✓ Des questions sur l'état de santé et sur les symptômes, et un examen clinique ;
  - ✓ Une évaluation du résultat de l'hémogramme
  - ✓ Une nouvelle biopsie de moelle osseuse\*, seulement en cas d'échec du traitement précédent ou en cas de thrombopénie\* inexpliquée ou si un test moléculaire fiable ne peut pas être obtenu\*

### I.11.2 Niveaux de réponses :

**Tableau 3** : niveaux de réponse de lmc sans traitement. (49)

Réponses hématologique	Réponses cytogénétiques :	Réponses Réponses moléculaires
Réponse hématologique complète (RHC) : <b>Leucocytes &lt; 9 G/L, formule normale, taux de plaquettes &lt; 450 G/L, Disparition des symptômes et signes cliniques de la maladie (notamment la splénomégalie)</b>	(RCyP) Réponse cytogénétique partielle : <b>Ph1 [1 %-35 %]</b> Réponse cytogénétique majeure : <b>RCyC + RCyP, Ph1 &lt; 35 %</b> <b>Réponse cytogénétique mineure :</b> <b>Ph1 [36 %-65 %]</b> Réponse cytogénétique minime : <b>Ph1 [66 %-95 %]</b> RCyC) Réponse cytogénétique complète : <b>Ph1 0 %</b>	(RMM) Réponse moléculaire majeure : <b>BCR-ABL1/ABL1 IS ≤ 0,1 %</b> Réponse moléculaire profonde : <b>RQ-PCR positive BCR-ABL1/ABL1 IS ≤ 0,01 % avec copies ABL1 &gt; 10 000</b> <b>RQ-PCR négative Copies ABL1 [10 000–31 999]</b> Réponse moléculaire profonde : <b>RQ-PCR positive BCR-ABL1/ABL1 IS ≤ 0,0032 % avec copies ABL1 &gt; 32 000</b> <b>RQ-PCR négative Copies ABL1 [32 000–99 999]</b> Réponse moléculaire profonde : <b>RQ-PCR positive BCR-</b>

		<b>ABL1/ABL1IS ≤ 0,001 % avec copies ABL1 &gt; 100 000 RQ-PCR négative Copies ABL1 &gt; 100 000</b>
--	--	---

### I.11.2.1 Réponses hématologiques, cytogénétiques et moléculaires au cours du traitement par inhibiteurs de tyrosine kinase :

**Tableau 4:** Réponses hématologiques, cytogénétiques et moléculaires au cours du traitement par inhibiteurs de tyrosine kinase (49)

A- Traitement par ITK première ligne			
Durée du traitement	Réponse optimale	Alertes	Échec du traitement
3 mois	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} \leq 10\%$ ou Ph1 $\leq 35\%$	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} > 10\%$ ou Ph1 35% - 95%	Pas de RHC ou Ph1 > 95%
6 mois	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} \leq 1\%$ ou Ph1 = 0	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} 1\% - 10\%$ ou Ph1 1% - 35%	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} > 10\%$ ou Ph1 > 35%
12 mois	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} \leq 0,1\%$	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} 0,1\% - 1\%$	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} > 1\%$ ou Ph1 $\geq 1\%$
B- Traitement par ITK seconde ligne			
Durée du traitement	Réponse optimale	Alertes	Échec du traitement
3 mois	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} \leq 10\%$ ou Ph1 < 65%	Ph1 65% - 95%	Pas de RHC, $BCR-ABL1/ABL1^{IS} > 10\%$ , Ph1 > 95% Nouvelles mutations *
6 mois	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} \leq 10\%$ ou Ph1 $\leq 35\%$	Ph1 35% - 65%	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} > 10\%$ , Ph1 > 65% Nouvelles mutations *
12 mois	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} \leq 1\%$ ou Ph1 = 0	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} 1\% - 10\%$ ou Ph1 1% - 35%	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} > 10\%$ , Ph1 > 35% Nouvelles mutations *

### II.12.Suivi :

En général, dès 3 mois après le début du traitement :

- **Des tests cytogénétiques** : sont effectués **tous les 6 mois** jusqu'à l'obtention d'une réponse cytogénétique complète et confirmée,
- **Des tests PCR** sont réalisés tous les 3 mois jusqu'à l'obtention d'une réponse moléculaire majeure. Une fois qu'une réponse cytogénétique complète a été obtenue et confirmée,
- **un test cytogénétique** est recommandé **tous les 12 mois**, mais n'est pas nécessaire si un test moléculaire fiable est disponible.
- Une fois **qu'une réponse moléculaire majeure** a été obtenue **et confirmée**, la réalisation d'un test moléculaire est recommandée **au moins tous les 6 mois**.

Cependant, si le patient présente un risque élevé d'après le score de risque ou s'il a présenté des réponses sous-optimales au traitement, des tests plus fréquents sont recommandés.

Le dépistage des mutations\* BCR-ABL doit être proposé uniquement en cas d'échec du traitement ou de réponse sous-optimale.

### **II.13.Scores pronostiques :**

Dans un souci de simplification, il dépend uniquement de **la basophilie sanguine** et de **la taille de la rate** à l'examen clinique.

La somme de ces deux paramètres affectés de coefficients définit la probabilité du patient de ne pas être en réponse cytogénétique complète (CCyR) à 18 mois de traitement.

Le patient est donc considéré comme ayant un risque élevé si son score EUTOS est supérieur à 87.

Ces trois scores pronostiques ont donc été élaborés dans le contexte de traitements différents et leur significativité dépend du traitement institué.

Cependant, le score de Sokal reste le plus utilisé en pratique, bien qu'il soit antérieur aux thérapeutiques actuelles.

## ***II. Matériel et méthodes***



- **Type d'études :**

Notre études pratique été réaliser au niveau CAC laboratoire central Blida sur une période de 1 mois.

Cette étude prospective a porté sur 8 patients adressés aux niveaux CAC laboratoire central pour suspicion de LMC.

**En pratique**, en a fait un examen de biologie moléculaire pour la détection des transcrits de **BCR-ABL**.

## **II.1 matériel :**

### **II.1.1 matériel biologique :**

#### ➤ **Prélèvements sanguins :**

Le prélèvement sanguin préconisé pour l'extraction de l'ARN est recueilli stérilement dans un tube en présence **d'EDTA**, qui est un chélateur ou un inhibiteur de l'action des enzymes nucléases, permettant ainsi de préserver l'intégrité de l'ADN et de l'ARN.

#### ➤ **Recueil de données**

Les prélèvements sanguins sont accompagnés d'une fiche de renseignements : **(annexe 02)**

- L'identité du patient : nom, prénom, âges, sexe.
- La date de réception.
- Le nom du médecin traitant.
- Les signes cliniques.
- Données de l'hémogramme et du frottis sanguin.

### **II.1.2 matériel non biologique :**

Le matériel nécessaire pour le fonctionnement d'un laboratoire comporte un équipement spécifique et non spécifique.

➤ **Equipement spécifique :**

Nous avons utilisé un PCR au temps réel « APPLIED BIOSYSTEMS » pour la détection de différents transcrits de BCR-ABL.

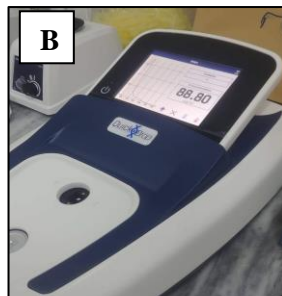
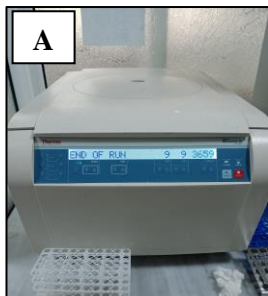


**Figure 20:** real time PCR instrument du laboratoire d'hématologie du CAC Blida (Originale ,2022)

➤ **Equipement non spécifique :**

➤ **Appareillage :**

- Centrifugeuse.
- Spectrophotomètre.
- Réfrigérateur.
- Agitateur rotatoire type Vortex.



**Figure 21** A. Centrifugeuse B. spectrophotomètre C. Vortex (originales ; 2022)

- Micropipettes (5µl, 10µl, 20µl, 100µl, 500µL, réglable)
- Embouts jaunes et bleus
- Portoirs
- Seringue de 3ml ou 5 ml
- Tube de prélèvements sanguin sous vide de 10 ml

- Eppendorf
- Gants stériles
- **Réactifs : (Voir Annexe 04)**

## **II.2 Méthodes :**

Le premier processus que nous effectuons est de prélever des échantillons préparés pour l'analyse cytologique sur EDTA. Frottis minces faits de sang.

Une partie de ces échantillons doit être réservée à la congélation cellulaire aux fins d'analyses de biologie moléculaire.

### **II.2.1 extractions d'ARN :**

#### ➤ **Principe de kit :**

Le kit « **AMBION RNA LeukoLOCK total RNA Isolation System** » est optimisé pour une utilisation avec du sang total humain. C'est une méthode innovante de fractionnement de sang total, ainsi que la stabilisation et l'extraction de l'ARN total de la population leucocytaire du sang total.

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

#### **II 2.1.1 Protocole d'extractions d'ARN :**

##### ➤ **Fixation ARN :**

Le sang total des maladies collecter dans des tubes (2tubes) contenant de l'EDTA K2, après on passe par la filtration du sang total qui réaliser par Le LeukoLOCK Filtre qui capturent la totalité des leucocytes alors que les plaquettes et le plasma et le **globule rouge** sont éliminés.

**1**-Au début on fait le montage de le LeukoLOCK après on fixe le montage en premier dans le tube contenant l'échantillon sanguin et on retourne l'ensemble (tube échantillon/filtre LeukoLOCK) et piquer aiguille dans un tube sec sous vide et on laisse tout le sang filtrer à travers le filtre LeukoLOCK on retire le filtre LeukoLOCK de l'assemblage.

**2**-L'aiguille peut être laissée, ensuite on fait un rinçage avec 3 ml ou 5 ml de PBS (pour éliminer le globule rouges).

3-en ajout 3ml ou 5ml de solution ARN LATER (cette étape protège ARN)



**Figure 22** : différentes photos originales sur Fixation ARN

➤ **Lyse de globules blancs :**

Pour lyser les leucocytes et récupérer l'ARN, on prépare un mélange de de pH-adjusted Lysis/Binding Solution, on ajoute selon le tableau ci-dessous, ensuite on mélanger brièvement au vortex.

**Tableau 5:** Volume de préparation un mélange de de pH-adjusted Lysis/Binding.

1 Rxn	20 Rxn	Component
2.5 mL	50 mL	Lysis/Binding Solution Concentrate
70 µL	1.4 mL	pH Adjustment Buffer

On expulser l'ARNlater résiduel du filtre leucoLOCK, puis on fixe la seringue avec la solution de pH-adjusted Lysis/Binding Solution de 2,5 ml au filtre et appuyez sur le piston de la seringue pour passer la solution de pH-adjusted Lysis/Binding à travers le filtre et recueillir le lysat dans un Tube conique de 15 mL.

Déconnectez la seringue, rétractez le piston, puis reconnectez-la au filtre LeukoLOCK. On appuyé sur le piston pour expulser les gouttes résiduelles de lysat cellulaire dans le même tube.

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

On ajout au lysa pour dégrader les protéines cellulaires 25 µL de protéinase K, et 2,5 mL Nuclease-free Water lysat recueilli et on Agite le mélange pendant 5 min

➤ **Isolation de l'ARN :**

On mélange 50 µL RNA Binding Beet set 2,5 mL d'isopropanol à la solution **d'ARN**, et on incube à température ambiante pendant 5 minutes.

Ensuite, on centrifuge à 2000 x g pendant 3 min après on élimine le surnagent.

Puis, on lave avec 1,2 ml de la Solution 1 et on transfère la lysa d'ARN dans un Eppendorf.

Ensuite, on centrifuge l'échantillon pendant 15 à 30 secondes dans une microcentrifugeuse à environ 16 000 x g puis on élimine le surnagent et on lave les billes de liaison à l'ARN avec 750 µL de lavage Solution 2/3.

on remettre les billes en suspension à l'aide d'une pipette et on Centrifuger l'échantillon pendant 15 à 30 secondes dans une microcentrifugeuse à environ 16 000 x g et en fin en éliminer le surnagent et laisser sécher pendant environ 2 à 3 minutes.

➤ **Elution :**

Pour Eluer l'ARN on ajoutant 50µl ou 100µl de la solution d'élution, puis on Laisser agir pendant 05 min à T° ambiante.

On centrifuge l'échantillon pendant 15 à 30 secondes dans une microcentrifugeuse à environ 16 000 x g et on récupérer le surnageant dans un deuxième Eppendorf

L'ARN ainsi isolé et soit utilisé immédiatement ou conserver à -20°C

## **II.2.2. Transcription inverse :**

### **Principe :**

Avant de faire le qPCR, il faut transcrire **l'ARN en cDNA**.

Il s'agit conversion de l'ARNm total extrait d'échantillon en ADN complémentaire a l'aide d'un enzyme appelée : RevertAid Reverse Transcriptase.

➤ **Protocole :**

Pour convertie ARNm En ADNc en utilise un kit de conversion qui contiens le mélange de la réaction de reverse transcriptase The RT master mix qui est composé de :

Des amorces de Type Randonne, des H2O NUCLEASE FREE qui minimise la dégradation d'ARN, RT Buffer, les dNTP et l'enzyme REvertAid Reverse Transcriptase.

Avant de commencer on laisse les composants du Kit décongeler sur la glace puis on prépare le RT master mix dans un bain de glace pour n échantillons selon le protocole suivant :

**Tableau 6:** Les volumes pour préparation RT mix.

Composition	Volume (µL)
10XRT Buffer	2.0 X n
25XdNTP Mix	0.8 X n
10XRT Randon Primers	2 X n
Multi Scribe Reverse Transcriptase	4.2 X n
Nucléase Free H2O	10.0 X n

Ensuite, on place le master mix 2XRT sur de la glace et mélanger doucement.

On met 10µl de 2XRT master mix dans chaque puits puis on ajoute 10µl de ARN des patients.

On scelle les puits avec un film adhésif, et on mélange bien pour éliminer d'éventuelles bulles d'air.

Pour terminer on place la plaque dans le Thermocycleur et on règle la Template selon le schéma suivant :

paramètre	Etape1	Etape2	Etape3	Etape4
température	25°C	37°C	85°C	4°C
durée	10minute	120minute	5minute	5 minute

**Tableau 7:** Profil de température pour les appareils Applied Biosystems et ABI PRISM



**Figure 23:** des photos originales sur différentes étapes de Transcription inverse

### II.2.3.PCR qualitative:

#### Protocole :

➤ Préparation le mélange réactionnel et charger la plaque.

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

- 20xTaqMan® Gene Expression Assay
- Echantillons d'ADNc

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

c).On calcule le nombre de réactions qui nous besoins pour chaque dosages. Pour chaque échantillon d'ADNc :

- 20xTaqMan® Gene Expression Assay.
- Contrôle endogène (FAM).
- Contrôle négative.

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

**Tableau 8:** les volumes pour chaque control.

PCR réaction mix	Component Volume per 20- $\mu$ L réaction
20 $\times$ TaqMan® Gene Expression Assay (*3)	1.0 $\mu$ l
2 $\times$ TaqMan® Gene Expression Master Mix	10.0 $\mu$ l
cDNA patients	4.0 $\mu$ l
RNase-free water	5.0 $\mu$ l

#### **Control positif**

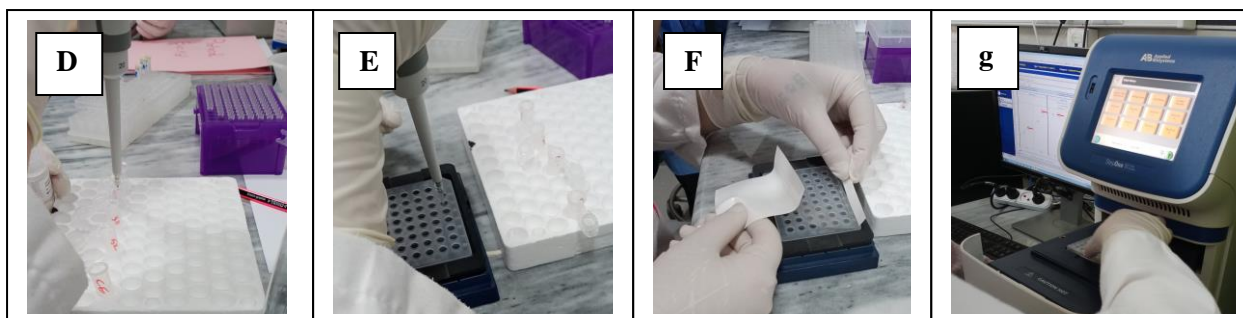
PCR réaction mix	Component Volume per 20- $\mu$ L réaction
20 $\times$ TaqMan® Gene Expression Assay (*3)	1.0 $\mu$ l
2 $\times$ TaqMan® Gene Expression Master Mix	10.0 $\mu$ l
cDNA patients	4.0 $\mu$ l
RNase-free water	5.0 $\mu$ l

#### **Control négatif**

PCR réaction mix	Component Volume per 20- $\mu$ L réaction
20 $\times$ TaqMan® Gene Expression Assay (*3)	1.0 $\mu$ l
2 $\times$ TaqMan® Gene Expression Master Mix	10.0 $\mu$ l

cDNA patients	4.0µl
RNase-free water	5.0µl

- d) Puis en mètre le mélange dans les puits d'une plaque et ADNC pour chaque patients
- e) on scelle la plaque avec le couvercle approprié.
- f) on Centrifuge brièvement la plaque.
- g) on Charge la plaque dans l'instrument.




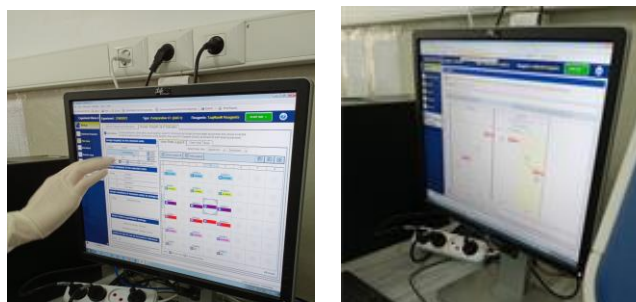
**Figure 24** : Préparation le mélange réactionnel et charger la plaque (originale 202)

➤ **Créer un Template et exécuter la réaction :**

1. On a créé un Template en utilisant la courbe standard relative ou la méthode CT comparative et les données suivantes :

**Tableau 9** : Les donnes de Template

Applied Biosystems StepOne™/ StepOnePlus™ Real-Time PCR System 	Standard	48-/96- well Fast	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rxn. Volume: 20 µL</li> <li>• Ramp Speed: Standard</li> </ul>	Hold <sup>§</sup>	50	2:00
				Hold	95	10:00
				Cycle	95	0:15
				(40 Cycles)	60	1:00



**Figure 25:** création Template (Original, 2022)



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

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



**Figure 26** : On définit la valeur de référence de seuil et les traces. (Original, 2022)

### III.2.4. PCR quantitative : (Pour la quantification de Mbc)

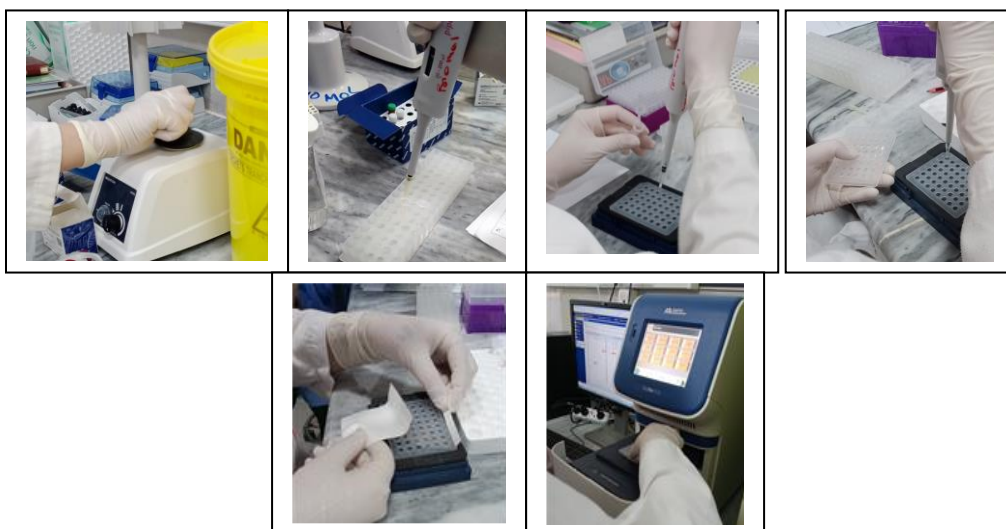
- **Protocole (Pour la quantification de Mbc) :**

- Décongeler tous les composants nécessaires et les mettre sur la glace.
- Passer au vortex les tubes de standard, PPF-Mbc et PPC-ABL et les centrifuger brièvement.
- Préparer les mélanges de qPCR suivants selon le nombre d'échantillons à analyser : calculé pour obtenir un volume réactionnel final de 20  $\mu$ l.

**Tableau 10:** Préparation du mélange de qPCR pour Mbc

Composant	ABL : 24 + 1 réactions ( $\mu$ l)	ABL : 24 + 1 réactions ( $\mu$ l)	BCR-ABL Mbc : 28 + 1 réactions ( $\mu$ l)	Concentration finale
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Mélange sonde et amorces, 25x	1	25	29	1x
Eau exempte de nucléase pour PCR	6,5	162,5	188,5	-
Échantillon (à ajouter à l'étape 4)	5	5 chacun	5 chacun	-
Volume total	25	25 chacun	25 chacun	-

- d) On Déposer 15  $\mu$ l du pré-mélange de qPCR par capillaire.
- e) Dans une zone distincte du laboratoire dotée de l'équipement adéquat, on ajoute 5  $\mu$ l du produit de ADNc obtenu lors de la transcription inverse.
- f) Mélanger doucement en pipetant.
- g) on scelle la plaque avec le couvercle approprié.
- h) Fermer la plaque et centrifuger brièvement (300 x g, pendant environ 10 s).
- i) on place la plaque dans le thermocycleur en suivant les recommandations du fabricant. Paramétrer le programme de thermocyclage tel qu'indiqué dans le tableau 9.



**Figure 27:** des photos originales (2022) sur différentes étapes de quantification Mbc. (original, 2022)

**Tableau 11 :** Profil de température pour les appareils Applied Biosystems et ABI PRISM pour Mbc

Mode d'analyse	Courbe standard - Quantification absolue
Maintien 1	Température : 95 °C, Durée : 10 s
Cyclage	50 fois 95 °C pendant 5 s 60 °C pendant 30 secondes avec acquisition de la fluorescence FAM : Single ; quencher : TAMRA
Maintien 2	Température : 36 °C, Durée : 1 min

**•Protocole (Pour la quantification de mbc) :**

- a) Décongeler tous les composants nécessaires et les mettre sur la glace.
- b) On prépare les mélanges de qPCR suivants selon le nombre d'échantillons à analyser : lors de l'utilisation d'une plaque de 96 puits, il est recommandé d'effectuer toutes les mesures en double.

Toutes les concentrations correspondent au volume final de la réaction.

Le tableau décrit le schéma de pipetage pour la préparation d'un mélange de réactifs, calculé pour obtenir un volume réactionnel final de 25 µl. Selon le nombre de réactions, un pré-mélange peut être préparé à l'aide du même mélange sonde et amorces (soit PPC-ABL, soit PPF-mbcr).

Des volumes supplémentaires sont inclus pour tenir compte des erreurs de pipetage.

**Tableau 12:** Préparation de mélanges qPCR.

Composant	1 réaction (µl)	ABL : 24 + 1 réactions (µl)	BCR-ABL mbcr : 28 + 1 réactions (µl)	Concentration finale
TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x	12,5	312,5	362,5	1x
Mélange sonde et amorces, 25x	1	25	29	1x
Eau exempte de nucléase pour PCR	6,5	162,5	188,5	–
Échantillon (à ajouter à l'étape 4)	5	5 chacun	5chacun	–

c) Déposer 20 µl du pré-mélange de qPCR par puits.

d) Ajouter 5 µl du produit de TI (ADNc, 100 mg équivalent ARN) obtenu lors de la transcription inverse dans le puits correspondant (volume total 25 µl).

e) Mélanger doucement en pipetant.

f) Fermer la plaque et centrifuger brièvement (300 x g, pendant environ 10 secondes.

G) Placer la plaque dans le thermocycleur en suivant les recommandations du fabricant. Paramétrer le programme de thermocyclage tel qu'indiqué dans le tableau.

**Tableau 13 :** Profil de température pour les appareils Applied Biosystems et ABI PRISM pour mbcr.

Mode d'analyse	Quantification
Maintien	Température : 95 °C Durée : 10 minutes

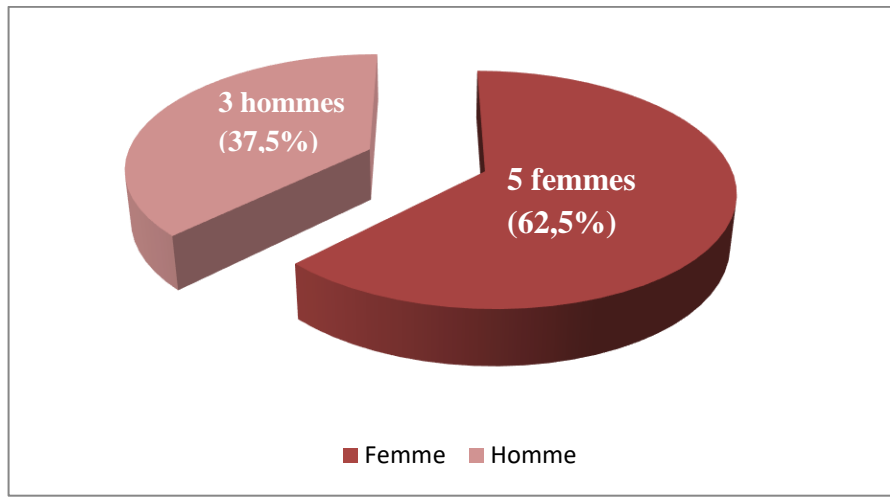
	Rampe : 20
Cyclage	50 fois 95 °C pendant 10 secondes ; rampe : 20 60 °C pendant 1 minute ; rampe : 20 ; avec acquisition de la fluorescence FAM : Single
Maintien 2	45 °C pendant 1 minute ; rampe : 20

### ***III. Résultats et discussion***

### III.1 La caractéristique démographique de la population étudiée :

#### III.1.1 Répartition les patients selon le sexe :

Notre études porte sur 8 patients, nous avons 5 femmes et 3 hommes et on note une prédominance féminine avec un sexe ration H/F=0,33.

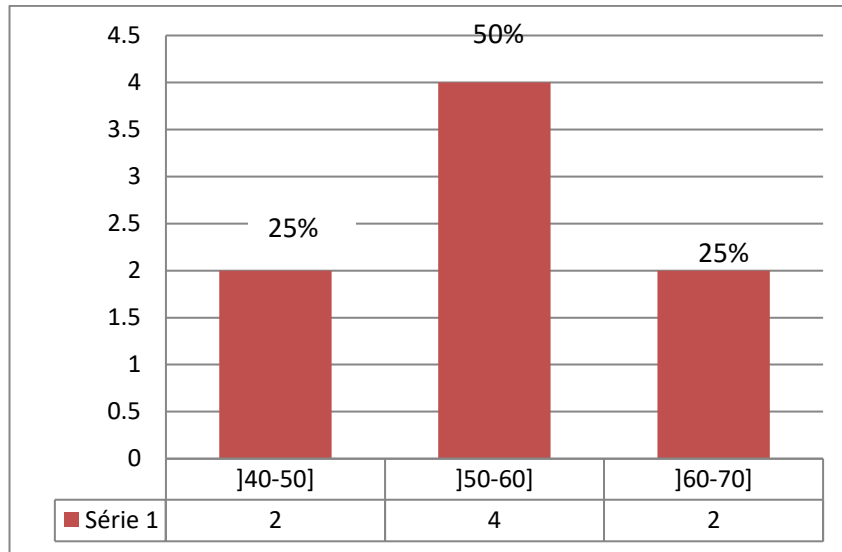


**Figure 28:** répartition de patient LMC selon le sexe.

Ce résultat est similaire avec celui de **L. Zalta et Coll** (50) qui trouve une prédominance féminine avec un sexe- ration de 0,94 sur soixante-seize patients. Par contre les résultats sont opposés à celui de **Essohana Padaro et al** (51) qui ont trouvé une prédominance masculine avec un sexe ration de 1.61.

#### III 1.2 Répartition des patients selon l'âge :

D'après nos résultats, l'âge moyen de notre population est 54 ans, nous avons effectué une répartition des malades selon 3 classes d'âges, et un pic de fréquence dans la tranche allons de]50-60].



**Figure 29:** Répartition des patients selon l'âge.

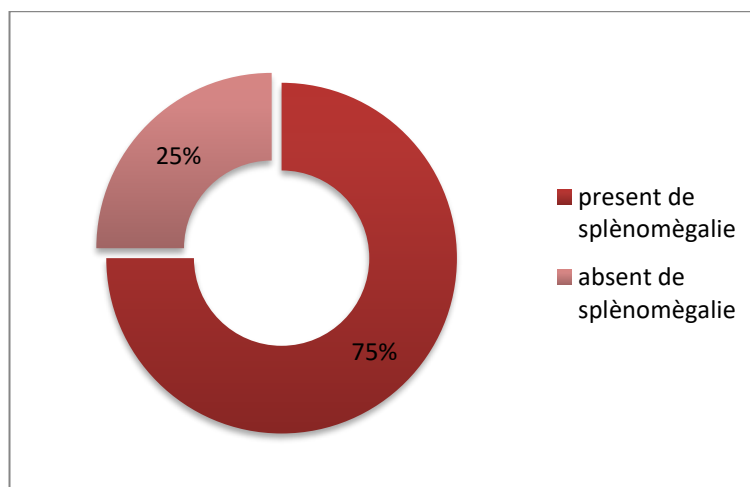
Ce résultat est approché celui qui est rapportés dans la littérature. En Europe l'âge médian au moment de diagnostic est de 60 ans et 65ans aux U.S.A. (54)

Dans notre étude l'âge moyen de notre population est de 54 ans. Ce résultat ne concorde pas avec celui de **F.S. D N'Diaye ; S. Fall** (55) qui trouvait en âge moyen de 35,32 sur un échantillonnage de 25 malades.

### III.2. Caractéristique des patients clinco-biologiques :

#### III.2.1 Selon les donnes clinique :

La splénomégalie était le principal symptôme retrouvés chez nos patients elle a été observé dans 75% des cas.



**Figure 30:** répartition des patients selon le présent et l'absence de splénomégalie.

Nos résultats sont proches a celui **Abdenbi N et al** (56)qui ont retrouvés 70 %,  
 Cependant ils sont inferieure a ceux retrouve par **Malam-Abdou Bade et al** chez qui la  
 splénomégalie était retrouvés dans 100% des cas. (57)

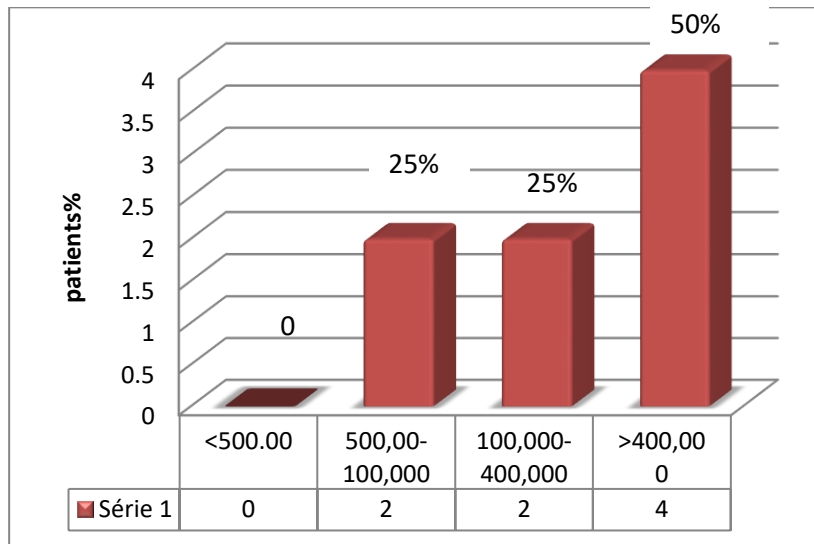
### III.2.2 Selon le plan biologique :

#### III.2.2.1 Hémogramme au moment de diagnostic :

Permet a observé les résultats suivants :

##### ➤ Hyperleucocytose :

Selon les données biologiques, l'hémogramme a montré une hyperleucocytose  
 importante chez tous nos patients 100%, le taux moyen de globule blanc est de  
 322305/mm avec des extrêmes allant 640600/mm et 84380/mm<sup>3</sup>.



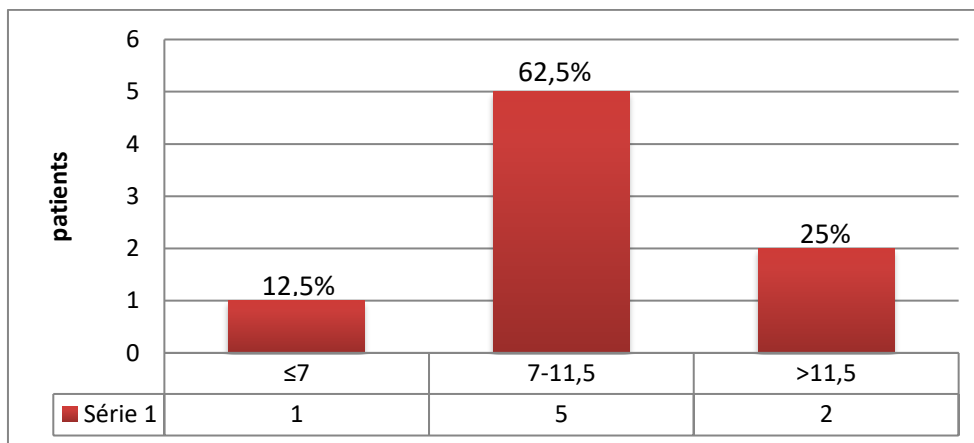
**Figure 31** : taux des globules blancs.

Notre résultat est supérieur à celui obtenu par les algériens **L. Zalta et Coll** (58) qui  
 trouvaient que 72 % de leur patient ont eu une hyperleucocytose.

##### ➤ L'hémoglobine :

Le taux d'hémoglobine chez non patients varie entre 7g/dl et 14,1g/dl avec un taux  
 moyen de 10,87g/dl .





**Figure 32:** répartition des patients selon le taux d'hémoglobine.

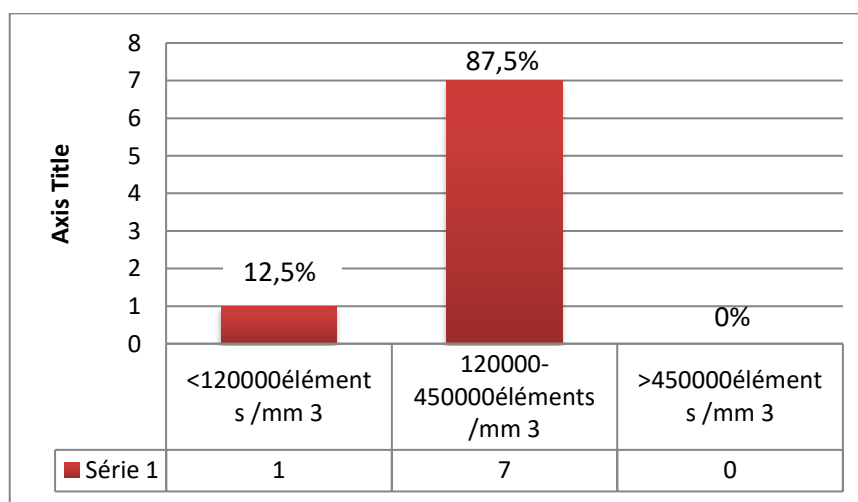
Ces résultats sont l'égerment inferieure de celui **Malam-Abdou Bade et al** (59) qui ont retrouvés un taux moyen de 9,35g/dl et des extrêmes entre 6 et 12,1g/dl. En revanche, nos résultats sont proches à celui de **SANOGO.I** qui trouves une moyenne de 10,93g/dl.

L'anémie a été retrouvée chez 87,5% de nos patients, Nos résultats sont opposés avec celui obtenus par **B Malam Abdou et al** (59) qui ont trouvées une anémie chez 21,2% de leurs patients.

Par contre nos résultats sont similaires a celui obtenu par **KUEVIAKPE.M. I et al** (60) qui ont observées une anémie chez 88,89% des patients.

➤ **Taux de plaquettes :**

Selon nos résultats on a trouvé 87,5% qui ont taux de plaquette entre 120000-450000 élément/mm<sup>3</sup>

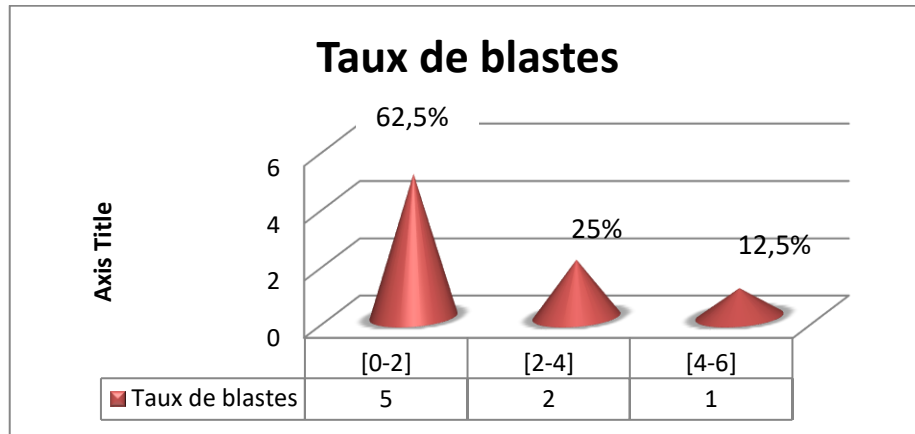


**Figure 33:** répartition des patients selon le taux de plaquettes.

### III.2.3 frottis sanguin :

#### ➤ Taux de blastes :

L'examen de frottis sanguin permet de déterminer le taux de blaste et de myéline dans le sang, dans notre série le taux de blaste sanguins est inclus entre 0 et 5% avec un moyen de 1,75%, tous nos patients avaient un taux de blaste inférieure a 10%.



**Figure 34:** répartition des patients selon le taux de blastes.

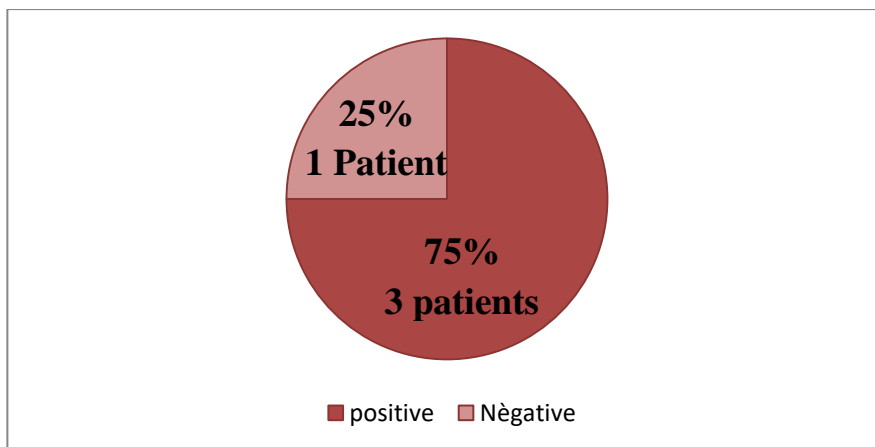
Le résultat qu'on a trouvé concorde avec les données de littérature qui affirme que le taux de blaste dans le cas de la leucémie myéloïde chronique en phase chronique est inférieure a 10 %.

### III.3. Biologie Moléculaire :

#### III 3.1 recherches de transcrits BCR-ABL par PCR en temps réel :

##### ○ Pour les anciens patients :

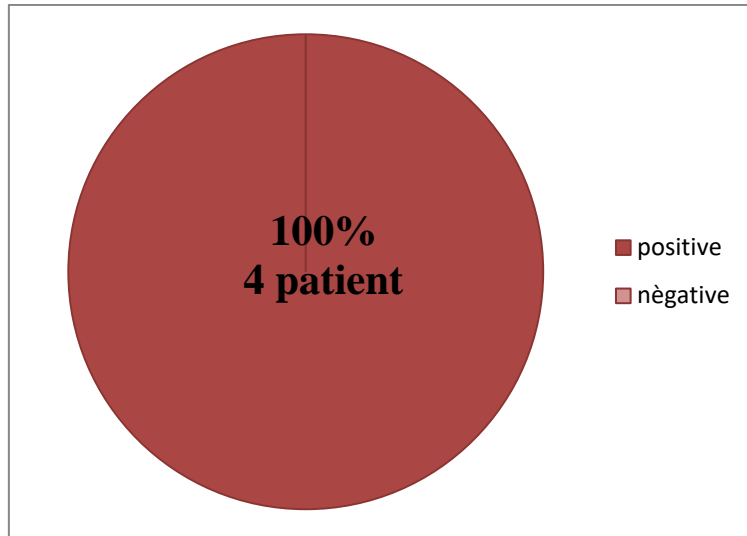
Selon nos résultats, on a trouvé 1 seul patient négatif (25%), et 3 patients positifs.



**Figure 35:** pourcentage positive-Négatives de nos anciens patients LMC.

○ **Pour les nouveaux patients :**

Selon nos résultats, on a trouvé 100% de nos patients est positive.

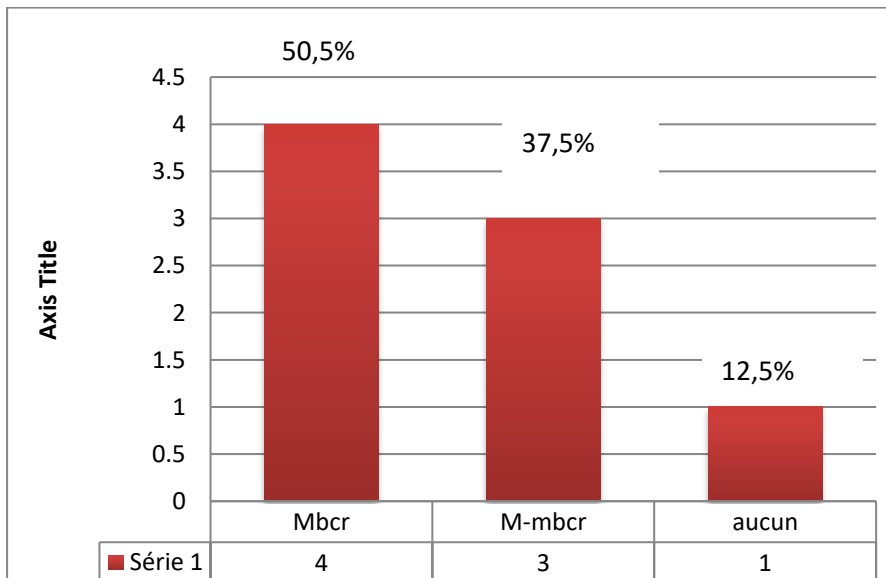


**Figure 36 :** pourcentage positive-Négatives de nos nouveaux patients LMC

**III.3.2 le type de transcrit :**

Le type de transcrit de notre sérié est Mbcr et M-mbcr.

4 (50,5%) de nos patients présents le type de transcrit Mbcr et 3 (37,5%) présent le transcrit M-mbcr et 1 (12,5%) négative aucun transcrit.



**Figure 37:** Le type de transcrit de notre sérié et Mbcr M-mbcr, Mbcr.

### III 3.3 Phases des maladies :

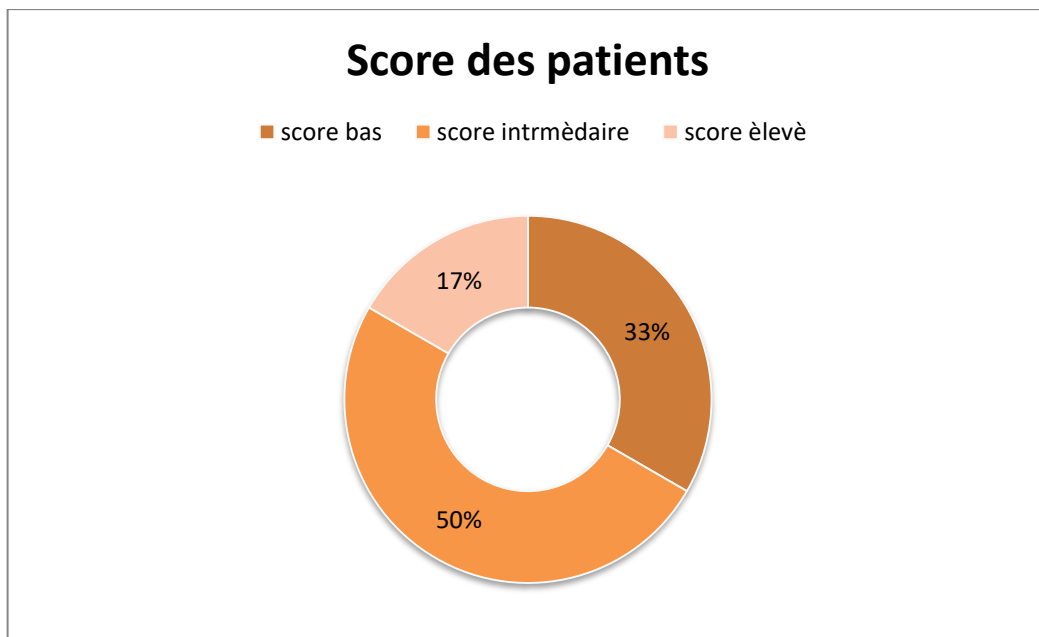
Tous les patients de notre étude ont été diagnostiqués en phase chronique.

### III.3.4 score des maladies :

Score calculé pour établir les facteurs pronostiques dans la LMC. Ce score doit être calculé au moment du diagnostic, et avant tout traitement .

On est repartiir 3 group selon le score pronostique sokal :

- un groupe de risue bas 33,3%
- un groupes de risque intermédiaire 50%
- un groupe de risque èlevè 16,6%

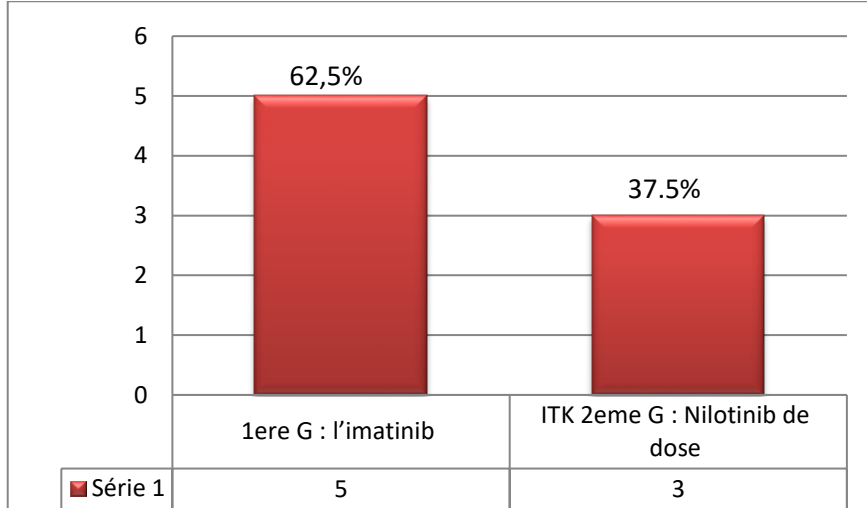


**Figure 38:** Score des patients.

On note une prédominance intermédiaire, nos résultats concorde a celui de **K. Djouadi** sur une étude **Algéro-Tunisienne** (61) qui ont observées 55,5% de risque intermédiaire

### III 4. Traitement :

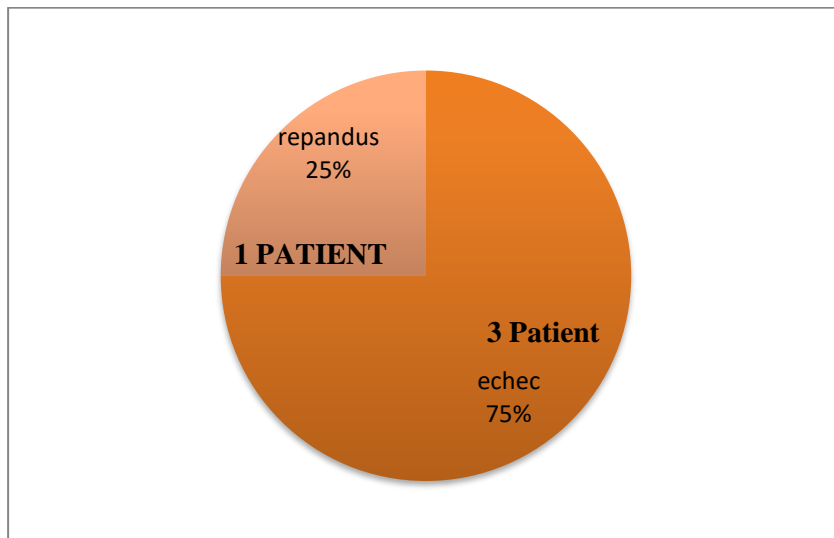
D'après nos résultats, 5 patients sont traités par ITK 1ère G : l'imatinib de dose : 400gel/jr, et 3 patients sont traités par ITK 2ème G : Nilotinib de dose : 800 gel/jr.



**Figure 39:** Le Type de traitement.

### III 4.1 Suivi des patients :

Concernant les anciens patients, ils ont été traités par les ITK de 1ère génération et 2ème génération, ces patients ont pu être classés en deux sous-groupes selon les résultats de PCR quantitatif en **répondeur (25%) et non répondeur (75%)**.



**Figure 40 :** Suivi des patients.

**Les patients qui ont rependus aux traitements :** qui représenté 25% de notre population, le type de transcrit de ce groupe est le MbcR-ABL avec un très faible taux, selon les résultats de PCR quantitatif.

A partir de la littérature il est recommandé de faire un suivi toutes les 4 semaines par RT-PCR pendant la première année de la tentative de rémission sans traitement, toutes les 6 semaines la deuxième année et toutes les 12 semaines par la suite. Il est également conseillé de rencontrer l'équipe de traitement tous les trimestres (4 fois l'an) la première année et tous les 3 à 6 mois par la suite. (62)

**Par contre, les patients qui non pas rependus aux traitements :** qui représenté 75% de notre population : les résultats à montrer deux types de transcrit de ce groupe est M et m bcr.

Cet échec de traitement est probablement dû à la résistance du patient à ces traitements (ITK 1<sup>ère</sup> génération et 2<sup>ème</sup> génération), et selon les données de littérature la cause de cette résistance est la présence des mutations ponctuelles dans le domaine de la kinase BCR-ABL1 qui altèrent la liaison aux médicaments (ITK 1<sup>ère</sup> génération et 2<sup>ème</sup> génération).

De plus, il existe d'autres mutations de la boucle d'activation de la kinase en position fermée.

Il y avait un déplacement vers le bas important de la boucle de liaison à l'ATP. Des mutations dans le domaine kinase peuvent provoquer une résistance par encombrement stérique ou élimination des liaisons hydrogène, le plus impressionnant étant la mutation T315I en position de gardien. Un autre type de mutation affecte la boucle de liaison à l'ATP, empêchant les réarrangements nécessaires à une liaison optimale du médicament. Les exemples incluent Q252H, Y253 (H/F) et E255 (K/V). (63)

Ces échecs thérapeutiques exigent à chaque fois de changer le traitement par d'autres traitements plus puissants ou ayant un spectre kinasique plus large.

L'imatinib soit vulnérable à un large éventail de mutations, le spectre est beaucoup plus limité pour le nilotinib et le dasatinib, reflétant leur plus grande puissance et, dans le cas du dasatinib, des exigences de liaison moins strictes.

L'exception à cette règle est la mutation T315I qui confère une résistance complète à tous les ITK approuvés, à l'exception du ponatinib. Pour plusieurs autres mutants, la différence de sensibilité est suffisante pour justifier l'utilisation du desatinib par rapport au nilotinib.

## ***IV. Conclusion***



Au terme de notre étude, l'utilisation des techniques biologie moléculaire dans le diagnostic et le suivi des transcrits BCR-ABL apparaît indispensable pour assurer une meilleure prise en charge des patients atteints de LMC.

La quantification des ARNm BCR-ABL1 par RT-PCR en temps réel et par la recherche des mutations du domaine kinase de BCR-ABL à l'origine de résistances plus ou moins sévères à la thérapie ciblée, constitue un bon moyen pour le diagnostic et le suivi de l'évolution de la LMC, ainsi que pour l'appréciation de la réponse moléculaire lors du traitement et l'apparition éventuelle d'une résistance conduisant à l'adaptation de celui-ci.

## ***V. Bibliographie***

1. . **Maynadié, M.** Révision de la classification des syndromes myéloprolifératifs selon l'OMS en 2016. *Revue Francophone des Laboratoires*. 2017. : (492), 25-28.
2. **Nachi, M., Guella, D., Dali-Ali, A., Abed, A., Moussaoui, R., Boukhatmi, Y., ... & Abou, O.** APPORT DE LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE DANS LA PRISE EN CHARGE DE LA LEUCÉMIE MYÉLOÏDE CHRONIQUE: EXPÉRIENCE DU SERVICE DE BIOCHIMIE DE L'EHU D'ORAN-ALGÉRIE. 2018.
3. **Cayuela, J. M., & Huguet, F.** Le diagnostic de la leucémie myéloïde chronique (LMC) en 2012. *2012*. 14(10), 561-568.
4. **Bories, D.** eucémie myéloïde chronique : la PCR quantitative en temps réel peut prévoir la réponse cytogénétique à l'imatinib. 2003.
5. **Valentina R. Minciacci 1, † , Rahul Kumar 1,† and Daniela S. Krause 1,2,3,4,5,\*.** Chronic Myeloid Leukemia: A Model Disease of the Past ,Present and Future. 2021.
6. **Marie.** lmc-france. lmc-france. [En ligne] 2022. <https://www.lmc-france.fr/la-lmc/historique-de-la-lmc/>.
7. **dictionnaire-medica.** [En ligne] <https://www.dictionnaire-medical.fr/definitions/186-hematopoiese/>.
8. **D, Dr Messala N. & Dr Seddiki-Bougrassa.** facmed-univ-oran. [En ligne] 2020. [https://facmed-univ-oran.dz/ressources/fichiers\\_produits/fichier\\_produit\\_2064.pdf](https://facmed-univ-oran.dz/ressources/fichiers_produits/fichier_produit_2064.pdf).
9. **fmedecine.univ-setif.dz.** fmedecine.univ-setif.dz. [En ligne] <https://fmedecine.univ-setif.dz/Cours/02%20H%C3%A9matopo%C3%AF%C3%A8se%20Cours%204eme%20Ann%C3%A9e%20pharmacie%20Dr%20ABBASSEN.pdf>.
10. **/www.univ-usto.dz.** [En ligne] 2017. [https://www.univ-usto.dz/faculte/fac-snv/images/Graduation\\_snv/Cours\\_en\\_Ligne/2017\\_2018/cours\\_2\\_IAP\\_tf.pdf](https://www.univ-usto.dz/faculte/fac-snv/images/Graduation_snv/Cours_en_Ligne/2017_2018/cours_2_IAP_tf.pdf).
11. **staff.univ-batna2.dz.** [En ligne] 2021. [http://staff.univ-batna2.dz/sites/default/files/karima-bendoukhane/files/embryologie-hematopoiétiques\\_2020.pdf](http://staff.univ-batna2.dz/sites/default/files/karima-bendoukhane/files/embryologie-hematopoiétiques_2020.pdf).
12. **arcagy.** [En ligne] 12 décembre 2018. <https://www.arcagy.org/infocancer/localisations/hemopathies-malignes-cancers-du-sang/leucemie-myeloide-chronique/maladie/les-quatre-compartiments-de-l-hematopoiese.html/>.
13. **fr.wikipedia.org. wikipedia.** [En ligne] 29 aout 2016. [https://fr.wikipedia.org/wiki/H%C3%A9mopathie\\_maligne..](https://fr.wikipedia.org/wiki/H%C3%A9mopathie_maligne..)
14. **Arnaud Lafon, Thomas Belangeon, Victorin Ahossi, Patrick Larras, Daniel Perrin.** Leucémie aiguë myéloïde : le tableau clinique est parfois. 2010. 16:177-181.
15. **capucine.** [En ligne] <https://www.capucine.org/s-informer/>.

- 16. T. Comont a, \*,b,c, K. Delavignea, P. Cougoul a, S. Bertoli b,c,d, E. Delabessee, P. Fenauxf.** Prise en charge des syndromes myélodysplasiques en 2019 : mise au. paris-farnce : s.n., 2019.
- 17. [En ligne]** ervices publics et Approvisionnement Canada, 2022. [https://www.btb.termiumplus.gc.ca/tpv2alpha/alpha-fra.html?lang=fra&i=1&index=frt&codom2nd\\_wet=1&srchtxt=lymphome](https://www.btb.termiumplus.gc.ca/tpv2alpha/alpha-fra.html?lang=fra&i=1&index=frt&codom2nd_wet=1&srchtxt=lymphome).
- 18. Daniel A. Arber, 1 Attilio Orazi,2 Robert Hasserjian,3 Jürgen Thiele,4 Michael J. Borowitz,5 Michelle M. Le Beau,6.** The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. 2016.
- 19. urml-normandie.** [En ligne] 2008. <https://www.urml-normandie.org/wp-content/uploads/2018/04/syndromes-my%C3%A9lprolif%C3%A9ratifs-chroniques.pdf>.
- 20. Hochhaus1, A.** European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic. 2020.
- 21. M.A, Lichtman.** Is There an Entity of Chemically Induced BCR-ABL–Positive Chronic. s.l. : The Oncologist, 2008. 645–654..
- 22. Goldman J.M., Melo J.V.** Mechanisms of disease Chronic Myeloid Leukemia -Advances. 2003. 1451–64.
- 23. Deininger M.W.N., Bose S., Gora-Tybor J. et al.** Selective Induction of Leukemiaassociated Fusion Genes by High-Dose Ionizing Radiation1. Cancer Res. 1998. 421–.
- 24. T. Leguay, F.-X. Mahon.** La leucémie myéloïde chronique. France : elsevier, 2005.
- 25. Razelle , Kurzrock, et al.** Philadelphia Chromosome–Positive Leukemias: From Basic. Texas : American College of Physician, 2003. 138:819-830.
- 26. Pascal., Treuil.** La leucémie myéloïde chronique et son traitement par l’imatinib. Actualités Pharmaceutiques. 2008. 47(473):25-30..
- 27. Lichou, Florence.** Identification et caractérisation de polymorphismes génétiques impliqués dans la réponse à l’imatinib dans la leucémie myéloïde chronique. 2019.
- 28. al, Arber DA et.** The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. 2016. Blood 2016.
29. Cytogénétique et génétique moléculaire constitutionnelles Caryotypage, FISH et puced/hybridation génomique comparative (aCGH). 2016.
- 30. C.roche-lestienne, C.Preudhomme.** Diagnostic et suivi de la leucimie myloide chronique traitée par imatinib. 2007.
- 31. Eclache V, Lejeune F. D.** Détection du chromosome Philadelphie chez les patients atteints de leucémie myéloïde chronique : Places respectives de la cytogénétique de l’hybridation in situ en fluorescence et . 26 nov 2008;2002. (339):27-31..

- 32. Chauffaille, M. D. L. F., Oliveira, J. S. R., Romeo, M., & Kerbauy, J.** Fluorescent in-situ hybridization (FISH) for BCR/ABL in chronic myeloid leukemia . 2001.
- 33. Roche-Lestienne C, Boudry-Labis E, Mozziconacci M-J.** cytogenetics in the management of “chronic myeloid leukemia”: an update by the Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH). . sept 2016. 74(5):511-5..
- 34. FX., Mahon.** Leucémie myéloïde chronique. Corresp En Onco-Hématologie. . 2012. 7(4):208-2011.
- 35. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, Kantarjian HM.** Chronic Myelogenous Leukemia: Biology and Therapy. Ann . 3 août 1999. 131(3):207..
- 36. EDOUX M P, et NATARAJAN S.** Leucémie myéloïde chronique : des questions ; CHU de Strasbourg, pôle d'onco-hématologie, France ; 19. 2013. : 128-38..
- 37. J.M., Pignon.** editor Translocation bcr-abl: méthodes diagnostiques et intérêt clinique. Annales de Biologie . 1998.
- 38. Poitras, E., & Houde, A.** La PCR en temps réel: principes et applications. Reviews in biology and biotechnology. 2002. 2(2), 2-11..
39. Baccharani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: . 2013. ;122(6):872-84..
- 40. JF., Apperley.** Chronic myeloid leukaemia. The Lancet. 2015. 2015;385(9976):1447-59..
- 41. Hehlmann R, Berger U, Pfirrmann M, Hochhaus A, Metzgeroth G, Maywald O, et al.** Randomized comparison of interferon  $\alpha$  and hydroxyurea with hydroxyurea monotherapy in . 2003. 17(8):1529-37.
- 42. Hochhaus A, O'brien S, Guilhot F, Druker B, Branford S, Foroni L, et al.** Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid . 2010. 24(5):1102.
- 43. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, et al.** Effects of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. Nature. 1996. 2(5):561-6.
- 44. Aluthgedara, W.** Quantification d'un médicament anticancéreux (imatinib) dans le plasma humain.
- 45. Weisberg E, Manley PW, Breitenstein W, Brügger J, Cowan-Jacob SW, Ray A, et al.** haracterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. Cancer cell. 2005. 7(2):129-41..
- 46. G, Etienne.** Treatment by second-generation tyrosine-kinase inhibitors in patients with . 2012. 14(10):589..
- 47. JF., Apperley.** Chronic myeloid leukaemia. The Lancet. 2015. 385(9976):1447-59..

- 48. Jorge Cortes, Carolina Pavlovsky, Susanne Saußebe.** Chronic myeloid leukaemia. USA : s.n., 2021.
- 49. Chomel<sup>1</sup>, Nathalie Sorel<sup>1</sup>Émilie Cayssials<sup>2</sup>Franc oise Brizard<sup>3</sup>Jean-Claude.** Actualisation des traitements et du suivimoléculaire dans la prise en charge de la leucémie myéloïde chronique. France : s.n., 2017.
- 50. L.Zalta, M.R, Dahméne, et al.** La leucémie myéloïde chronique : prise en charge à Oran. Service d'hématologie, CHU d'Oran, Algérie. Hématologie. 115P..
- 51. Padaro, E., Magnang, H., Layibo, Y., Mawussi, K., Kuéviakoé, I. M., Agbétiafa, K., & Vovor, A.** es transcrits bcr-abl et leurs corrélations avec l'hémogramme au cours de la leucémie myéloïde chronique (LMC) au Togo. The Pan African Medical Journal. 2018.
- 52. Dine G, Rehn Y, Brahimi S, Ali Ammar N, Gaillard B, Bocq Y, et al.** Maladie résiduelle et leucémie Immuno-Anal Biol Spéc. 2013. ;28(4):201-6..
- 53. J-C, Chomel.** Biologie moléculaire de la leucémie myéloïde chronique : dernières avancées. Rev Francoph. 2017. (492):33-40..
54. Chronic Myeloid Leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines | ESMO [Internet]. [En ligne] 22 decembre 2019. Disponible sur: <https://www.esmo.org/Guidelines/Haematological-Malignancies/Chronic-Myeloid->. [En ligne] [cité 22 déc 2019]..
- 55. F.S.D.N'Diaye, S.Fall.** Bilan d'évaluation après 33mois, de traitement par imatinib des patients suivis . 2009. 1 vol 15. 2009.112P..
- 56. Abdennebi N, Harieche F, Boukhemia F, Benakli M, Ahmed-Nacer R, Hamladji RM.** Résultats à 12 ans du traitement de la leucémie myéloïde chronique (LMC) en 1ère phase chronique par l'Imatinib 400 mg (Imatib\*). 2017.
- 57. Bade, M. A., Andia, A., Djibrilla, A., Beydou, S. S., Brah, S., Daou, M., & Adehossi, E.** inhibiteurs de la tyrosine kinase dans le traitement de la leucemie myeloïde chronique: experience du Niger. 2015.
- 58. L.Zalta, M.R, Dahméne, et al.** La leucémie myéloïde chronique : prise en charge à Oran. Service d'hématologie, CHU d'Oran, Algérie. Hématologie. .
- 59. Bade, M. A., Andia, A., Djibrilla, A., Beydou, S. S., Brah, S., Daou, M., & Adehossi, E.** inhibiteurs de la tyrosine kinase dans le traitement de la leucemie myeloïde chronique: experience du Niger. 2015.
- 60. Kueviakoe, M. I., Agbetiafa, K., Padaro, E., Layibo, Y., Kolou, M., Amavi, T., &.** Profil évolutif des patients souffrant de leucemie myeloïde chronique sous imatinib au Togo: etude de 63 cas colliges en 10 ans au chu-campus de Lome. Journal de . 2014.
- 61. Djouadi, K. A. N., & Harieche, F.** Approche épidémiologique de la leucémie myéloïde chronique Etude Algéro-Tunisienne à propos de 1349 cas sur 05 ans (2010 à 2014). Revue Algérienne d'Hématologie., 2017.

62. Rémission sans traitement chez des patients atteints de leucémie myéloïde chronique. 2018.

63. Leukemia, Diagnosing and Managing Advanced Chronic Myeloid. Michael W. Deininger, MD, PhD. 2015.

**64. Virginie Eclache a, \*, Franooise Lejeune. PHILADELPHIE, DETECTION DU CHROMOSOME CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE LEUCI MIE MYI LOIDE CHRONIQUE . Paris : s.n., 2001.**

## ***VI. Annexe***



## **Annexe 01 : La classification de leucémie myéloïde chronique selon OMS 2016**

### **Myeloproliferative neoplasms (MPN)**

- Chronic myeloid leukemia (CML), BCR-ABL11
- Chronic neutrophilic leukemia (CNL)
- Polycythemia vera (PV)
- Primary myelofibrosis (PMF)
- PMF, prefibrotic/early stage
- PMF, overt fibrotic stage
- Essential thrombocythemia (ET)
- Chronic eosinophilic leukemia, not otherwise specified (NOS)
- MPN, unclassifiable
- Mastocytosis

### **Myeloid/lymphoid neoplasms with eosinophilia and rearrangement of PDGFRA, PDGFRB, or FGFR1, or with PCM1-JAK2**

- Myeloid/lymphoid neoplasms with PDGFRA rearrangement
- Myeloid/lymphoid neoplasms with PDGFRB rearrangement
- Myeloid/lymphoid neoplasms with FGFR1 rearrangement
- Provisional entity: Myeloid/lymphoid neoplasms with PCM1-JAK2

### **Myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms (MDS/MPN)**

- Chronic myelomonocytic leukemia (CMML)
- Atypical chronic myeloid leukemia (aCML), BCR-ABL12
- Juvenile myelomonocytic leukemia (JMML)
- MDS/MPN with ring sideroblasts and thrombocytosis (MDS/MPN-RS-T)
- MDS/MPN, unclassifiable

### **Myelodysplastic syndromes (MDS)**

- MDS with single lineage dysplasia
- MDS with ring sideroblasts (MDS-RS)
- MDS-RS and single lineage dysplasia
- MDS-RS and multilineage dysplasia
- MDS with multilineage dysplasia
- MDS with excess blasts
- MDS with isolated del(5q)
- MDS, unclassifiable
- Provisional entity: Refractory cytopenia of childhood
- Myeloid neoplasms with germ line predisposition

### **Acute myeloid leukemia (AML) and related neoplasms**

- AML with recurrent genetic abnormalities
- AML with t(8;21)(q22;q22.1);RUNX1-RUNX1T1
- AML with inv (16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22);CBFB-MYH11
- APL with PML-RARA
- AML with t (9 ;11)(p21.3;q23.3);MLLT3-KMT2A
- AML with t (6 ;9)(p23;q34.1);DEK-NUP214
- AML with inv (3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM
- AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13.3;q13.3);RBM15-MKL1
- Provisional entity : AML with BCR-ABL1
- AML with mutated NPM1
- AML with biallelic mutations of CEBPA
- Provisional entity : AML with mutated RUNX1
- AML with myelodysplasia-related changes
- Therapy-related myeloid neoplasms
- AML, NOS
- AML with minimal differentiation
- AML without maturation
- AML with maturation
- Acute myelomonocytic leukemia
- Acute monoblastic/monocytic leukemia
- Pure erythroid leukemia
- Acute megakaryoblastic leukemia
- Acute basophilic leukemia
- Acute panmyelosis with myelofibrosis
- Myeloid sarcoma
- Myeloid proliferations related to Down syndrome
- Transient abnormal myelopoiesis (TAM)
- Myeloid leukemia associated with Down syndrome

### **Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm**

- Acute leukemias of ambiguous lineage
- Acute undifferentiated leukemia
- Mixed phenotype acute leukemia (MPAL) with t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1
- MPAL with t(v;11q23.3); KMT2A rearranged
- MPAL, B/myeloid, NOS
- MPAL, T/myeloid, NOS

### **B-lymphoblastic leukemia/lymphoma**

- B-lymphoblastic leukemia/lymphoma, NOS
- B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with recurrent genetic abnormalities

- B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(9;22)(q34.1;q11.2);BCR-ABL1
- B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(v;11q23.3);KMT2A rearranged
- B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(12;21)(p13.2;q22.1); ETV6-RUNX1
- B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with hyperdiploidy
- B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with hypodiploidy
- B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(5;14)(q31.1;q32.3) IL3-IGH
- B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(1;19)(q23;p13.3);TCF3-PBX1
- Provisional entity: B-lymphoblastic leukemia/lymphoma, BCR-ABL1-like
- Provisional entity: B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with iAMP21





### T-lymphoblastic leukemia/lymphoma

- Provisional entity: Early T-cell precursor lymphoblastic leukemia
- Provisional entity: Natural killer (NK) cell lymphoblastic leukemia/lymphoma

### Annexe 02 : La fiche de renseignement


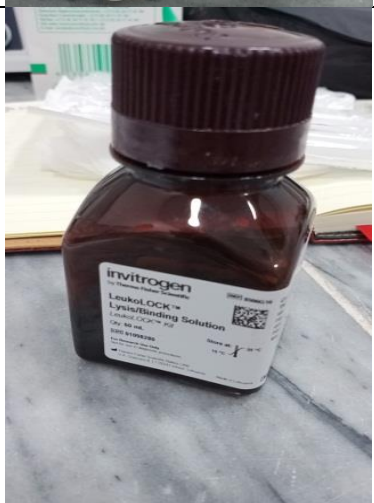
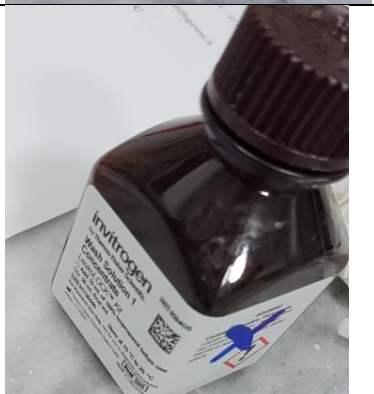
<b>Services hématologie, CAC Blida</b> <b>Fiches de renseignements</b> <b>Recherche transcrits BCR-ABL</b> <small>2 tubes sangs total sur EDTA bien remplis</small>	
Nom : ..... Prénom : ..... Age : ..... Adresse : ..... Profession : .....	Date : ..... Service : ..... Médecin traitant : .....
Date de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

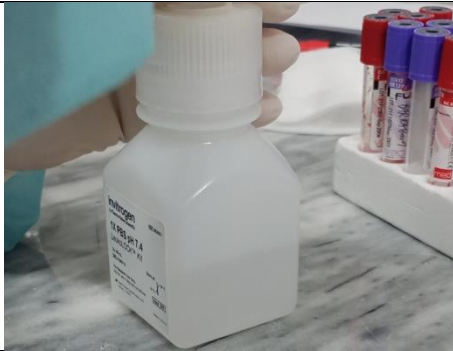
**Annexe03 : matériel consommable**

	<p><b>Micropipettes (5µl, 10µl, 20µl, 100µl, 500µL, réglable)</b></p>
	<p><b>Embouts jaunes et bleus</b></p>
	<p><b>Portoirs</b></p>
	<p><b>Eppendorf</b></p>

**Annexes 04 : Réactifs**

**Matériel fournis par Le kit « AMBION RNA LeukoLOCK total RNA Isolation System »:**

	<p>-</p> <p><b>le RNA Later</b></p>
	<p><b>Lysis/Binding Solution.</b></p>
	<p><b>Wash solution</b></p>

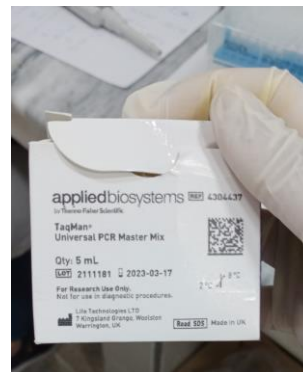


**le tampon PBS**

**Réactif fournis par High-Capacity  
cDNA Reverse Transcription :**



**Réactif fournis pour PCR réaction  
mix :**



Réactif fournis  
par ispongen  
BCR-ABL M  
mbr kit:



Réactif fournis  
par ispongen  
BCR-ABL  
Mbr kit:



**Annexe 05 : Les résultats de quantification de nos patients (Mbc-abl et mbc-  
abl) :**

**1ere cas :**

Sexe : femme

Age : 53ans

Type de mutations : Mbc-ABL

Patient : Nouveau

Phase dévolution : Phase chronique

**Renseignements clinico-biologiques au moment de diagnostic :**

- SPMG : type III
- Autre : douleur osseuses
- GB : 246950 /ml
- HB : 11 g/l
- Myèlemie : 36%
- Blastes : 2%

**Score de sokal : intermédiaire**

- Taille de la rate : 11cm
- NB de plaquettes (G /L) :248000

**Traitement :**

- Hydroxyure avec dose 5gel/jr
- ITK 1<sup>ere</sup>G : imatinib dose : 400gel/jr

**Biologie Moléculaire :**

	Résultats
Nombre de copies (/µl) (M-BCR)	253,11
Nombre de copies (/µl) (mBCR)	-----
Nombre de copies control endogène (/µl)	42 ,88
Normalized Copy Numbers (NCN)	590 ,24 %

- **présence de Mbc-ABL**



**2eme cas :**

Sexe : Femme.

Age : 60 ans.

Type de mutation : Mbcr-ABL.

Patient : nouveaux

Phase dévolution : Phase chronique

**Renseignements clinico-biologiques :**

- SPMG : type III
- Autre : /
- GB : 499610/ml
- HB : 7 g/ml
- Myèlemie : 52%
- Blastes : 3%

**Score de sokal : Bas**

- Taille de la rate : 12cm
- NB de plaquettes (G /L) :303000

**Traitement :**

- Hydroxyure avec dose 5gel/jr
- ITK 1<sup>ere</sup>G : imatinib dose : 400gel/jr

**Biologie Moléculaire :**

	Résultats
Nombre de copies (/µl) (M-BCR)	754.33
Nombre de copies ( /µl) (mBCR)	-----
Nombre de copies control endogène ( /µl)	4228.67
Normalized Copy Numbers (NCN)	17.83

**1 mois de traitement : présence de Mbcr-ABL.**

**3eme cas :**

Sexe : Femme.

Age : 41ans.

Type de mutation : MbcR-ABL

Patient : nouveau

Phase dévolution : Phase chronique

**Renseignements clinico-biologiques au moment de diagnostic :**

- SPMG : type III
- Autre : /
- GB : 84380
- HB : 9,9 g/ml
- Myèlemie : 41%
- Blastes : 4%

**Score de sokal : intermédiaire**

- Taille de la rate : 12cm
- NB de plaquettes (G /L) :303000

**Traitement :**

- Hydroxyure avec dose 5gel/jr
- ITK 1<sup>ere</sup>G : imatinib dose : 400gel/jr

**Biologie Moléculaire :**

	Résultats
Nombre de copies (/µl) (M-BCR)	563.69
Nombre de copies (/µl) (mBCR)	-----
Nombre de copies control endogène ( /µl)	2605.56
Normalized Copy Numbers(NCN)	21.63

**présence de MbcR-ABL**

**4eme cas :**

Sexe : Femme.

Age : 63ans.

Type de mutation : MbcR-ABL.

Patient : nouveau

Phase dévolution : Phase chronique

**Renseignements clinico-biologiques au moment de diagnostic :**

- SPMG : 0
- Autre : /
- GB: 519300 /ml
- HB : 11g/ml
- Myèlemie : 23%
- Blastes : 0%

**Score de sokal : /**

- Taille de la rate : 0
- NB de plaquettes (G /L) :193000

**Traitement :**

- Hydroxyure avec dose 5gel/jr
- ITK 1<sup>ere</sup>G : imatinib dose : 400gel/jr

**Biologie Moléculaire :**

	Résultats
Nombre de copies (/µl) (M-BCR)	1087.26
Nombre de copies (/µl) (mBCR)	-----
Nombre de copies control endogène (/µl)	666.62
Normalized Copy Numbers (NCN)	163.09

- **présence de MbcR-ABL**

**5eme cas :**

Sexe : Homme

Age : 59

Type de mutation : MbcR-ABL et mbcR-ABL

Patient : ancien

Phase dévolution : Phase chronique

**Renseignements clinico-biologiques au moment de diagnostic :**

- SPMG : type III
- Autre: /
- GB : 640660/ml
- HB : 11,4 g/ml
- Myèlemie : 24%
- Blastes : 0%

**Score de sokal : intermédiaire**

- Taille de la rate : 14 cm
- NB de plaquettes (G /L) :150 000

**Traitement :**

- Hydroxyure avec dose 9gel/jr
- ITK 1<sup>ere</sup>G : imatinib dose : 400gel/jr
- ITK 2<sup>eme</sup> G : Nilotinib dose : 800 gel/jr

**Reponse au traitement :**

- Hématologique : Echec
- Cytogénétique : Echec
- Type RC :

**Biologie Moléculaire :**

	Résultats
Nombre de copies (/µl) (M-BCR)	2075,59
Nombre de copies (/µl) (mBCR)	Dépistage positif
Nombre de copies control endogène (/µl)	1275,91
Normalized Copy Numbers (NCN)	162,67

**Présence de MbcR-ABL. Par ailleurs le mBCR-ABL, la Technique a révèlé un taux faible au dépistage et indétectable a la quantification.**

**6eme cas :**

Sexe : Homme.

Age : 55 ans.

Type de mutation : MbcR-ABL et mbcR-ABL.

Patient : Ancien

Phase dévolution : Phase chronique

**Renseignements clinico-biologiques au moment de diagnostic :**

- SPMG : type III
- Autre : /
- GB : 119640/ml
- HB : 12,6g/ml
- Myèlemie : 45%
- Blastes : 0%

**Score de sokal : intermédiaire**

- Taille de la rate : 8cm
- NB de plaquettes (G /L) :1170 00

**Traitement :**

- Hydroxyure avec dose 5gel/jr
- ITK 1<sup>ere</sup>G : imatinib dose : 400gel/jr
- ITK 2<sup>eme</sup> G : Nilotinib dose : 800 gel/jr

**Reponse au traitement :**

- Hématologique :
- Cytogénétique : Echec
- Type RC : Echec

**Biologie Moléculaire :**

	Résultats
Nombre de copies (/µl) (M-BCR)	4269,08
Nombre de copies (/µl) (mBCR)	Dépistage positif
Nombre de copies control endogène (/µl)	3050,23
Normalized Copy Numbers (NCN)	140,84

- **échec anciens patients**

**7eme cas :**

Sexe : Femme.

Age : 46 ans.

Type de mutation : MbcR-ABL.

Patient : ancien.

Phase dévolution : /

**Renseignements clinico-biologiques au moment de diagnostic :**

- SPMG : 0
- Autre : /
- GB : 60770/ml
- HB : 14,1g/ml
- Myèlemie : 28%
- Blastes : 0%

**Score de sokal : Bas**

- Taille de la rate : 0 cm
- NB de plaquettes (G /L) :253000

**Traitement :**

- Hydroxyure avec dose 5gel/jr
- ITK 1<sup>ere</sup>G : imatinib dose : 400gel/jr

**Repense au traitement :**

- Hématologique : Oui
- Cytogénétique : non faite
- Type RC :

**Biologie Moléculaire :**

	Résultats
Nombre de copies (/µl) (M-BCR)	1.36
Nombre de copies (/µl) (mBCR)	-----
Nombre de copies control endogène ( /µl)	423,43
Normalized Copy Numbers(NCN)	0,32

**Présence d'une très faible de copies de transcrits M-BCR**

**8eme cas :**

Sexe : Femme.

Age : 53ans.

Type de mutation : Mbcr-ABL et mbcr-ABL.

Patient : ancien

Phase dévolution : Phase chronique

**Renseignements clinico-biologiques au moment de diagnostic :**

- SPMG : type
- Autre : /
- GB: 407120 /ml
- HB : 9, 3 g/ml
- Myèlemie : 55%
- Blastes : 5%

**Score de sokal : Elevé**

- Taille de la rate : 15cm
- NB de plaquettes (G /L) :386000

**Traitement :**

- Hydroxyure avec dose 5gel/jr
- ITK 1<sup>ere</sup>G : imatinib dose : 400gel/jr
- ITK 2<sup>eme</sup> G : Nilotinib dose : 800 gel/jr

**Reponse au traitement :**

- Hématologique : Echec
- Cytogénétique : Echec
- Type RC:/

**Biologie Moléculaire :**

	Résultats
Nombre de copies (/µl) (M-BCR)	2075.19
Nombre de copies (/µl) (mBCR)	Dépistage positif
Nombre de copies control endogène ( /µl)	2231.25
Normalized Copy Numbers(NCN)	93.00

- **présence de Mbcr-ABL.**