

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université 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 d'un Diplôme de master II

Option : Biologie Cellulaire et Moléculaire

**Etude de l'expression du gène BCR-ABL dans le
diagnostic et le suivi de la leucémie myéloïde chronique**

Réalisé par :

AMMARMOUHOUB Fedoua

EL-BOUZIRI Nouceyba

Soutenu publiquement devant le jury composé de :

| | | | |
|--------------------------|-----|-------|---------------|
| Mme. ABDUL HUSSEIN A.S. | MCB | USDB1 | Présidente |
| Mme. BENAZZOUZ F. | MAA | USDB1 | Examinatrice |
| Mme. BOUCHAKOR MOUSSA Y. | MCB | USDB1 | Promotrice |
| Mlle. CHALAL N. | MCB | USDB1 | Co-promotrice |

2018/2019

Remerciements

En tout premier lieu, nous remercions le bon dieu, tout puissant de nous avoir donné la force pour survivre, ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés.

Nous tenons à remercier le **Professeur BRADAI** qui nous a accepté pour faire notre stage pratique au sein de laboratoire d'hématologie sans oublier de remercier

Monsieur Yacine et le **Professeur TAOUSSI** pour leurs aides.

Nous désirons adresser toutes reconnaissances à la promotrice de ce mémoire **Madame BOUCHAKOR..M.Y** pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter notre réflexion et ses orientations ficelées tout au long de notre recherche.

Nous tenons à remercier notre Co-promotrice

Madame CHALAL.N pour ses bonnes explications qui nous ont éclairé le chemin de la recherche et de la rédaction de ce mémoire ; pour ses précieux conseils et son aide durant la période de travail.

Nous souhaitant adresser nos remerciements au notre chef d'option

Madame SAADIL

Pour la richesse et la qualité de leur enseignement et qui déploient de grands efforts pour assurer à leurs étudiants une formation actualisée.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury

Madame ABDEL HUSSEIN A.S et

Madame BENZAOUZ.F

Pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes de laboratoire de cytogénétique y compris **Nawel, Khadidja** et **Naziha** pour leurs aides, leurs explications et leurs patientes.

Dédicace: Fedoua

Je dédie ce modeste travail à :

Mes très chers parents qui ont comblé ma vie de tendresse, d'affection et de compréhension, à ceux qui se sont sacrifiés pour mon bonheur et ma réussite, qui m'ont épaulée et encouragée durant ces dernières années. Rien au monde ne pourrait compenser les efforts et les sacrifices qu'ils ont consentis à mon égard afin que je puisse poursuivre mes études dans les meilleures conditions qui soient. Que Dieu leur procure santé, bonheur et longue vie.

Mes adorables frères, **Abderrahmane, Oussama et Abdou.**

A **mes grands-parents** pour leur amour et leur aide. Je vous aime.

Mon mari **Moussa** qui a toujours été à mes côtés.

A ma très chère binôme **Nouceyba**, merci pour ton sérieux et ta patience pour réaliser ce travail ensemble. Je te souhaite que le bonheur et la réussite dans ta vie.

Tous mes amis en particulier, **Khawla, Madina, Nesrine et Saadia.**

Tous ceux qui me connaissent et à tous ceux qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à l'aboutissement de ce projet.

Dédicace: Nouceyba.

A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leurs amour, leurs soutien et leurs prières
tout au long de mes études. Je vous aime.

A ma très chère sœur **Asma** pour son soutien moral.

A mes chers frères, **Khaled** , **Abdelkarim** et leurs femmes pour leur appui et leur
encouragement.

A mon neveu **Abdelmalek**, et ma nièce **Rokayya**

A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire.

A ma très chère binome **Fedoua** , merci pour ton sérieux et tes sacrifices pour realiser ce
travail ensemble . Je te souhait le bonheur dans toute ta vie personnelle et professionnelle.

A mes chères Amies , **Sarra**, **Bouthayna**, **Noussaiba**, et **Madina**.

A toute la promo BCM 2018/2019 surtout **Khaoula**.

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien
infaillible,

Merci d'être toujours là pour moi.

Résumé

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une hémopathie maligne qui se traduit par la prolifération clonale touchant la lignée granuleuse . Elle est caractérisée par une anomalie cytogénétique quasiment constante: le chromosome de Philadelphie. Elle représente environ 15 à 20% des leucémies de l'adulte avec une incidence variant de 1 à 1.5 cas pour 100000 personnes/an. A travers notre étude, nous avons mis en évidence l'intérêt des techniques biomoléculaires, notamment la PCR geneXpert, dans le diagnostic et suivi moléculaire des patients atteints de LMC sous traitement par antityrosine kinase de première génération en première ligne l'Imatinib. Il s'agit d'une étude rétrospective allant du 1 février au 1 mai 2019 réalisée au sein du laboratoire de cytogénétique conventionnel moléculaire du service d'hématologie de l'EHS ELCC ,Blida, portant sur 22 patients atteints de LMC sous Imatinib. Les résultats de notre étude révèlent que l'âge moyen des patients était de 45 ans avec une prédominance masculine. Une splénomégalie a été retrouvée chez 72% des patients et une hyperleucocytose majeure a été observée chez tous nos patients. Le taux moyen d'hémoglobine était de 10,37gr/dl. Un taux moyen de plaquettes de 430136,36 éléments/mm³ a été également noté. L'analyse du frottis sanguins a montré une myélémie avec un taux moyen de 38,54% .Une hyperplasie granuleuse majoritaire a été décelée chez 100% des cas au medullogramme. Une translocation (9,22)(q34 ;q11) a été détectée chez tous nos patients au caryotype. Un signal de fusion BCR-ABL par FISH avec un taux allant de 85 à 100% a été également décelé. A l'évaluation, une réponse optimale a été obtenue chez 12 cas dont 31,81% étaient en rémission moléculaire majeure(RMM) chez qui l'Imatinib a été poursuivi; un avertissement a été observé chez 2 cas et un échec thérapeutique chez 8 cas qui ont nécessité un switch vers un antityrosine kinase de deuxième génération le Dasatinib et/ou le Nilotinib . La PCR automatisée est devenue un outil essentiel au diagnostic et au suivi des patients atteints de LMC dont le but est d'évaluer la réponse moléculaire et conditionner la poursuite de l'antityrosine kinase .

Mots clés : leucémie myéloïde chronique, PCR geneXpert, diagnostic, suivi, antityrosine kinase.

ABSTRACT

Chronic myeloid leukemia (CML) is a hematological malignancy that results in clonal proliferation affecting the granular cell lines. This type of cancer is characterized by a cytogenetic anomaly which is the Philadelphia chromosome. It accounts for up to 20% of adults with an incidence ranging from 1 to 1.5 cases per 100,000 people / year. The present study aimed to reveal the importance of geneXpert PCR as a biomolecular technique, in the diagnosis as well as the follow-up of patients with CML under anti-tyrosine kinase, first generation treatment namely, Imatinib. A 4 month retrospective study was conducted on 22 CML patients under Imatinib treatment, within the conventional molecular cytogenetics laboratory in the hematology service of Blida . The findings of this study showed that the mean age of patients was 45 years old along with a male predominance. Splenomegaly was found in 72% of patients and major leukocytosis was observed in all patients. The average hemoglobin level was 10.37gr / dl. An average platelet count of 430136.36 elements / mm³ was also noted. The blood smear analysis showed a myelemia with an average rate of 38.54%. A major granular hyperplasia was detected in 100% of the cases by the medullogram. A translocation (9.22) (q34; q11) was detected in all our patients via karyotyping. A BCR-ABL fusion signal by FISH with a rate ranging from 85 to 100% was also reported. At the evaluation phase, an optimal response was noticed in 12 cases, of which 31.81% were in major molecular remission (RMM) in whom, Imatinib was continued; a warning was observed in 2 cases and finally, a therapeutic failure was reported in 8 cases that required aswitch toward a second-generation anti-tyrosine kinase Dasatinib and / or Nilotinib. To conclude, automated PCR has become an essential tool for the diagnosis and follow-up of CML patients and thereby, evaluating the molecular response and guiding the therapeutic decisions.

Keywords: chronic myeloid leukemia, geneXpert PCR, diagnosis, follow-up, anti-tyrosine kinase.

ملخص!

سرطان الدم النخاعي المزمن هو ورم خبيث في الدم يؤدي إلى تكاثر خلايا السلالة الحبيبية. ويتميز في الغالب بشذوذ خلوي : الكروموسوم فيلادلفيا. يمثل حوالي 15 إلى 20 ٪ من سرطان الدم عند البالغين و إمكانية الإصابة به تتراوح بين 1 و 1.5 حالة لكل 100 000 شخص / سنة. من خلال دراستنا ، سلطنا الضوء على أهمية تقنيات البيولوجيا الجزيئية ، بما في ذلك تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل الآلية بواسطة geneXpert ، في التشخيص والمتابعة الجزيئية للمرضى الذين عولجوا بأول جيل من مضادات التيروزين كيناز (إيماتينيب). هذه دراسة بأثر رجعي في الفترة من 1 فبراير إلى 1 مايو 2019 أجريت في مختبر أمراض الدم ، البلدية ، والتي شملت 22 مريضا مصابون بسرطان الدم النخاعي المزمن و الذين يتعاطون الإيماتينيب. تكشف نتائج دراستنا أن متوسط عمر المرضى كان 45 عامًا و الغالبية من الذكور . تم تشخيص تضخم الطحال عند 72 ٪ من المرضى ولوحظ زيادة عدد الكريات البيضاء عند جميع المرضى. متوسط مستوى الهيموغلوبين 10.37 غ / دل. ولوحظ أيضًا أن متوسط عدد الصفائح الدموية هو 430136.36 / مم³. كما أظهر تحليل شريحة الدم أن معدّل المايلومية بلغ 38.54 ٪. تم تسجيل تضخم حبيبي كبير في كل الحالات بعد تحليل شريحة الدم المأخوذ من نخاع العظم . تم اكتشاف الانتقال المتبادل بين الكروموزومين (9.22) عند جميع المرضى بواسطة الكاريوتيب كما تم اكتشاف إشارة تجاوز المورثتين BCR-ABL بواسطة التهجين الموضعي المضنيء بمعدل يتراوح من 85 إلى 100 ٪. عند التقييم ، تم الحصول على استجابة مثالية في 12 حالة ، 31.81 ٪ منهم سجّلوا تناقص جزيئي كبير والتي استمر فيها العلاج بواسطة الإيماتينيب ؛ وقد لوحظ وجود انتكاس في حالتين وفشل علاجي في 8 حالات تطلب التبديل إلى الجيل الثاني من مضادات التيروزين كيناز و هي : دازاتينيب و / أو نيلوتينيب . أصبحت تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل الآلية بواسطة geneXpert أداة أساسية في تشخيص ومراقبة مرضى سرطان الدم النخاعي المزمن وهدفهم هو تقييم الاستجابة الجزيئية و إمكانية استمرار العلاج بمضادات التيروزين كيناز .

الكلمات الدالة : سرطان الدم النخاعي المزمن ، تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل الآلية بواسطة geneXpert ، التشخيص ، المتابعة العلاجية ، مضادات التيروزين كيناز .

Glossaire

Anémie modérée : Taux d'hémoglobine entre 8 et 10 gr/dl .

Anémie sévère : Taux d'hémoglobine inférieur à 8 gr/dl.

Hyperleucocytose :Taux de globule blanc supérieur à 10000gr/mm³.

Hyperplasie granuleuse :Est un terme médical désignant une augmentation du nombre des cellule de la ligné granuleuse .

Myélémie : Passage dans le sang de cellules immatures de la lignée granulocytaire.

Splénomégalie :Augmentation anormale du volume de la rate.

Thormbocytose : Est une anomalie sanguine caractérisée par une augmentation de nombre de plaquettes, ou thrombocytes, dans le sang.

Liste des abréviations

ABL: Abelson

Bap-1: BCR associated protein 1

BCR: Breakpoint Cluster Region

EAC: Europe Against Cancer

EDTA: ÉthylèneDiamineTétraAcétique

ELN: European Leukemia Net

FISH : Fluorescence In Situ par Hybridation

FNS : Formule de Numération Sanguine

GAP: GTPases-activating protein

GDP: GuanosineDiphosphate

GTP: Guanosine Triphosphate

GVH: Graft-versus-host disease

IRMM: Institut de référence et mesures

ITK: Inhibiteur de Tyrosine Kinase

LMC: LeucémieMyéloïdeChronique

M BCR-ABL Major BCR-ABL

m BCR-ABL: Minor BCR-ABL

μ BCR-ABL: Micro BCR-ABL

MEK: MAP ERK Kinase

Ph: Philadelphie

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase

PN: Polynucléaires Neutrophile

RCH: Réponse Hématologique Complète

RCyC: Réponse Cytogénétique Complète

Rho-GEF: Guanine nucleotide Exchange Factor

RMM: Réponse Moléculaire Majeure

RT-PCR: Real Time PCR

SH: src-homology domain

SOS: protéine Son Of Sevenless

STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1: Représentation schématique de l'hématopoïèse normale et leucémique | 1 |
| Figure 2: Schéma de la translocation avec les transcrits les plus fréquents | 2 |
| Figure 3: Les différents points de cassures. | 5 |
| Figure 4: Structure de la protéine ABL | 5 |
| Figure 5 : DTK d'ABL et mécanisme d'action | 6 |
| Figure 6 : Structure de la protéine BCR | 7 |
| Figure 7 : Voies de signalisation activées dans les cellules Bcr-Abl positives. | 8 |
| Figure 8 : Voies de signalisation avec un potentiel mitogénique dans les cellules transformées Bcr-Abl..... | 10 |
| Figure 9 : Image d'un frottis de sang dans la LMC (Myélemie) | 11 |
| Figure 10: Caryotype médullaire montrant un chromosome 22 raccourcis correspondant au chromosome Philadelphie et un chromosome 9 plus long (der9) | 12 |
| Figure 11: observation de fluorescence par microscope à épi fluorescence (Zeiss®) | 12 |
| Figure 12: Un exemple sur un patient diagnostiqué par PCR en temps réel | 13 |
| Figure 13 : Arbre décisionnel des différents choix thérapeutiques de la LMC | 15 |
| Figure 14: Mode d'action de l'Imatinib | 17 |
| Figure 15: Répartition des patients selon la tranche d'âge. | 25 |
| Figure 16: Répartition des patients selon le sexe. | 25 |
| Figure 18: Répartition des patients selon la présence ou l'absence de la splénomégalie. | 26 |

| | |
|---|----|
| Figure 17 : Distribution des patients selon l'origine..... | 26 |
| Figure 19 : Distribution des patients selon le taux de leucocyte..... | 27 |
| Figure 21 :Pourcentage de l'utilisation de la PCR automatisée pour le diagnostic. | 29 |
| Figure 22 : Répartition des patients selon les phases de la maladie..... | 30 |
| Figure 23 : Division des patients selon le score de Sokal. | 30 |
| Figure 24 : Résultats du transcrit bcr/abl après 3 mois de traitement. | 32 |
| Figure 25 : Résultats du transcrit bcr/abl à 6 mois. | 32 |
| Figure 26 : Résultats de transcrit bcr/abl après 12 mois de traitement..... | 33 |
| Figure 27 : Résultats du transcrit bcr/abl après 18 mois de traitement. | 34 |
| Figure 28 : Résultats du transcrit bcr/abl après 24 mois et plus de traitement..... | 34 |
| Figure 29 :Résultats de suivi moléculaire du patient N°1..... | 35 |
| Figure 30 : Résultats de suivi moléculaire du patient N°2..... | 36 |
| Figure 31 : Résultats de suivi cytogénétique du patient N°3. | 37 |
| Figure 32 : Résultats de suivi moléculaire du patient N°3..... | 37 |
| Figure 33 :Résultatsde suivi cytogénétique du patient N°4. | 38 |
| Figure 34 : Résultats de suivi moléculaire de patient N°4..... | 38 |
| Figure 35 : Résultats de suivi cytogénétique du patient N°5. | 39 |
| Figure 36 :Résultats de suivi moléculaire du patient N°5..... | 39 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1: Les principaux transcrits mis en évidence | 13 |
| Tableau 2: Définition de la réponse aux inhibiteurs de la tyrosine Kinase (ITK) en première ligne de traitement | 19 |
| Tableau 3 : Définition de la réponse aux inhibiteurs de la tyrosine Kinase (ITK) en seconde ligne de traitement | 19 |
| Tableau 4 : Répartition des patients selon le taux d'hémoglobine. | 27 |
| Tableau 5: Répartition des patients selon le taux de plaquettes. | 28 |

Sommaire

CHAPITRE I

| | |
|--|----------|
| I. LEUCEMIE MYELOIDE CHRONIQUE..... | 1 |
| I.1 Généralités | 1 |
| I.2 Historique..... | 2 |
| I.3 Epidémiologie | 3 |
| I.4 Etiologie | 3 |
| I.5 Physiopathologie | 4 |
| I.5.1. Mécanisme moléculaire | 4 |
| I.5.2. Fonctions de la protéine ABL..... | 5 |
| I.5.3. Fonctions de la protéine BCR..... | 6 |
| I.5.4. Signalisation induite par les oncogènes bcr-abl | 7 |
| I.5.5. Mécanismes d'action du gène BCR-ABL | 8 |
| I.6 Diagnostic | 10 |
| I.6.1. Circonstances de découverte et tableau clinique | 10 |
| I.6.2. Diagnostique biologique..... | 10 |
| I.6.3. Diagnostic cytologique | 11 |
| I.6.4. La Biologie Moléculaire | 12 |
| I.7 Score Pronostic | 14 |
| I.7.1. Indice de Sokal | 14 |
| I.7.2. Indice de Hasford ou score EURO | 14 |
| I.7.3. Score EUTOS | 14 |
| I.8 Evolution de la LMC..... | 14 |
| I.9 Traitement | 15 |
| I.9.1. Chimiothérapie conventionnelle..... | 15 |
| I.9.2. Inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK)..... | 16 |
| I.10 Evaluation de réponse au traitement | 18 |
| I.10.1. La réponse hématologique complète | 18 |
| I.10.2. La réponse cytogénétique | 18 |

CHAPITRE II

| | |
|---|-----------|
| II. PATIENTS ET METHODES..... | 20 |
| II.1 Patients | 20 |
| II.2 Méthodes | 20 |
| II.2.1. Prélèvements et comptage | 20 |
| II.2.2. Hémogramme | 21 |
| II.2.3. Frottis sanguin | 21 |
| II.2.4. Médullogramme (ou myélogramme)..... | 21 |
| II.2.5. La Mise en culture et sortie de culture pour le diagnostic de la LMC par caryotype et par FISH | 21 |
| II.2.6. La biologie moléculaire par Gene-Xpert PCR Ultra pour le suivi moléculaire des patients sous traitement | 23 |
| II.3 Analyse statistique | 24 |

CHAPITRE III

| | |
|--|-----------|
| III. RESULTATS | 25 |
| A. Au diagnostic..... | 25 |
| III.1 Plan biologique | 27 |
| III.1.1. Hémogramme | 27 |
| III.1.2. Frottis sanguin | 28 |
| III.1.3. Myélogramme..... | 28 |
| III.1.4. Caryotype et /ou FISH..... | 28 |
| III.1.5. Biologie Moléculaire | 29 |
| III.2 Phases de la maladie | 29 |
| III.3 Score Pronostique | 30 |
| B. Traitement..... | 31 |
| III.1 Le suivi dutraitement | 31 |
| III.2 La réponse au traitement de première ligne..... | 31 |
| III.3 Réponse à 3 mois | 31 |
| III.4 Réponse à 6 mois | 32 |
| III.5 Réponse à 12 mois | 33 |
| III.6 Réponse à 18 mois | 33 |
| III.7 Réponse à 24 mois : | 34 |
| III.8 Illustration de cas selon la réponse au traitement | 34 |

CHAPITRE IV

| | |
|--|-----------|
| IV. DISCUSSION..... | 41 |
| CONCLUSION | 45 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES | 46 |
| ANNEXES | 54 |

Introduction

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une néoplasie myéloproliférative chronique rare affectant les cellules hématopoïétiques. Elle est typiquement associée à une anomalie chromosomique acquise : le chromosome de Philadelphie. Ce dernier est issu d'une translocation $t(9:22)(q34;q11)$ engendrant la formation d'un gène de fusion BCR et ABL1 codant une protéine de fusion à forte activité tyrosine kinase constitutive, un marqueur moléculaire des cellules leucémiques.

En Algérie, ce type de cancer a enregistré une prévalence passant de 472 cas en 2004 à 1330 cas en 2014, avec une incidence de 0.40 à 0,53/100.000 habitants en 2014[1]. Selon le groupe algérien de travail sur la LMC (GAT-LMC), les moyens de confirmation diagnostique et de suivi moléculaire demeurent très insuffisants dans notre pays, puisqu'à ce jour, seulement 39% ont pu bénéficier des tests biomoléculaires. Ainsi, en l'absence de ces moyens, la prise en charge des patients pose un problème de santé publique majeur, notamment en ce qui concerne le suivi des malades sous Imatinib. Ces derniers peuvent, à défaut de dépistage précoce, développer des résistances au traitement, aboutissant éventuellement à des épisodes brusquement fatals.

En l'absence d'une prise en charge adéquate, la LMC fréquemment asymptomatique dans sa phase chronique, peu accéder inéluctablement à une phase aigüe rapidement fatale. La prise en charge des patients atteints de la LMC, requiert donc une nette appréciation pronostique donnant lieu à une stratégie thérapeutique adaptée, basée essentiellement sur des techniques biomoléculaires. Il est à noter que de nouvelles initiatives de prise en charge des patients sont évoquées. Les tests biomoléculaires effectués à partir des prélèvements sanguins, vont permettre l'investigation qualitative et quantitative des transcrits BCR-ABL1. La PCR en temps réel par transcription inverse, automatisée et quantitative doit être adoptée en vue de déterminer la quantité de transcrits BCR-ABL et de surveiller les taux de transcrits d'ARNm BCR-ABL chez les patients diagnostiqués de LMC.

La détermination du profil moléculaire des patients, immédiatement après le diagnostic, est indispensable pour l'étude du profil phénotypique des malades, selon le type de transcrits de fusion détecté mais surtout pour choisir l'outil moléculaire le plus approprié au suivi.

A travers notre étude, nous allons mettre en évidence l'intérêt des techniques biomoléculaires, notamment la PCR GeneXpert, dans le diagnostic et suivi moléculaire des patients atteints de leucémie myéloïde chronique sous traitement de première génération « Imatinib ».

I. LEUCEMIE MYELOIDE CHRONIQUE

I.1 Généralités

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une hémopathie maligne rare appartenant au groupe des « MyeloProliférativeNéoplasme » (MPN). Il s'agit d'une prolifération myéloïde clonale touchant la cellule souche hématopoïétique (CSH) et par conséquent l'expansion clonale de cellule différenciée de la lignée myéloïde dans la moelle osseuse et le sang (*Figure 1*) ; [1].

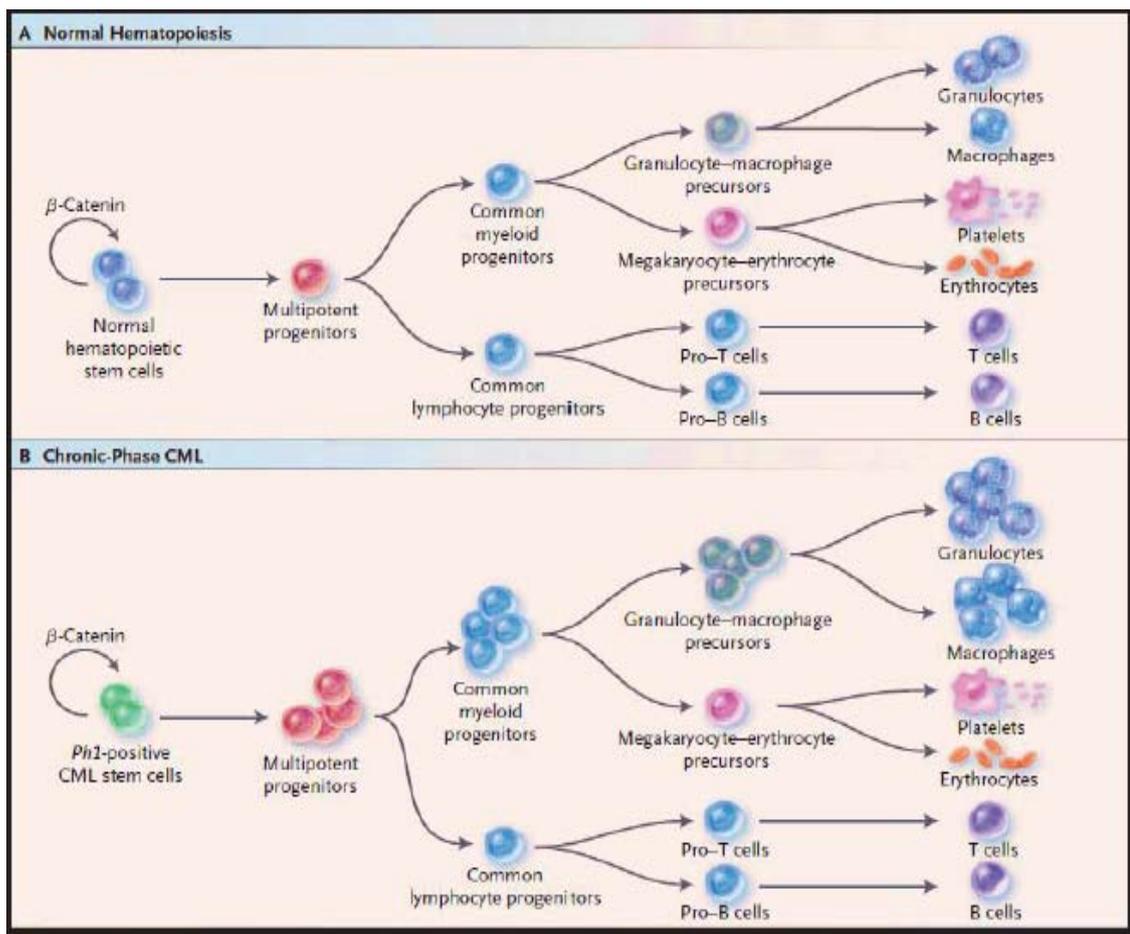


Figure 1: Représentation schématique de l'hématopoïèse normale et leucémique [2].

Dans 95% des cas, la caractéristique cytogénétique de la LMC repose sur la présence d'une anomalie chromosomique dénommée chromosome Philadelphie (Ch-Ph 1) ; [3]. Ce dernier résulte d'une translocation réciproque et équilibrée entre les bras longs de chromosome 9 et 22 $t(9;22)(q34;q11)$; [4].

Cette translocation conduit à la formation d'un gène de fusion chimérique BCR-ABL1, qui code pour une protéine chimérique la protéine P210^{BCR-ABL} qui est retrouvée dans la majorité

des cas de LMC (*Figure 2*). La protéine P210^{BCR-ABL} a une activité enzymatique constitutive de type tyrosine kinase qui peut être inclus dans plusieurs voies de signalisation et ainsi participer à la leucémogénèse[5,6].

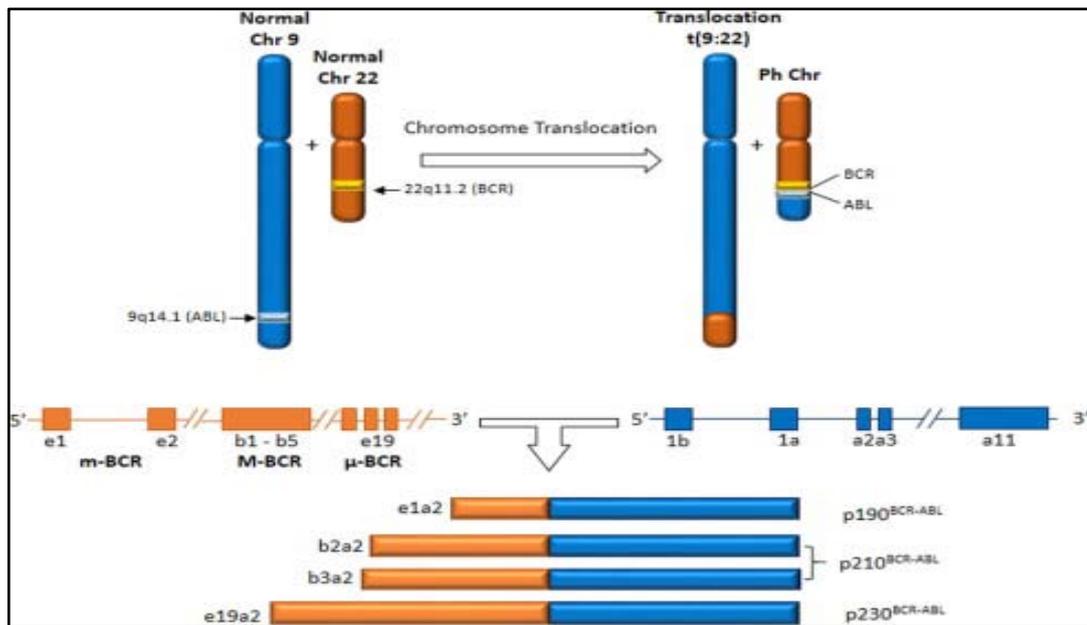


Figure 2: Schéma de la translocation avec les transcrits les plus fréquents [7].

I.2 Historique

Au XIX^{ème}, la maladie « leucémie » a été décrite pour la première fois. **En 1845**, la LMC ou leucémie mélongène fut caractérisée par Bennett chez deux patients présentant une rate énorme avec un sang épais et d'aspect laiteux dû à un excès de leucocytes, il proposa le nom de leucocytémie [8]. Le nom de leucémie a été proposé par la suite par Virchow à une série de cas identiques et différenciés deux types de leucémie ; l'une dite splénique avec grosse rate et globules blancs de grande taille, l'autre dite lymphatique avec polyadénomégalie et petits globules blancs [9].

Ce n'est qu'**en 1960** que la compréhension de la pathogénèse de la maladie débute, à travers l'observation des cellules en division par Peter C. Nowell et David Hungerford qui a permis de faire la relation entre la maladie et la présence d'une anomalie non constitutionnelle récurrente du caryotype en mettant en évidence un chromosome anormalement petit nommé le Ch-Ph en l'honneur de leur ville de résidence [3].

En 1973, le Ch-Ph a été caractérisé par Janet Rowley. Il s'agissait d'un chromosome 22 raccourci (22q-), le résultat d'un échange réciproque de fragment entre les bras longs de chromosome 9 et 22 : C'est la translocation t(9;22)(q34;q11). Le Ch-Ph1 a été la première anomalie chromosomique découverte dans les affections malignes [4].

Le développement de la biologie moléculaire a permis au Bartran et Groffen d'identifier les gènes responsables de cette translocation qui sont le gène ABL (décrit par Abelson pour son rôle dans les leucémies chez la souris), situé sur le bras long du chromosome 9 et le gène BCR (Break Point Cluster Région) qui représente la zone de cassure sur le chromosome 22 [10,11].

Dès 1984, il a été démontré qu'une activité tyrosine kinase dérégulée était à l'origine de l'anomalie moléculaire chez les patients atteints de LMC [12].

En 1996, l'Imatinib a été décrit comme un inhibiteur de la croissance de cellules transformées par l'oncogène BCR-ABL [13], ensuite l'approche thérapeutique de la LMC a été révolutionnée grâce à la compréhension moléculaire de la pathogénèse qui permet au Drucker et al en inhibant l'ATK d'ABL, de cibler pharmacologiquement la protéine BCR-ABL [14].

I.3 Epidémiologie

La LMC est une maladie rare représentant environ 15-20 % des leucémies nouvellement diagnostiquées de l'adulte. En effet, elle touche les deux sexes avec une légère prédominance masculine, le sexe ratio Homme/Femme est estimé à 1,3 ; [15].

La LMC a une incidence relativement faible, estimée entre 1 et 1,5/100000 habitants. Cependant, sa prévalence est augmentée en raison des progrès observés en termes de survie après l'introduction des ITK [15]. Elle augmente avec l'âge, passant d'un cas pour 1 million d'enfants de moins de dix ans, à plus de 30 pour 1 million d'individus après 60 ans. L'âge médian au diagnostic est variable et se situe entre 30 et 60 ans [16].

En Algérie, l'incidence est de 0,53/100000 habitants avec une prévalence de 1030 en 2014. L'âge médian au diagnostic est de 48 ans. On décrit une atteinte préférentiellement masculine avec un sexe ratio de 1,2 [17].

I.4 Etiologie

A ce moment, seules les radiations ionisantes sont reconnues comme seuls facteurs prédisposant de LMC dont le rôle de ces dernières a été le premier à être décrit à partir de la Cohorte des survivants de Hiroshima et Nagasaki, chez lequel un excès de leucémie a été retrouvé [18].

De plus, une étude publiée entre 1984 et 2004 a permis de confirmer une association possible entre une exposition aux pesticides (herbicides phénoxyatiques) et le développement d'une LMC chez les agriculteurs ou fermiers [19].

Des facteurs génétiques héréditaires ont été incriminés dans la survenue de la translocation. En effet, plusieurs SNP (Single Nucléotide Polymorphismes) ont été identifiés comme pouvant être associés à une prédisposition à développer une LMC [20].

I.5 Physiopathologie

I.5.1. Mécanisme moléculaire

Le chromosome Philadelphie résulte de la translocation réciproque et équilibrée entre les bras longs des chromosomes 9 et 22 : $t(9;22)(q34;q11)$; [21,22]. Sur le bras long du chromosome 9 la région *abl* (Abelson) se coupe et sa partie télomérique vient se localiser à la place de la partie télomérique du bras long du chromosome 22 dans une région appelée *bcr* (Breakpoint Cluster Region). Cette translocation aboutit à un chromosome 22 très court (Ph1) sur lequel se trouve le gène chimérique BCR-ABL, formé du début de BCR et la fin d'ABL [23]. La conservation du cadre de lecture permet la synthèse d'ARN messagers hybrides dits chimériques comportant des séquences BCR en 5' et ABL en 3'. L'ARN chimérique est traduit en une protéine de fusion BCR-ABL ayant un pouvoir oncogénique avec activité tyrosine kinase constitutive. Les points de cassure sont souvent regroupés sur une seule région d'ABL (souvent entre les régions Ib et a2), alors qu'il existe plusieurs régions de cassure sur BCR dont la majorité surviennent dans les régions introniques (*Figure 3*) ; [21].

- La région **M BCR** (pour major BCR) est majoritairement impliquée dans la LMC dont le transcrite est b3a2 (60% des cas) ou b2a2 (35% des cas), qui produisent la protéine p210. Toutefois, la région **m BCR** (pour minor BCR) est impliquée dans 0.4 % des LMC et environ 65% des LAL Ph+ dont le transcrite est e1a2, qui produit la protéine p190 et enfin, la région **μ BCR** (pour micro BCR) est impliquée dans < 0.1 % des LMC dont le transcrite est e19a2, qui produit la protéine p230 [24,25].

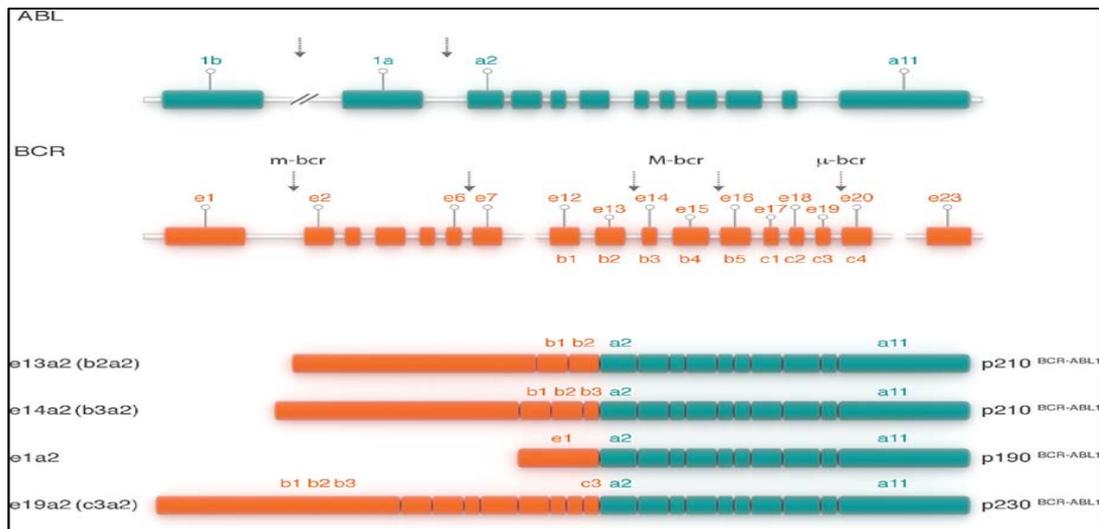


Figure 3: Les différents points de cassures. Le gène ABL situé sur le bras long du chromosome 9, s'étend sur 230 kb et comprend, de l'extrémité 5' centromérique vers l'extrémité 3', deux exons alternatifs (Ia et Ib) séparés par un intron de 200 kb, et dix exons numérotés d'a2 à a11. Le gène BCR situé sur le bras long du chromosome 22, s'étend sur 135 kb et comprend 23 exons. [26].

I.5.2. Fonctions de la protéine ABL

Le gène ABL code une protéine tyrosine kinase de 145 kDa, sans fonction de récepteur (cette protéine est l'homologue de l'oncogène v-abl du virus leucémogène murin Abelson). Elle est exprimée de façon ubiquitaire et est retrouvée dans le noyau et dans le cytoplasme [26,27].

La région N-terminale de la protéine comporte deux domaines d'interaction SH2, SH3, ainsi que le domaine catalytique SH1 qui présente l'activité tyrosine kinase. Un domaine central riche en prolines permet des interactions avec des protéines possédant des domaines SH3, à l'exemple de la protéine Crk. La région C-terminale présente un domaine de liaison à l'ADN (DNABD), trois signaux de localisation nucléaire NLS et un site de liaison à l'actine (**Figure 4**) ; [26].

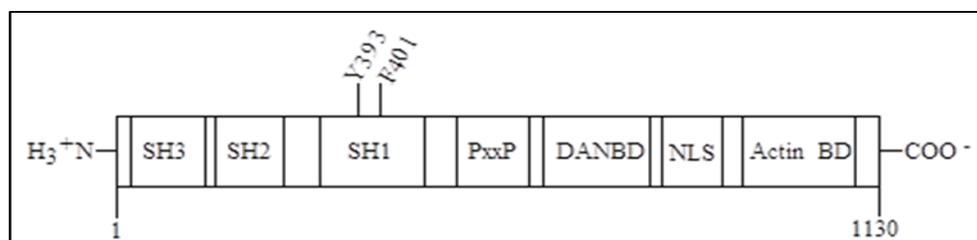


Figure 4: Structure de la protéine ABL [28].

Dans le cas normal, ABL se trouve dans un état inactif à cause de l'interaction à la kinase « auto-inhibition ». Il peut être activé par l'intervention d'autres protéines, dont d'autres kinases, qui s'associeront à l'ABL, et viseront à la rouvrir, modifiant ainsi sa conformation,

de sorte que son substrat et l'ATP puissent avoir un accès au site de phosphorylation (*Figure 5*) ; [29,30]

La protéine ABL est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, la réponse au stress génotoxique et la transmission de l'information passant par les intégrines. En plus, La protéine ABL peut induire l'apoptose en stabilisant la protéine p73 et/ou la protéine p53 [31,32].

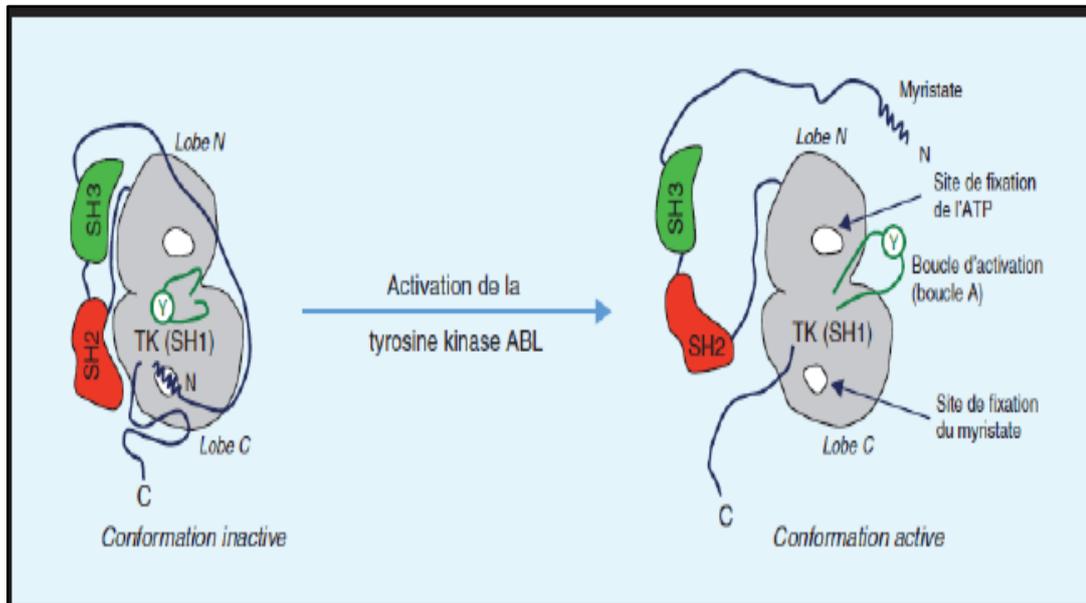


Figure 5 : DTK d'ABL et mécanisme d'action [33].

I.5.3. Fonctions de la protéine BCR

Le gène BCR code pour deux protéines de 160 et de 130 kDa, provenant de la traduction de deux ARNm de 6,7 et de 4,5 kb [34]. La protéine BCR a une expression ubiquitaire. Elle est essentiellement cytoplasmique mais, dans certaines phases du cycle, elle est aussi détectable dans le noyau où elle pourrait se lier à l'ADN [35].

La région N-terminale présente un domaine sérine/thréonine kinase et un domaine de dimérisation. Il existe dans la région centrale un domaine composé de séquences DBL-like et homologues à la pleckstrine qui stimulent l'échange GTP-GDP par les Rho-GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor)[36]. La région C-terminale présente des séquences homologues aux domaines catalytiques des protéines GAP. Elles agissent sur Rac, petite protéine GTPase de la famille Ras, protéine qui régule la polymérisation de l'actine ainsi que l'activité NADPH, H⁺ oxydase des macrophages et granulocytes neutrophiles. La production des dérivés actifs du dioxygène est très augmentée, ce qui valide l'implication de la protéine BCR dans la régulation de l'activité NADPH, H⁺ oxydase médiée par Rac (*Figure 6*) ; [37].

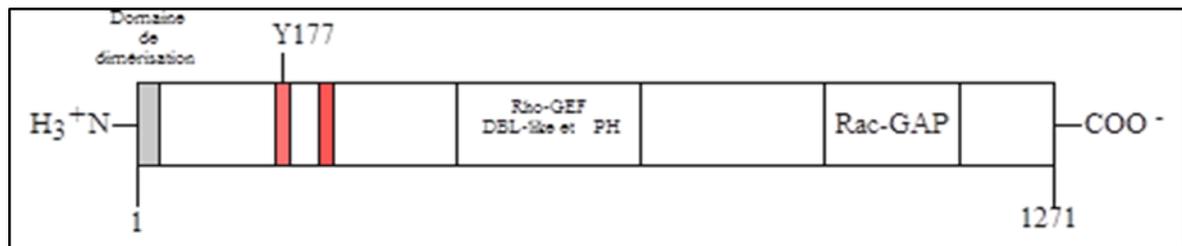


Figure 6 : Structure de la protéine BCR [28].

I.5.4. Signalisation induite par les oncogènes bcr-abl

La protéine Abl, physiologiquement, constitue une navette entre le noyau et le cytoplasme mais, lorsqu'elle est fusionnée à Bcr, l'oncoprotéine perd cette propriété et est, principalement, retenue dans le cytoplasme, où elle interagit avec la majorité des protéines impliquées dans la voie oncogénique. L'activité de tyrosine kinase d'Abl est constitutivement activée par la juxtaposition de Bcr, favorisant ainsi la dimérisation ou tétramérisation et autophosphorylation ultérieure. Cela augmente le nombre de résidus de phosphotyrosine sur Bcr-Abl et, par conséquent, les sites de liaison pour les domaines SH2 des autres protéines. Les oncogènes Bcr-Abl activent différentes voies de signalisation cellulaire. Les conséquences sont être multiples au niveau hématologique : une augmentation de la prolifération cellulaire, une altération des propriétés d'adhésion cellulaire, une inhibition de l'apoptose, une dégradation des protéines de régulation et une altération de la réparation de l'ADN [38].

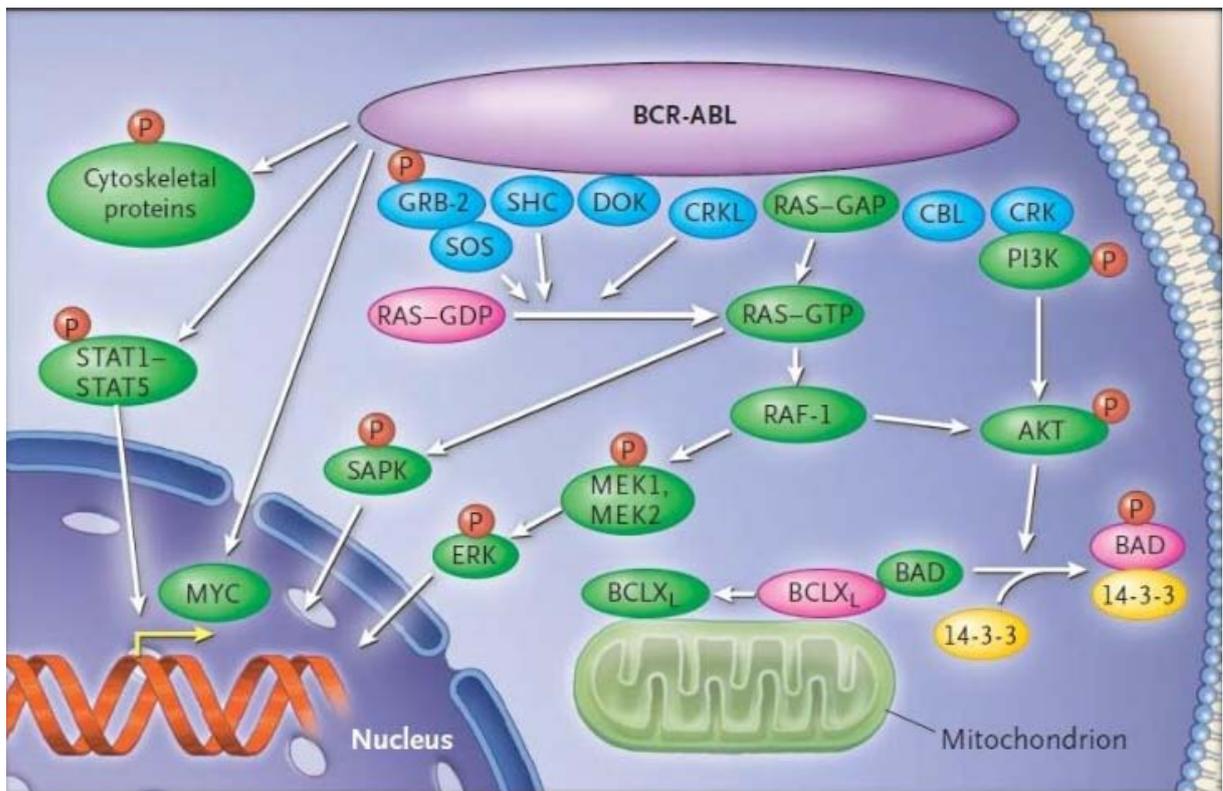


Figure 7 : Voies de signalisation activées dans les cellules Bcr-Abl positives.

Les effets cellulaires de Bcr -Abl sont exercés par des interactions avec les diverses protéines qui peuvent transduire les signaux oncogéniques responsables de l'activation ou de la répression de la transcription du gène, du traitement mitochondriale des réponses apoptotiques, de l'organisation du cytosquelette et de la dégradation des protéines inhibitrices. Les principales voies impliquées sont : RAS, mitogen-activated protein (MAP) kinases, signal transducers and activators of transcription (STAT), phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K) et MYC. La plupart des interactions sont médiées par la phosphorylation de la tyrosine et exigent la liaison de Bcr-Abl aux protéines adaptatrices comme: Growth-factor-receptor-bound 2(Grb-2), Dok, sarcoma virus CT10 oncogene homolog(Crk), sarcoma virus CT10 oncogene homolog-like (Crkl), Src-homology-containing (Shc) et casitas-B-lineage lymphoma (Cbl).

I.5.5. Mécanismes d'action du gène BCR-ABL

Au niveau de cytoplasme, l'ATK de BCR-ABL dérégulé entraîne une cascade de phosphorylation qui conduit à l'activation de plusieurs voies de signalisation intracellulaires impliquées dans le processus d'activation et répression des gènes, dont les conséquences sont multiples et incluent : [39,40]

➤ **Altération des propriétés d'adhérence**

L'adhésion cellulaire est médiée par différentes familles de molécules comme les intégrines $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$ qui jouent un rôle important dans la croissance des progéniteurs hématopoïétiques et le développement normal. L'expression et la structure de ces molécules ne sont pas modifiées mais leur fonction et le signal qu'elles induisent sont

dérégulés. Il est probable que ces modifications soient liées à l'activation des voies de signalisation faisant intervenir directement les molécules de la plaque d'adhésion, p210 Bcr-Abl altère également les propriétés d'adhésion entre les progéniteurs leucémiques et le stroma médullaire ainsi que la matrice extracellulaire par la phosphorylation de protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette ou la membrane cellulaire, comme la paxilline, la vinculine, la taline, la tensin, la kinase focale d'adhérence (Fak), qui deviennent des substrats de p210 Bcr-Abl ou par l'intermédiaire de l'action Crkl [28].

➤ Inhibition de l'apoptose

La protéine Bcr-Abl peut inhiber l'apoptose à plusieurs niveaux et plusieurs signaux initiés par Bcr-Abl ont des conséquences prolifératives et anti-apoptotiques simultanées ; Pour cela, il est difficile de mentionner chaque voie séparément de l'autre. La protéine de liaison ayant la séquence consensus de l'interféron (ICSBP) est un régulateur négatif de la différenciation granulocytaire, et peut également représenter un moyen par lequel Bcr-Abl peut inhiber l'apoptose. Bcr-Abl réduit la liaison directe d'ICSBP à l'ADN, donc limitant sa capacité à réprimer la transcription du gène BCL-2, ce qui favorise la survie des cellules leucémiques. Un autre lien entre Bcr-Abl et l'inhibition de l'apoptose se résume dans la phosphorylation de la protéine pro-apoptotique Bad, qui, par conséquence, est piégée par les protéines 14-3-3 ce qui libère l'activité anti-apoptotique de Bcl-xL. Bcr-Abl bloque le relargage du cytochrome C par la mitochondrie, ce qui induit l'inactivation de la voie des caspases [28].

➤ Activation de signaux mitotiques

Plusieurs liens entre Bcr-Abl et Ras ont été définis. L'autophosphorylation du résidu tyrosine 177 de la protéine Bcr-Abl permet la fixation de la protéine Grb-2 qui stabilise la forme activée de Ras et conduit à l'activation de la cascade des MAPK avec une voie de signalisation Raf/Mek/Erk. Cependant, autres protéines substrats de Bcr-Abl, peuvent aussi activer Ras: Shc, Crkl et p62 Dok.

En outre, les deux piliers de la voie des MAP kinases: Jnk/Sapk et p38, sont également activées dans les cellules Bcr-Abl transformées. 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. Aussi, cette voie inhibe l'apoptose par régulation positive de la transcription de la protéine Bcl-xL. Bcr-Abl active

apparemment la voie PI-3K par la formation des complexes multimérique avec PI-3 kinase, p120 Cbl, et les molécules adaptatrices Crk et CrkL.

De même, la voie des PI3 kinases peut, aussi, être activée via Grb2, induisant un signal prolifératif et antiapoptotique via Akt .

Une autre cible nucléaire supposée de l'activité de transformation de la p210 est le proto-oncogène Myc, qui est exprimée à des niveaux élevés dans les cellules leucémiques. Cependant, l'activation de Myc semble être indépendante de l'activation de la voie Ras[28].

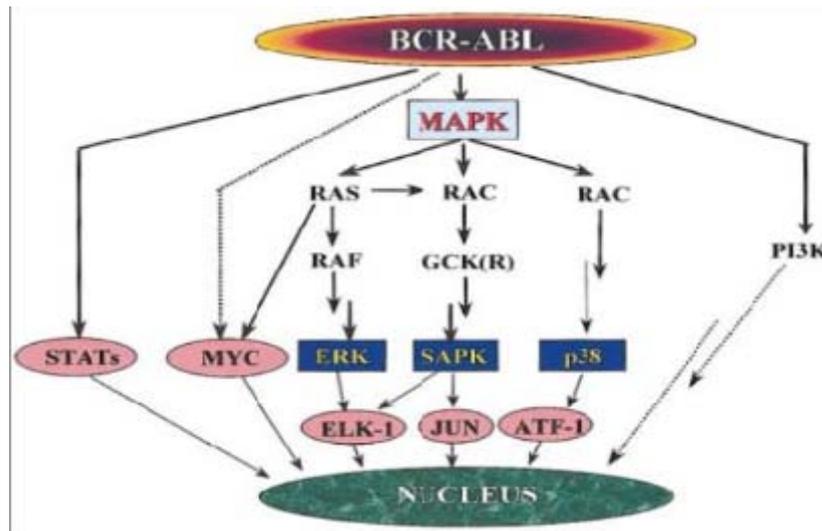


Figure 8 : Voies de signalisation avec un potentiel mitogénique dans les cellules transformées Bcr-Abl. L'activation des différentes voies dépend du type de cellule, mais le système MAP-kinase semble jouer un rôle central [28].

I.6 Diagnostic

I.6.1. Circonstances de découverte et tableau clinique

Le plus souvent le diagnostic est porté de manière fortuite à l'occasion d'une NFS de routine. La maladie peut aussi se révéler par son symptôme cardinal, la splénomégalie retrouvée dans plus de 50% des cas de LMC-PC ou par d'autres signes généraux non spécifiques à la maladie [45].

I.6.2. Diagnostique biologique

➤ Hémogramme et frottis sanguin

L'hémogramme des patients atteint de la LMC est caractérisé par une hyperleucocytose supérieure à 25000/mm³ constituée de polynucléaire neutrophiles et une myélemie harmonieuse en phase chronique. Une basophilie, une éosinophilie et une thrombocytose.

L'existence d'une thrombocytopénie inférieure à 100000/mm³ en l'absence de tout traitement cytoréducteur signe une phase avancée de l'hémopathie. L'hémoglobine est normale ou modérément abaissée [46].

➤ **Myélogramme**

L'analyse du frottis médullaire montre un excès de basophiles et d'éosinophiles, une hyperplasie importante de la lignée myéloïde granuleuse dépassant 80% des éléments. Le nombre de mégacaryocytes peut-être augmenté [45].

La proportion de blastes et de promyélocytes doit être inférieure à 10% de l'ensemble des cellules pour définir la phase chronique de la maladie (*Figure 10*) ; [47].

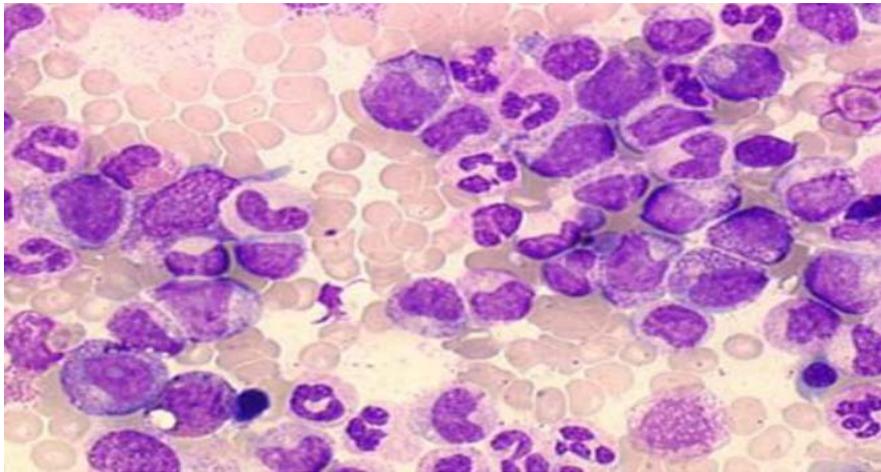


Figure 9 : Image d'un frottis de sang dans la LMC (Myélemie) [48].

I.6.3. Diagnostic cytologique

➤ **Caryotype standard**

Cet examen réalisé sur au moins 20 métaphase, il permet de confirmer le diagnostic en montrant dans plus de 90% des cas, la translocation classique réciproque t(9;22) (q34.1;q11.2) , et permet aussi d'identifier dans moins de 10% des cas , les translocations variantes t(9;22;v) impliquant plusieurs autres chromosomes partenaires, ou la présence d'éventuelle anomalies cytogénétiques additionnelles (ACA) (ACA Ph+),(*Figure 16*) ;[49].



Figure 10: Caryotype médullaire montrant un chromosome 22 raccourcis correspondant au chromosome Philadelphie et un chromosome 9 plus long (der9), [50].

➤ La technique FISH

Elle se base sur l'hybridation de sondes génomiques fluorescentes complémentaires des gènes BCR (sonde rouge) et ABL1 (sonde verte). Elle permet de visualiser la fusion sur des métaphases ou des noyaux cellulaires en interphases. La fusion BCR-ABL1 est visualisée sous forme d'un signal ou spot jaune résultant de la fusion des deux couleurs (*Figure 12*) ; [51].

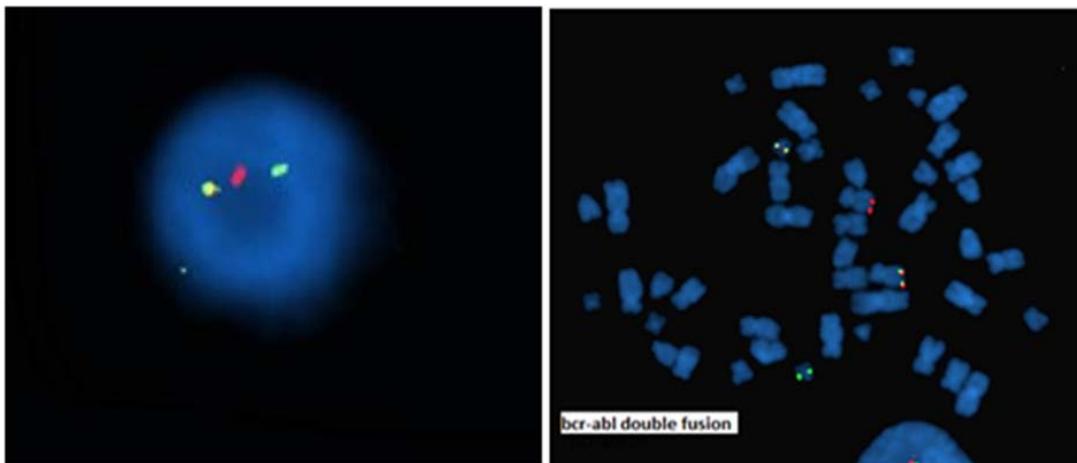


Figure 11: observation de fluorescence par microscope à épi fluorescence (Zeiss®) [47].

I.6.4. La Biologie Moléculaire

La fusion des gènes BCR et ABL est en évidence sur un extrait d'ARN totaux par PCR qualitative après transcription inverse. Elle confirme le diagnostic en mettant en évidence le

transcrit de fusion. Elle permet aussi de définir l'isoforme moléculaire produit en fonction du point de cassure sur le gène BCR (*Tableau 1*) ; [52].

Tableau 1:Les principaux transcrits mis en évidence [28].

| Exon BCR | Exon ABL | ARNm hybride | Protéine | | |
|----------|----------|--------------|----------|-----------|------------|
| e13 | a2 | e13a2 | P210 | Fréquent | LMC |
| e14 | a2 | e14a2 | P210 | Fréquent | LMC |
| e13 | a3 | e13a3 | P210 | Rare | LMC |
| e14 | a3 | e14a3 | P210 | Rare | LMC |
| e19 | a2 | e19a2 | P230 | Rare | LMC-PN* |
| e1 | a2 | e1a2 | P190 | Rare | LMC-Mono** |
| e6 | a2 | e6a2 | | Très rare | LMC |

* Leucémie Myéloïde Chronique à Polynucléaires Neutrophiles

** Leucémie Myéloïde Chronique avec Monocytose

L'étude moléculaire par RT-PCR constitue une bonne alternative à l'étude cytogénétique dans la LMC. Elle ne nécessite pas obligatoirement de prélèvement de la moelle et permet de s'affranchir des contraintes liées à la culture cellulaire et à l'étude des mitoses. Elle permet de diagnostiquer les LMC Ph- mais ne met pas en évidence les anomalies génétiques additionnelles. Elle permet, grâce aux techniques quantitatives, de suivre l'évolution des patients sous traitement [28].

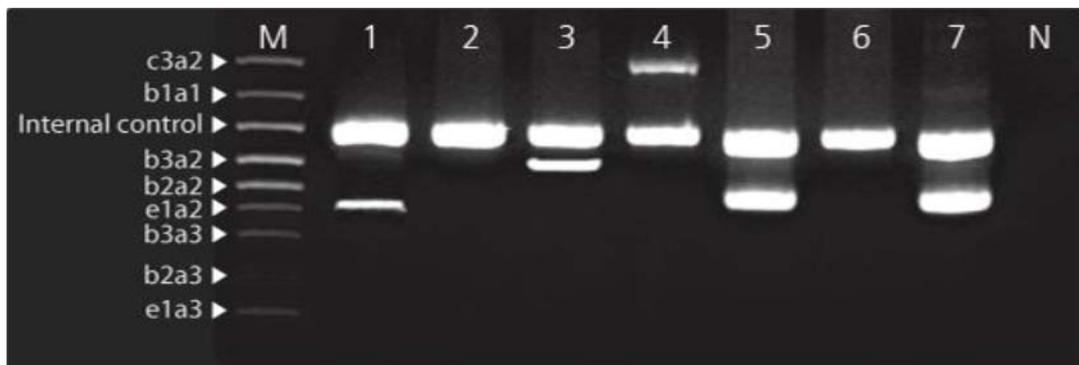


Figure 12: Un exemple sur un patient diagnostiqué par PCR en temps réel [53].

La difficulté de ce diagnostic moléculaire est lorsque certains patients expriment des transcrits variant, le recours donc à une amplification multiplexe capable d'amplifier la plupart de ces transcrits est fortement recommandé [54].

Actuellement, l'évaluation de l'efficacité du traitement de la LMC nécessite un test de diagnostic moléculaire pour mesurer le niveau de transcrit BCR-ABL (ARN). Les patients sont testés pour la BCR-ABL tous les 3 mois conformément aux directives internationales établies. Letest Expert BCR-ABL Ultra est un test quantitatif des transcrits du point de

rupture majeur de BCR-ABL (p210) qui fournit des résultats moléculaires extrêmement sensibles et à la demande. Basé sur la technologie innovante Gene-Xpert, Expert BCR-ABL Ultra automatise l'ensemble du processus de test, y compris l'isolation de l'ARN, la transcription inverse et la PCR en temps réel entièrement imbriquée du gène cible BCR-ABL et du gène de référence ABL dans une cartouche entièrement automatisée [55].

I.7 Score Pronostic

I.7.1. Indice de Sokal

Identifié en 1984 afin d'évaluer le risque d'accélération ou d'acutisation. Il prend en compte l'âge, le volume splénique, la numération plaquettaire et le pourcentage de blastes sanguins. Cet indice discrimine les patients traités par l'IM ; il définit trois niveaux de risque d'évolution vers la transformation avec une médiane de survie différente : Survie médiane de 32 mois pour un risque élevé ,45 mois pour un risque faible [56].

I.7.2. Indice de Hasford ou score EURO

Identifié en 1998 par Hasford et al. Il prend en compte l'âge, le volume splénique, la numération plaquettaire et le pourcentage de blastes, le pourcentage de basophiles sanguins et le pourcentage d'éosinophiles [57].

I.7.3. Score EUTOS

Il est nouvellement établi à première de la thérapie ciblée par les ITK et qui a publié en 2011. Il n'intègre que deux paramètres : la taille de la rate et le pourcentage de basophiles sanguins [58].

I.8 Evolution de la LMC

La LMC évolue naturellement en trois phases : [59,60]

- Une phase chronique (LMC-PC) dont elle dure en moyenne 4 à 5 ans. Plus de 90% des patients sont diagnostiqués au cours de cette phase.
- Phase d'accélération (LMC-PA) ; correspond à une transition entre la phase chronique et la phase blastique. Elle est caractérisée par une augmentation de la blastose sanguine et médullaire et une thrombopénie. Cette phase dure 12 à 24 mois sans traitement.
- Une phase d'acutisation ou de transformation aigue (LMC-PB), qui est une forme agressive de LA, réfractaire à la chimiothérapie classique et rapidement fatale. Elle dure 3 à 12 mois sans traitement.

I.9 Traitement

Le traitement de la LMC a été radicalement modifié par les thérapeutiques ciblées récentes dont le but est l'obtention d'une réponse hématologique complète (RCH), d'une réponse cytogénétique complète (RCyC), l'obtention d'une réponse moléculaire majeure (RMM) et mieux une réponse moléculaire complète (RMC) et durable.

En plus d'une amélioration de la survie globale, survie sans progression et une survie sans événements.

Afin de choisir le bon traitement de la LMC, un arbre décisionnel a été créé. Il prend en compte la phase du traitement et les différentes réponses aux traitements (*Figure 14*) ; [61].

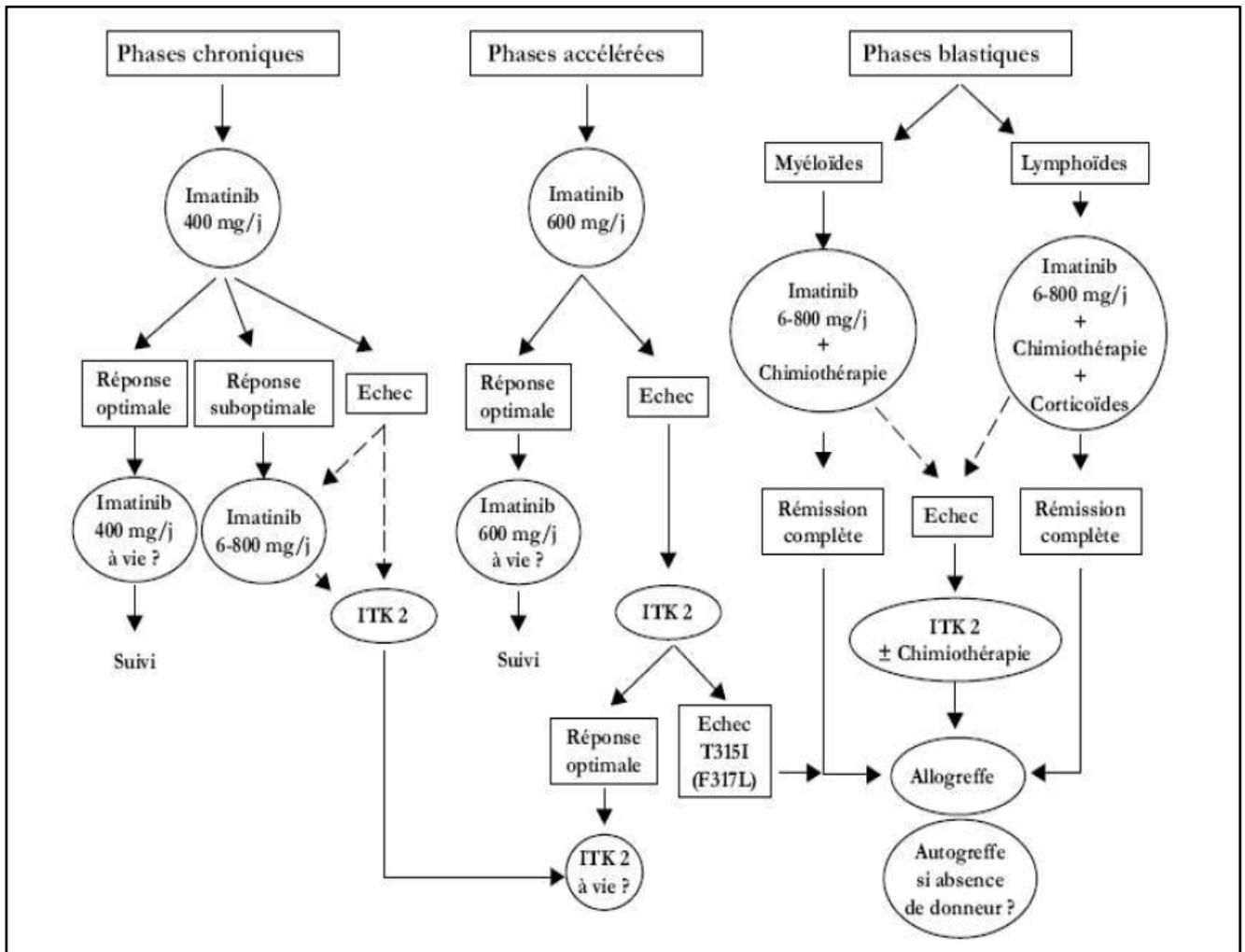


Figure 13 : Arbre décisionnel des différents choix thérapeutiques de la LMC [61].

I.9.1. Chimiothérapie conventionnelle

L'arsenic au début du 20e siècle, puis le busulfan et l'hydroxyurée (Hydréa), ont été utilisés pour 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'hydroxy urée peut être utilisée temporairement jusqu'à ce qu'un diagnostic soit établi [48].

Dans les années quatre-vingt, le seul traitement curatif de la LMC reconnu chez les patients jeunes était la greffe allo génique de CSH. L'allogreffe est devenue ensuite dans les années quatre-vingt-dix, le traitement de première ligne pour tous les patients en phase chronique et en phase d'accélération précoce [62].

L'INF alpha est devenu dans les années quatre-vingt-dix un traitement de première ligne chez les patients qui ne pouvant pas bénéficier d'une allogreffe car il permettait d'induire une RCyC [63]. A l'heure actuelle, il offre un choix thérapeutique pour des patients intolérants aux ITK sans autre alternative thérapeutique. Il a été testé dans une étude française STI571 prospective Randomized Trial (SPIRIT) [64], en association avec l'IM 400mg/j et qui ont fait la preuve de leur concept en augmentant de façon très significative le taux de RMC4.5 à 12 et 24 mois en comparaison avec l'IM seul. Une autre étude a confirmé cette efficacité avec un taux de RMM significativement meilleur par rapport au bras IM seul [65]. Ce résultat suggère le rôle encore mal compris de l'immunité dans le contrôle de la leucémie.

I.9.2. Inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK)

- **Les ITK de première génération** (Imatinib) : Qui assure une survie de 8 ans chez presque 90 % des patients.

Identifié en 1996, l'Imatinib « le STI57 » (Signal transduction inhibitor 571) fait partie des inhibiteurs de la transmission du signal intracellulaire. Il cible spécifiquement l'ATK de l'onco-protéine Abl. Le mécanisme d'action de l'IM repose sur la neutralisation de tyrosine kinase de la protéine BCR-ABL par inhibition compétitive de l'ATP au niveau du site catalytique de celle-ci. Il en résulte une inhibition de l'autophosphorylation, une inhibition de la prolifération et l'induction de l'apoptose (*Figure 15*) ; [66].

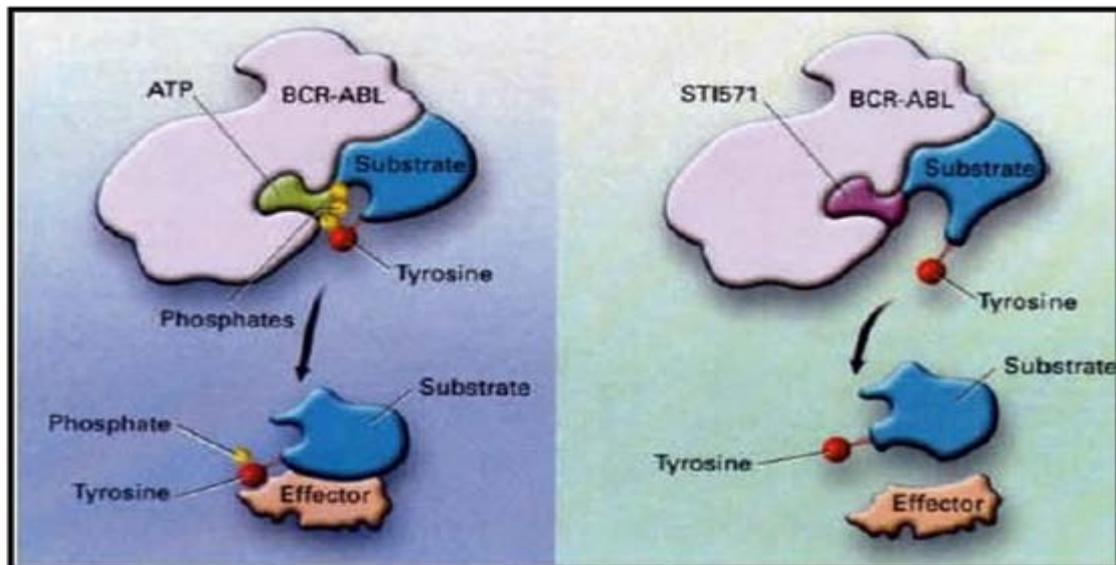


Figure 14: Mode d'action de l'Imatinib [67].

Dans la protéine de fusion BCR-ABL, l'ABL est sous forme active et théoriquement incapable de fixer l'Imatinib, cependant son effet rapide et remarquable sur les cellules BCR-ABL+, laisse supposer l'existence de mécanisme capable de phosphoryler dans la cellule leucémique et de fixer les premières molécules d'Imatinib sur la poche enzymatique déphosphorylée avec par la suite, une augmentation progressive du rapport BCR-ABL active sur BCR-ABL active conduisant à l'inhibition de l'ATK de BCR-ABL [68].

- **Les ITKs de la deuxième génération (ITK2)**

Indiqués initialement dans les formes résistantes par nouvelles mutations ou en cas d'intolérance à l'imatinib. Ils sont efficaces en cas de mutation à l'exception de la mutation T315I. Le risque d'intolérance croisée lors du passage de l'Imatinib aux ITK 2ème génération est très faible [69].

- **Le Dasatinib** : IL a une action inhibitrice de BCR-ABL 300 fois supérieure à celle de l'Imatinib in vitro. Il est actif sur les mutations : E 255 K ; Y 253 H ; F 359 C. Il se lie aux conformations actives du DTK de la protéine BCR-ABL [70].
- **Le Nilotinib** : Il possède une activité anti c-Kit et PDGF. C'est un ITK2 structurellement analogue à l'Imatinib, mais qui présente in vitro une activité plus puissante sur BCR-ABL non muté et muté, 30 fois supérieure à celle de l'Imatinib. Il est actif sur les mutations : V299 L ; F 317L ; Q 252 H. à l'exception de mutations T315I, E255V/K et Y253H [71].
- **Le Bosutinib** : Possède une activité antiproliférative sur les cellules portantes BCR-ABL sensibles ou résistantes à l'Imatinib. Il est 200 fois plus puissant in vitro. Y compris

les mutants Y253F, E255K et D276G mais pas le mutant T3511. Il possède également une activité anti c-Kit, PDGF et ainsi Src kinases [72].

- **Les ITKs de la troisième génération**

- **Le Ponatinib** : Il s'agit d'un puissant ITK actif sur les formes ABL mutées ou non, y compris la mutation T351 présente chez jusqu'à 20% des patients de la LMC résistants aux autres ITK [62].

I.10 Evaluation de réponse au traitement

I.10.1. La réponse hématologique complète

Elle se définit comme la normalisation de la NFS avec leucocytes < 10 G/L, pas de myélémie, thrombocytémie < 450 G/L et la disparition de tous les symptômes et signes cliniques de la maladie, surtout la splénomégalie. Il existe cependant des critères définissant une réponse hématologique partielle : la diminution de la moitié des leucocytes jusqu'à une leucocytose inférieure à 200 G/L, ou normalisation de la NFS avec thrombocytose > 450 G/L ou myélémie ou splénectomie [73].

I.10.2. La réponse cytogénétique

Elle a été répartie en quatre sous-groupes selon la proportion de cellules portant le chromosome Ph lors de l'analyse du caryotype médullaire : [74]

- ✓ Réponse cytogénétique complète (RCyC) : 0% de chromosome Ph.
- ✓ Réponse cytogénétique partielle (RCyP) : entre 1 et 35%.
- ✓ Réponse cytogénétique majeure (RCM) : 0% et 35%
- ✓ Réponse cytogénétique mineure (RCymin) : entre 35 et 65%.
- ✓ Réponse cytogénétique minimale (RCyMin) : entre 65 et 95%.
- ✓ Pas de réponse cytogénétique ou échec : 100%

I.10.2 La réponse moléculaire

Grâce à la technique de la RT-PCR, on peut évaluer le ratio de transcrits BCR-ABL/ABL. Il y a réponse moléculaire complète lorsque l'on constate une négativation du rapport sur une période donnée c'est-à-dire une réduction d'au moins 3log par rapport aux valeurs initiales [73].

- ✓ La réponse moléculaire majeure : RMM3 (BCR-ABL) $\leq 0,1$ %
- ✓ La réponse moléculaire RMM4 (BCR-ABL) $\leq 0,01$ %
- ✓ La réponse moléculaire RMM4.5 (BCR-ABL) $\leq 0,0032$ %
- ✓ La réponse moléculaire RMM5 (BCR-ABL) $\leq 0,001$ %

Le tableau II résume les réponses à l'imatinib selon les définitions de l'European Leukemia Net (ELN) en 2013 :

Tableau 2: Définition de la réponse aux inhibiteurs de la tyrosine Kinase (ITK) en première ligne de traitement [75].

| Moment | Réaction optimale | Alerte | Échec |
|--------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|---|
| Au moment du Diagnostic | NA | Risque élevée*ou CCA/Ph+ | NA |
| 3mois | BCR-ABL ≤ 10% et/ou Ph+ ≤ 35% | BCR-ABL > 10 %, et/ou Ph+ 36 à 95% | Pas de RHC, et/ou Ph+ > 95% |
| 6mois | BCR-ABL < 1 % et/ou Ph+ 0 | BCR-ABL 1 et 10 %, et/ou Ph+ 1 35% | BCR-ABL > 10 % et/ou Ph+ > 35% |
| 12mois | RMM (BCR-ABL) ≤ 0,1 % | BCR-ABL 0,1 et 1 % | BCR-ABL > 1 % et/ou Ph+ > 0% |
| A tous moment | RMM (BCR-ABL1) ≤ 0,1% | CCA/Ph-(-7ou-7q) | -Perte de RHC -Perte de RCYC -Perte confirmée de la RMM -Mutations -CCA/PH+ |

Le tableau III résume les réponses auxITK2 selon les définitions de l'European Leukemia Net (ELN) en 2013 :

Tableau 3 : Définition de la réponse aux inhibiteurs de la tyrosine Kinase (ITK) en seconde ligne de traitement [75].

| Moment | Réaction optimale | Alerte | Échec |
|--------------------------------|------------------------------------|---|---|
| Au moment du Diagnostic | NA | Risque élevée ou perte de la RHC sous imatinib ; défaut de RCy en 1 ère ligne | NA |
| 3mois | BCR-ABL ≤ 10%, et/ou Ph+ ≤ 65% | BCR-ABL > 10 %, et/ou Ph+ 65 à 95% | Pas de RHC, et/ou Ph+ > 95% |
| 6mois | BCR-ABL < 10 %, et/ou Ph+ < 35% | Ph+ 35% a65% | BCR-ABL > 10 % et/ou Ph+ > 65% |
| 12mois | BCR-ABL < 1 % et/ou Ph+ < 0% | BCR-ABL 1 a10 %, et/ou Ph+ 1 à 35% | BCR-ABL > 10 % et/ou Ph+ > 35% |
| A tous moment | gène BCR-ABL ≤ 0,1% | CCA/Ph-(-7ou-7q) ou BCR-ABL > 0 ,1 %, | -Perte de RHC -Perte de RCYC -Perte confirmée de la RMM -Mutations -CCA/PH+ |

Objectif

La visée fondamentale de notre étude est de faire ressortir :

-Au préalable, l'intérêt de la technique GeneXpert PCR dans la recherche qualitative et quantitative des transcrits MBCR-ABL, adoptée dans le cadre du diagnostic et du suivi moléculaire des patients atteints de LMC sous traitement de première ligne « Imatinib » en vue de la surveillance de la maladie résiduelle (MRD) ou la réponse moléculaire selon les recommandations de l'ELN 2013.

-Subséquentement, apprécier la réponse moléculaire au traitement et repérer les cas de résistance en vue d'orienter le schéma thérapeutique.

II. PATIENTS ET METHODES

II.1 Patients

Il s'agit d'une étude rétrospective allant du 1 février au 1mai 2019 réalisée au sein du laboratoire de recherche de cytogénétique conventionnelle et moléculaire du service d'hématologie de l'EHSELCC de Blida, portant sur 22 patients atteints d'une leucémie myéloïde chronique (LMC) sous traitement de première ligne « imatinib ».

Tous les patients ont bénéficié d'un examen clinique à la recherche d'une splénomégalie ; un examen biologique par un hémogramme, d'un examen cytologique par frottis sanguin et myélogramme et d'un examen cytogénétique par caryotype et FISH pour confirmer le diagnostic de la LMC.

Le suivi moléculaire des patients a été effectué selon les recommandations de l'ELN 2013, à 3, 6, 12, 24 mois et au-delà ; par la technique de PCR automatisée GeneXpert en vue d'évaluer la réponse moléculaire au traitement.

Les données cliniques et socio-démographique des patients ont été recueillies sur la base de dossiers médicaux.

II.2 Méthodes

II.2.1. Prélèvements et comptage

Les prélèvements ont été réalisés à partir du sang et de la moelle en vue de diagnostiquer la LMC ainsi qu'à partir du sang en vue d'évaluer la réponse des patients au traitement de première ligne « imatinib ». Les différents prélèvements ont été soumis par la suite à :

II.2.2. Hémogramme

C'est l'examen biologique standard dans le diagnostic des hémopathies malignes. Il est désigné sous le terme de FNS (Numération –Formule-Sanguine).

Il est réalisé sur sang veineux prélevé sur anticoagulant (EDTA). Lors du prélèvement le tube doit être agité pour éviter la formation de microcaillots dans le but d'analyser les éléments figurés du sang : globules rouge ; globules blancs et les plaquettes.

II.2.3. Frottis sanguin

Il est réalisé à partir d'une pique sur le doigt ; on met une goutte sur une lame et on effectue un étalement par une autre lame. Puis ; on effectue la coloration MGG.

Cet examen est effectué pour le diagnostic sur le plan morphologique les cellules figurées du sang : neutrophiles ; basophile....

II.2.4. Médullogramme (ou myélogramme)

C'est un prélèvement de moelle osseuse réalisé sous anesthésie local. Cet examen consiste à prélever du suc médullaire par trocart spéciale. Il s'agit généralement de sternum (os plat situé au milieu de la poitrine) ou de la partie saillante de la hanche. Puis ; on effectue l'étalement sur une lame et une coloration MGG.

On fait l'examen au microscope optique afin d'évaluer les cellules précurseurs de la lignée myéloïde. Cet examen permet ensuite de réaliser le caryotype.

II.2.5. La Mise en culture et sortie de culture pour le diagnostic de la LMC par caryotype et par FISH

Les prélèvements effectués à partir de la moelle osseuse ont été mélangés avec 10cc de RPMI et mis dans des flasques en position horizontale, bouchon dévissé à ¼ de tour puis placés dans une étuve à 37°C pendant 24 h. Du synchro A et B ainsi que la colchicine ont été ajoutés aux préparations des différents flasques, comme suit :

- ✓ 100 microlitre du synchro A ajoutés sous hotte le jour même à 16h.
- ✓ 100 microlitre du synchro B et 60 microlitres de colchicine ajoutés le lendemain à 8h.

Une demi-heure après l'ajout de la colchicine, on a procédé à la sortie des différentes cultures. Au bout de 24h de mise en culture, le contenu des différents flasques a été versé dans des tubes coniques après avoir inscrit les renseignements des patients. Une centrifugation a été ensuite effectuée pendant 8 minutes à 1300 tours. Après avoir éliminé le surnageant, 1cc de KCL a été ajouté aux contenus des tubes coniques. En outre, un choc hypotonique a été déclenché à deux reprises : au début avec un 1 CC de KCL puis par la complétion du volume

avec le KCL jusqu'à 12 CC. Après la mise en étuve sèche à 37°C pendant 25 minutes des contenus des différents tubes coniques, une préfixation a été entamée suivie de deux fixations successives. La préfixation consiste en l'ajout de 01 cc de fixateur contenant 1/3 d'acide acétique et 2/3 de méthanol suivi d'une centrifugation à 1300 tours pendant 8 minutes avec élimination des 2/3 du surnageant et la préservation du 1/3 du culot.

Quant à la phase de fixation, elle comportait l'ajout de 01 cc en poursuivant l'écoulement jusqu'à atteindre un volume de 08 cc. Ensuite, une centrifugation à 1300 tours pendant 8 minutes a été effectuée suivie de l'élimination de 2/3 du surnageant. Celui-ci est enfin conservé à +4°C à condition qu'il soit clair.

- **Le Caryotype**

En premier lieu, les tubes doivent être récupérés du frigo de +4°C pour un étalement. Parallèlement, un tampon de phosphate mono basique (NaH_2PO_4) a été préparé puis chauffé à 87°C dans un bain marie réglé à 90°. D'autre part, des lames portant l'identifiant du patient, le type et la date du prélèvement ont été exposées à la vapeur du bain marie avant l'étalement des prélèvements (2 gouttes/lame) puis séchés à température ambiante. Une déshydratation a été effectuée. Cette dernière consiste à plonger les lames dans de l'eau distillée stérile pendant 05 minutes à température ambiante. Cette phase a été relayée par une étape de dénaturation qui consistait à faire plonger les différentes lames dans le bain marie (temps variable en 12 à 13min 40). Enfin, une coloration au Giemsa des lames a été réalisée pendant 5min. Ces lames seront prêtes pour une observation microscope après leur lavage et séchage à l'air libre.

Lecture du caryotype : on rajoute l'huile d'immersion sur les lames avant la lecture sous microscope. Il est nécessaire d'analyser au moins 20 mitoses. Ainsi les chromosomes sont classés en fonction de leur taille décroissante, leur indice centromérique et les bandes.

- **La FISH**

✓ L'étalement des différents prélèvements était effectué dans des conditions bien déterminées à savoir : Température entre 20 et 25° et humidification entre 45 et 55%. Les prélèvements composés de 2/3 de fixateur pour un 1/3 de culot, ont été débarrassés du surnageant. Après avoir humidifié les lames à la vapeur du bain marie, l'étalement a été réalisé en déposant deux gouttes de culot superposées au centre des lames qu'on étuve à sec à 37° toute une nuit après les avoir séchés à l'air libre.

- ✓ Par la suite, un prétraitement des lames a été réalisé. Les lames ont été immergées dans des bacs contenant 2SSC (20 cc SSC + 1000 ml d'eau distillée : dilution 1/10^{ème}) puis mises à l'abri de la lumière pendant 02 minutes avant la mise en place des sondes. Le bac a ensuite été placé successivement dans des fixateurs (éthanol) à 70%, 85% et 100% pendant 2 min pour chaque bain, à l'abri de la lumière. Enfin, après la mise en place des sondes et l'étalement des prélèvements (1 goutte / lame), les lames recouvertes par les lamelles ont été d'abord placées dans un thermobrite à 75°C pendant 2 minutes (dénaturation) puis à 37°C pendant 16 H (hybridation).
- ✓ Après la phase de prétraitement et en vue d'effectuer les différents lavages, trois sortes de réactifs à savoir : les réactifs IGEPAL 0.1% et 0.3% ainsi que le Tween ont été préparés et conservés dans 03 flacons stériles hermétiquement fermés portant la date de préparation et mis à température ambiante ou au frigo à +4°C pendant 24 h. Les lames des patients sont déposées dans IGEPAL 0,1% pendant 3 min puis dans IGEPAL 0,3% pendant 2 min et enfin on les met dans le TWEEN pendant 30s.

Lecture de FISH : elle se fait à l'aide d'un microscope à fluorescence (Zeiss®) qui contient une lampe à mercure de 100-watts et des objectifs plan apochromatique *63 or *100. Le filtre triplet bande DAPI/FITC/Texas Red est optimal pour la visualisation des 3 fluorochromes simultanément. Pour chaque zone de lecture, on observe entre 20 à 30 mitoses (tout dépend de la richesse des cellules).

Les lames sont analysables pendant plusieurs mois voire des années si elles sont conservées à l'obscurité et au-dessous de la température ambiante à (4°C).

II.2.6. La biologie moléculaire par Gene-Xpert PCR Ultra pour le suivi moléculaire des patients sous traitement

Le test Xpert BCR-ABL Ultra a été adopté pour la surveillance des taux de transcrits d'ARNm BCR-ABL chez les patients diagnostiqués de LMCMbcr/abl. Il s'agit d'une PCR en temps réel par transcription inverse, automatisée et quantitative. Ce test vise à déterminer la quantité de transcrits BCR-ABL sous la forme d'un rapport de BCR-ABL/ABL.

Le test est effectué sur les GeneXpert Systems de Cepheid. Les GeneXpert Systems automatisent et intègrent la purification des échantillons, l'amplification des acides nucléiques et la détection de la séquence cible dans des échantillons simples ou complexes en utilisant des tests RT-PCR en temps réel et PCR nichée.

Le test Gene Xpert BCR-ABL Ultra inclut les réactifs pour détecter les gènes de fusion BCR-ABL résultant de deux points de rupture majeurs, les translocations e13a2 (b2a2) et e14a2 (b3a2), et le transcrit ABL en tant que contrôle endogène dans les échantillons de sang périphérique.

Le protocole adopté dans l'application de ce test, s'opère en plusieurs étapes. Au départ, 100 microlitres de protéinase K ont été mis dans un flacon de 50 ml suivis par l'ajout de 4 ml de sang total après avoir inversé le tube de sang à EDTA dix fois.

En outre, une agitation (Vortex) de l'ensemble a été appliquée suivie par une incubation d'une minute à température ambiante. De plus, l'addition de 2,5 ml de réactif de lyse a été accompagnée par deux agitations successives de 10 secondes avec un temps d'incubation de 5 min chacune. D'autre part, 1ml du lysat a été transféré dans un nouveau flacon de 50 ml et additionné de 1,5 ml de tampon de lyse. Après 10 min d'incubation à température ambiante, une agitation de 10 secondes a été réalisée suivie d'une autre de 19 secondes après l'ajout de 2 ml d'éthanol. Un tampon de lavage ainsi que la totalité du lysat ont été ajoutés respectivement dans les ouvertures 1 et S. Enfin, la cartouche a été mise en place dans l'appareil après avoir scanné son code barre.

II.3 Analyse statistique

L'analyse des données, les calculs et les illustrations graphiques ont été réalisés par le logiciel Excel2007 et Excel2013.

III. RESULTATS

A. Au diagnostic

- Notre série a comporté 22 patients dont l'âge moyen était de 45 ans avec des extrêmes allant de (20- 66 ans).

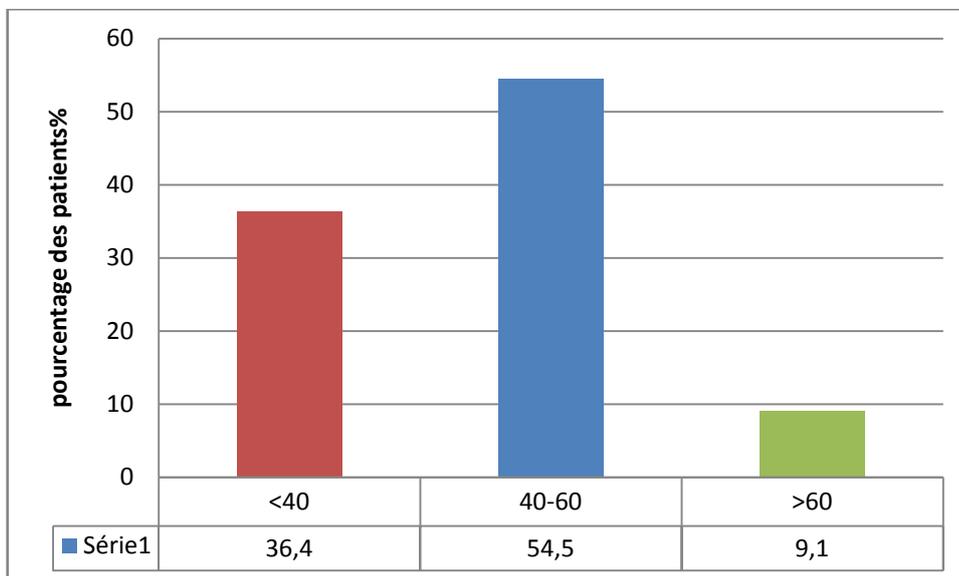


Figure 15: Répartition des patients selon la tranche d'âge.

La tranche d'âge la plus touchée était entre 51 ans et 60 ans, l'âge est un facteur de risque dans la leucémie myéloïde chronique.

➤ Le sexe ratio

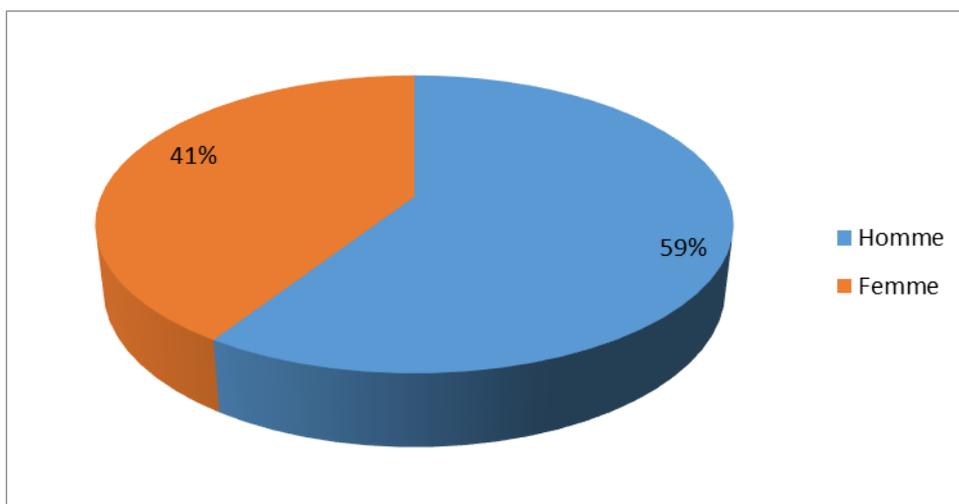


Figure 16: Répartition des patients selon le sexe.

Une prédominance masculine a été observée, avec un sexe ratio de 1,4 dont 9 femmes et 13 hommes.

➤ L'origine des patients

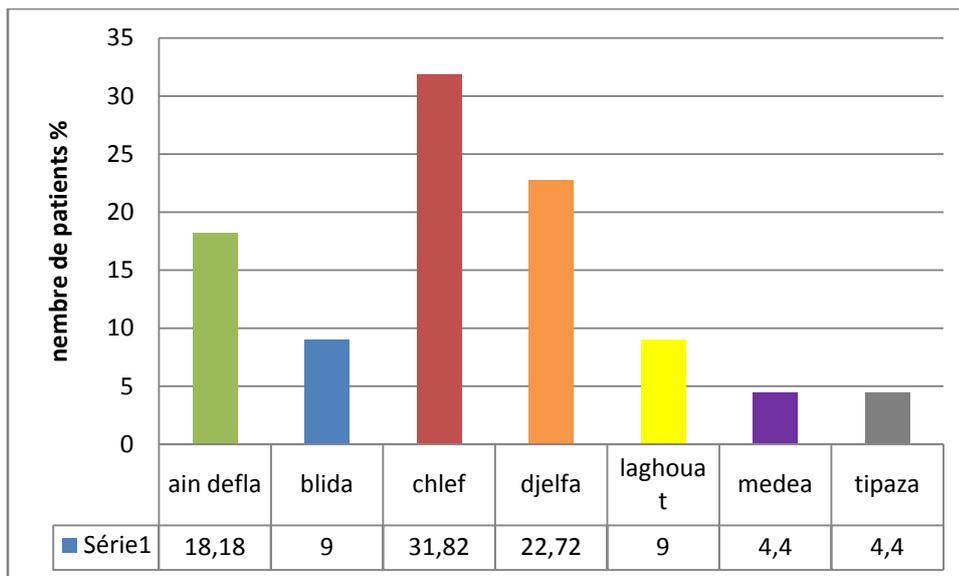


Figure 17 : Distribution des patients selon l'origine.

Les wilayas les plus touchées étaient : Chlef (7 patients), Djelfa (5 patients) et Ain Defla (4 patients).

➤ Le tableau clinique

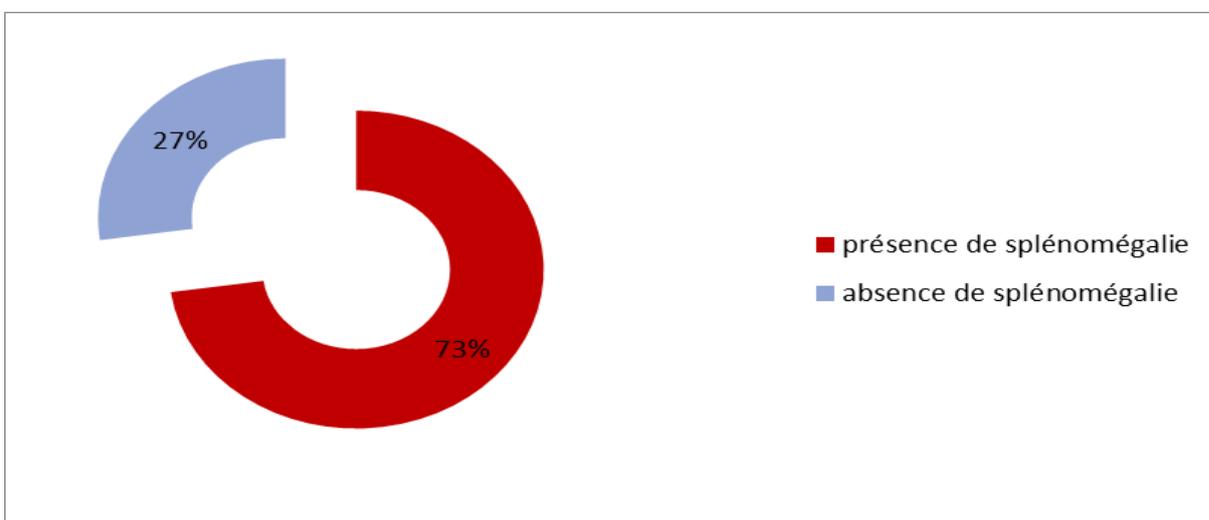


Figure 18: Répartition des patients selon la présence ou l'absence de la splénomégalie.

Une splénomégalie a été retrouvée chez 16/22 patients (72%) et absente chez 6 patients (27%).

➤ **Le taux des plaquettes**

Notre série présente un taux moyen de plaquettes de 430136,36 élément/l dont 8 patients ont présenté une thrombocytose avec un taux de plaquettes supérieur à 450000 élément/l et une thrombocythémie chez 1 patient avec des extrêmes allant de (165000 à 1030000 éléments/ μ l).

Tableau 5: Répartition des patients selon le taux de plaquettes.

| Taux de plaquettes | <450.000 éléments/ μ l | 450.000- 100.000éléments/ μ l | >100.000 éléments/ μ l |
|--------------------|-------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| Effectif | 13 (59,09%) | 8 (36,36%) | 1 (4,54%) |

III.1.2.Frottis sanguin

L'analyse du frottis sanguin a montré chez nos patients une myélocytose avec un taux moyen de 38,54 % avec des extrêmes allant de (15% à 55%).

- Basophiles

Nos patients ont présenté un taux moyen de basophilémie de 6,5% avec des extrêmes allant de (0% à 18%).

- Blastes

Chez nos patients le taux moyen des blastes étaient de 3,0% dont 2 patients avaient un taux de blastes supérieur à 5 % et 2 autres avaient un taux de blastes supérieur à 10%.

III.1.3.Myélogramme

Le myélogramme ayant objectivé une hyperplasie granuleuse majoritaire chez tous nos patients ; avec un taux moyen de blastes de 1,94% avec des extrêmes allant de(0% à 5%)

III.1.4.Caryotype et /ou FISH

Ils ont été réalisés systématiquement chez tous nos patients , ayant objectivé la présence de la translocation (9,22)(q34 ;q11) ou (le chromosome Philadelphie) par caryotype et la présence du signal de fusion BCR-ABL par FISHinterphasique avec un taux allant de 85 % à 100%

Ainsi que la présence des anomalies chromosomiques surajoutées telle que la délétion du dérivé 9 chez 2 patients ; un variant chez 2 patients ; un chromosome Philadelphie dupliqué chez un patient et une insertion (9,22) chez un autre patient.

III.1.5. Biologie Moléculaire

La biologie moléculaire en temps réel ou par méthode automatisée n'est pas faite de façon systématique au diagnostic sauf chez deux patients où elle a objectivé le transcrite BCR-ABL de type Mbc (b3a2).

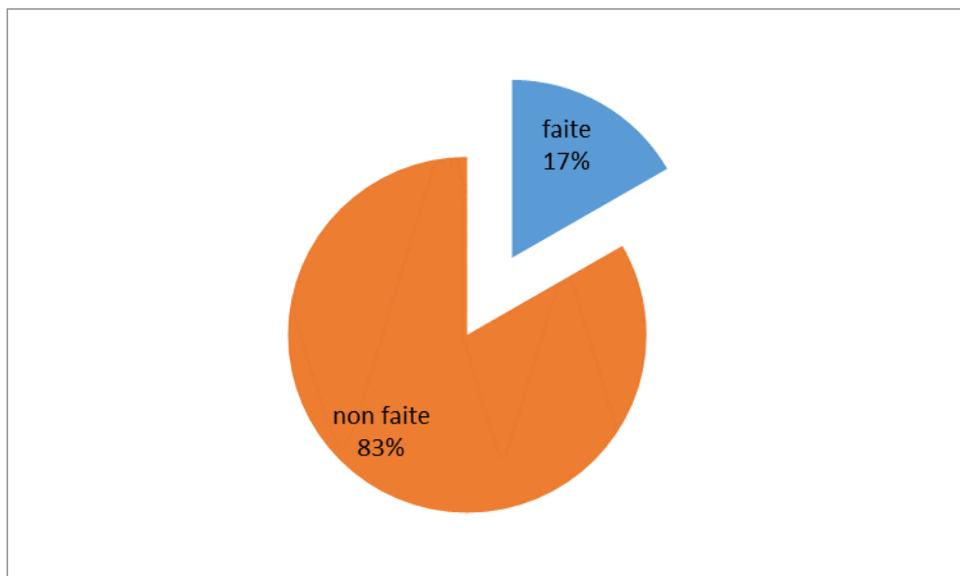


Figure 20 : Pourcentage de l'utilisation de la PCR automatisée pour le diagnostic.

III.2 Phases de la maladie

Parmi les 22 patients de notre étude, 21 patients ont été diagnostiqués en phase chronique et un seul patient en phase accélérée.

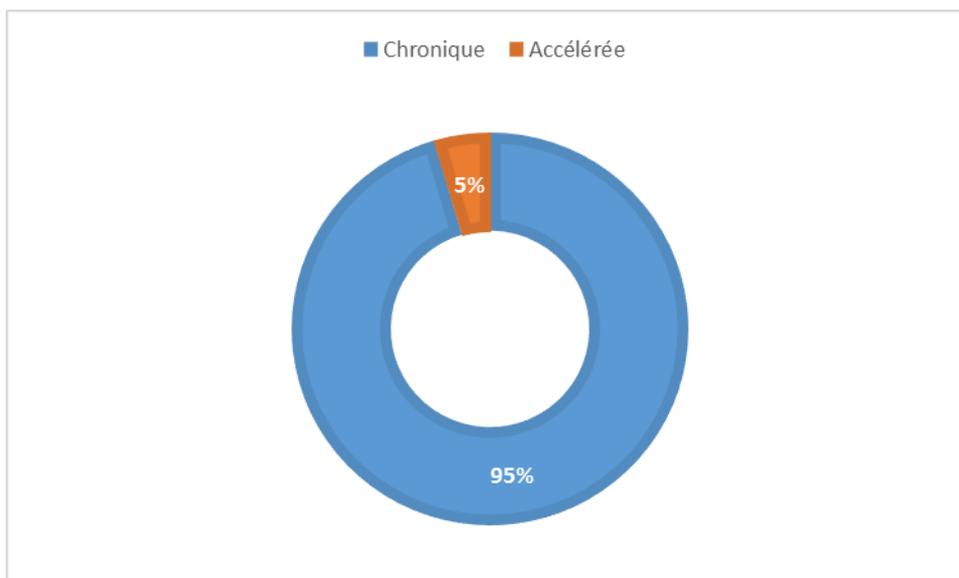


Figure 21: Répartition des patients selon les phases de la maladie.

III.3 Score Pronostique

Nos patients ont été classés selon le score pronostique de Sokal qui nous a permis de les répartir en 3 groupes :

- Un groupe à bas risque, composé de 5 patients.
- Un groupe à risque intermédiaire, de 9 patients.
- Un groupe à haut risque, de 8 patients.

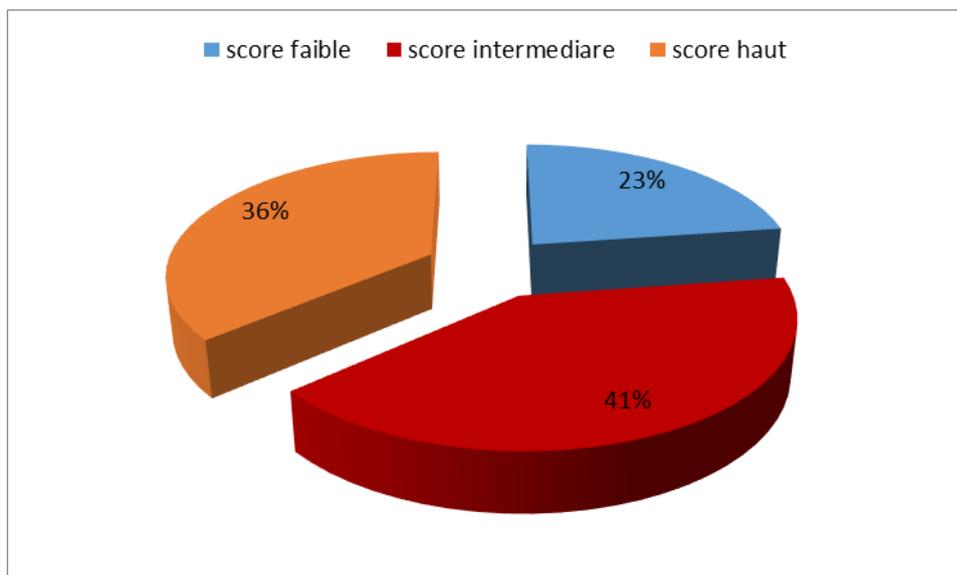


Figure 22 : Division des patients selon le score de Sokal.

B. Traitement

Tous les patients LMC -PC ont reçu de l'Imatinib à la dose de 400 mg/jour en une seule prise. Le patient en phase accélérée a reçu l'Imatinib à la dose 600 mg/jour.

III.1 Le suivi du traitement

Le suivi du traitement ou le suivi de la maladie résiduelle (MRD) a été réalisé chez tous nos patients par la RQ-PCR, grâce à un automate Gene Expert ultra (Céphéide) avec une sensibilité maximale de 0,003% (RM^{4-5}), en mettant en évidence le transcrite BCR-ABL chez nos patients.

III.2 La réponse au traitement de première ligne

Pour évaluer la réponse au traitement dans notre série, nous avons opté pour la surveillance selon les recommandations de l'ELN 2013. Nous avons analysé la réponse hématologique complète en première intention puis la réponse cytogénétique et moléculaire par la RQ-PCR automatisée Gene Expert ultra. Nos résultats sont comme suit :

III.3 Réponse à 3 mois

Les 21 patients ont été évalués :

- ✓ Une réponse hématologique complète a été obtenue chez les 100% des patients (soit les 21 patients).
- ✓ Un taux de transcrits BCR-ABL inférieur ou égal à 10% a été observé chez 13 patients dont 05 patients avaient un taux de 0 % de chromosome Philadelphie (Ph+) en cytogénétique et 5 patients avaient un taux entre 1% et 35% de Ph+.
- ✓ Le taux de BCR-ABL supérieur à 10% a été observé chez 4 patients dont 2 patients avaient un taux de Ph+ entre 35% et 95%.
- ✓ Un patient dont le taux de transcrite était supérieur à 95% a bénéficié d'un switch vers l'anti tyrosine kinase de deuxième génération.

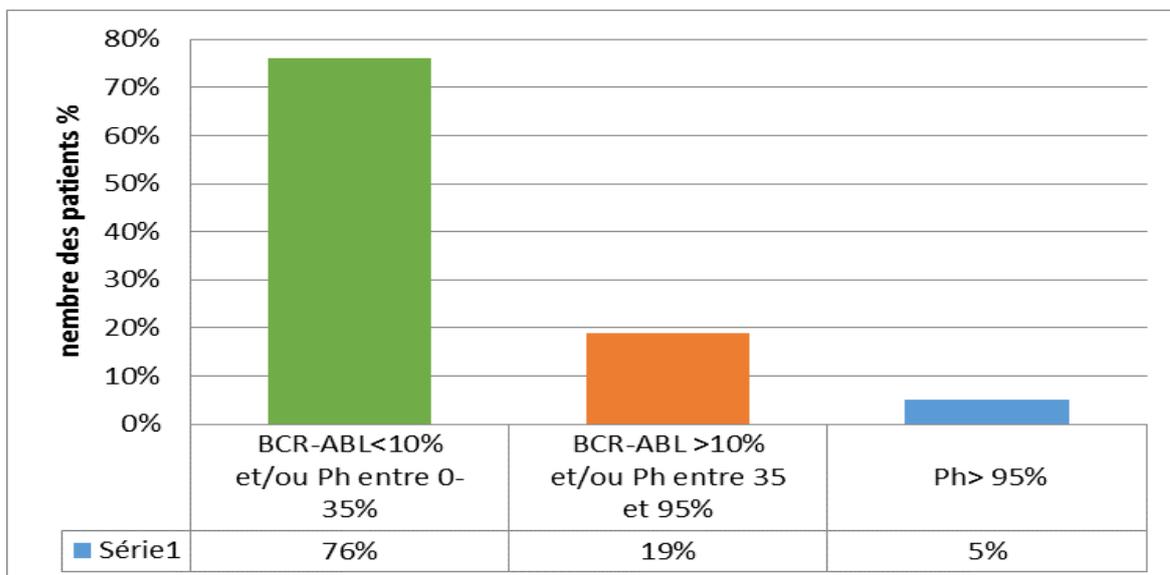


Figure 23 : Résultats du transcrit bcr/abl après 3 mois de traitement.

III.4 Réponse à 6 mois

17/21 patients ont été évalués à 6 mois de traitement :

- ✓ Une réponse hématologique complète a été observée chez 17 patients.
- ✓ Le taux BCR-ABL est inférieur à 1% chez 11 patients dont 6 patients étaient à 0% de Ph⁺ en cytogénétique.
- ✓ 3 patients avaient un taux de BCR-ABL entre 1-10% et un taux de Ph⁺ entre 1 et 35%.
- ✓ 3 patients avaient un taux de transcrits BCR-ABL supérieur à 10% dont un avait un taux de Ph⁺ supérieur à 35%, où ils ont bénéficié tous d'un switch vers l'anti tyrosine kinase de deuxième génération.

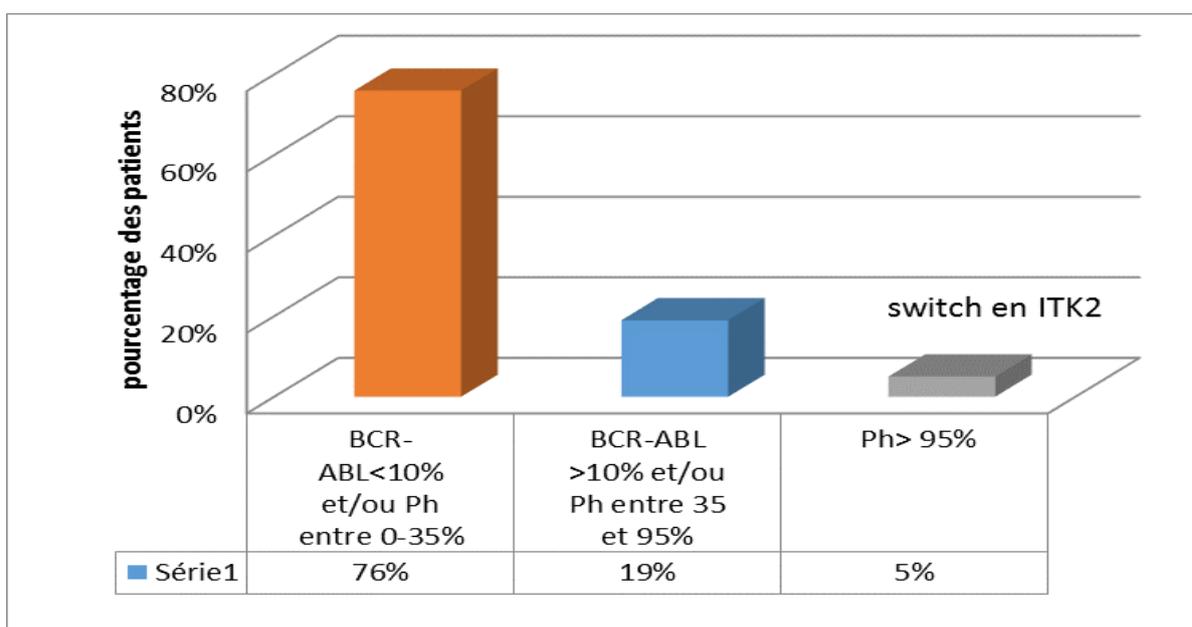


Figure 24: Résultats du transcrit bcr/abl à 6 mois.

III.5 Réponse à 12 mois

12/21 patients ont été évalués :

- ✓ Le taux de transcrits BCR-ABL est inférieur à 0,1% chez 6 patients dont 3 patients avaient 0% de Ph+.
- ✓ Deux patients avaient un taux de BCR-ABL entre 0,1-1% dont un avait un taux de Ph+ entre 1 et 35%.
- ✓ 2 patients avaient un taux de BCR-ABL >1% dont un a bénéficié d'un switch vers l'antityrosine kinase de deuxième génération.

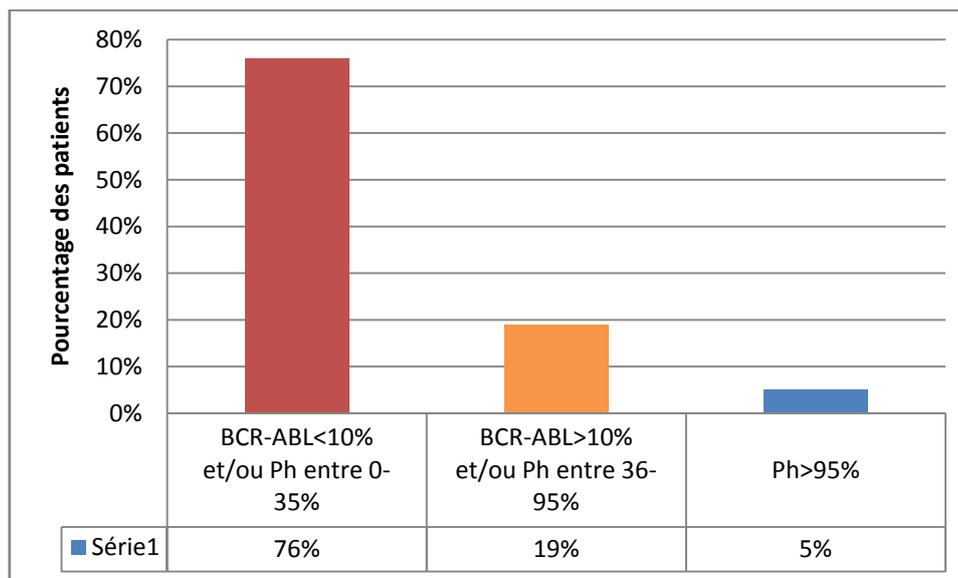


Figure 25 : Résultats de transcrit bcr/abl après 12 mois de traitement.

III.6 Réponse à 18 mois

7 patients sont évalués à 18 mois de traitement

- ✓ 5 patients avaient un taux de BCR-ABL inférieur ou égal 0,1%.
- ✓ 2 patients avaient un taux de transcrits BCR-ABL supérieur à 1% dont 1 patient a été switcher vers l'antityrosine kinase de deuxième génération.

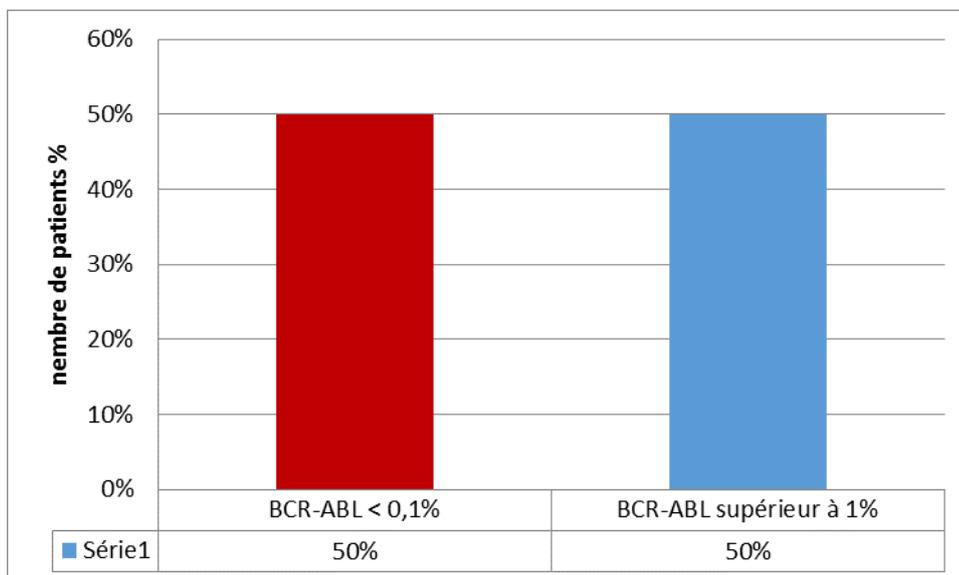


Figure 26: Résultats du transcrit bcr/abl après 18 mois de traitement.

III.7 Réponse à 24 mois :

2 patients ont été évalués à 24 mois et plus de traitement

- ✓ Un patient avait un taux de BCR-ABL supérieur à 1% (54%).
- ✓ Un patient avait un taux de transcrit BCR-ABL inférieur ou égal 0,1% à 24 et 36 mois.

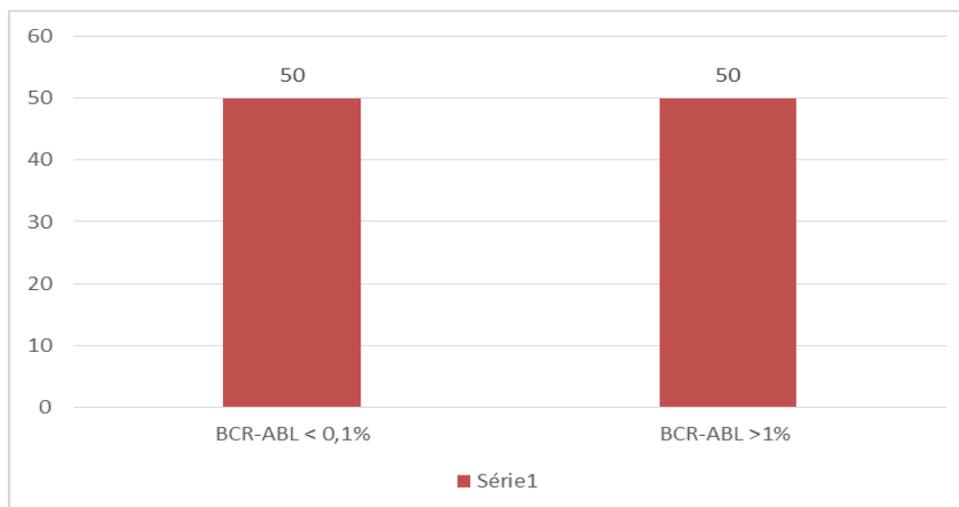


Figure 27 : Résultats du transcrit bcr/abl après 24 mois et plus de traitement.

III.8 Illustration de cas selon la réponse au traitement

Le suivi par le Gene-Xpert a permis de répartir les patients en trois groupes, selon le taux de transcrit BCR-ABL.

- **Premier groupe :** Bonne réponse au traitement ou la réponse optimale

Premier cas :

- **Initial** : MF.
- **Sexe** : Féminin.
- **Age** : 41 ans.
- **Origine** : Chlef.
- **Date de diagnostic** : Le 25/02/2018.
- **FISH / Caryotype** : Taux de t(9 ; 22)(q34;q11) égale à 100%.
- **Signe clinique** : Une splénomégalie.
- **Signes biologiques** : Une hyperleucocytose à 247470 éléments/mm³, une myélémie à 52%, une anémie à 11,2 gr/dl et un score de sokal intermédiaire.
- **Traitement** : Jour 1 de l'Imatinib : Le 13/03/2018

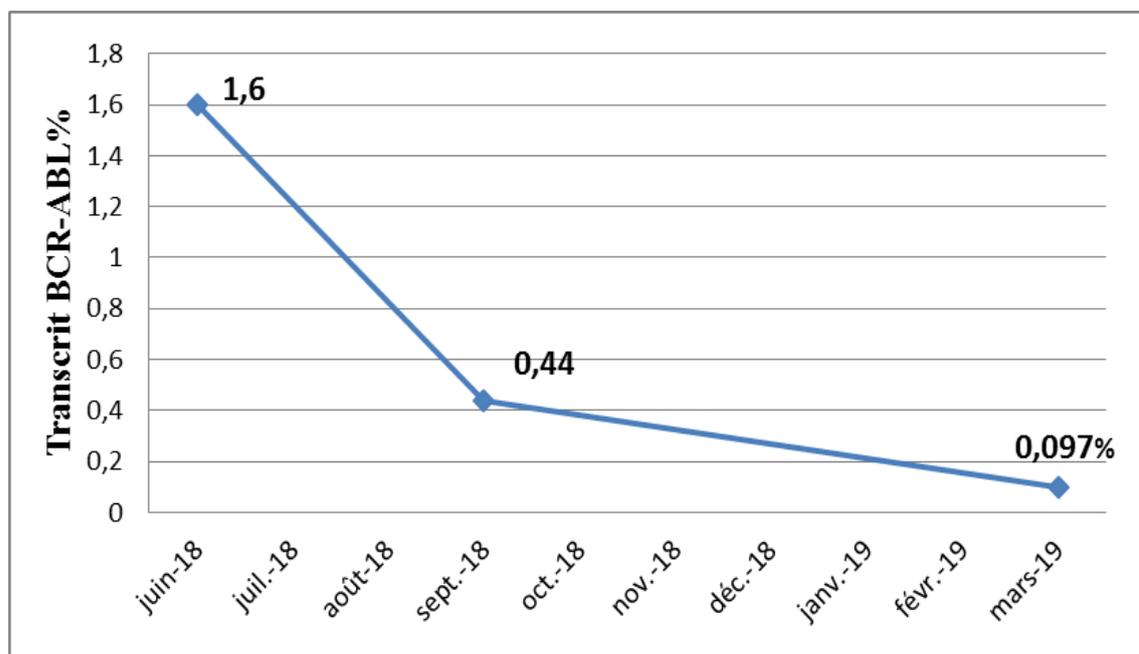


Figure 28 : Résultats de suivi moléculaire du patient N°1.

D'après la cinétique de la réponse, l'imatinib a permis de diminuer le taux de transcrits BCR-ABL et d'obtenir une rémission moléculaire majeure après 12 mois de traitement ce qui a permis de poursuivre l'Imatinib.

Deuxième cas :

- **Initial** : BM.
- **Sexe** : Masculin.

- **Age** : 54 ans.
- **Origine** : Djelfa.
- **Date de diagnostic** : Le 18/06/2017.
- **FISH/Caryotype** : Un simple chromosome de Philadelphie (ph+) a été observé dans 90% des noyaux, et un double ph+ dans 10% des noyaux.
- **Signe clinique** : Une splénomégalie.
- **Signes biologiques** : Une hyperleucocytose à 234180 éléments/mm³, une thrombocytose à 601000 éléments/mm³, une myélémie à 36%, une anémie à 10,7 gr/dl et un score de sokal élevé.
- **Traitement** : Jour 1 de l'Imatinib : Le 06/07/2017.

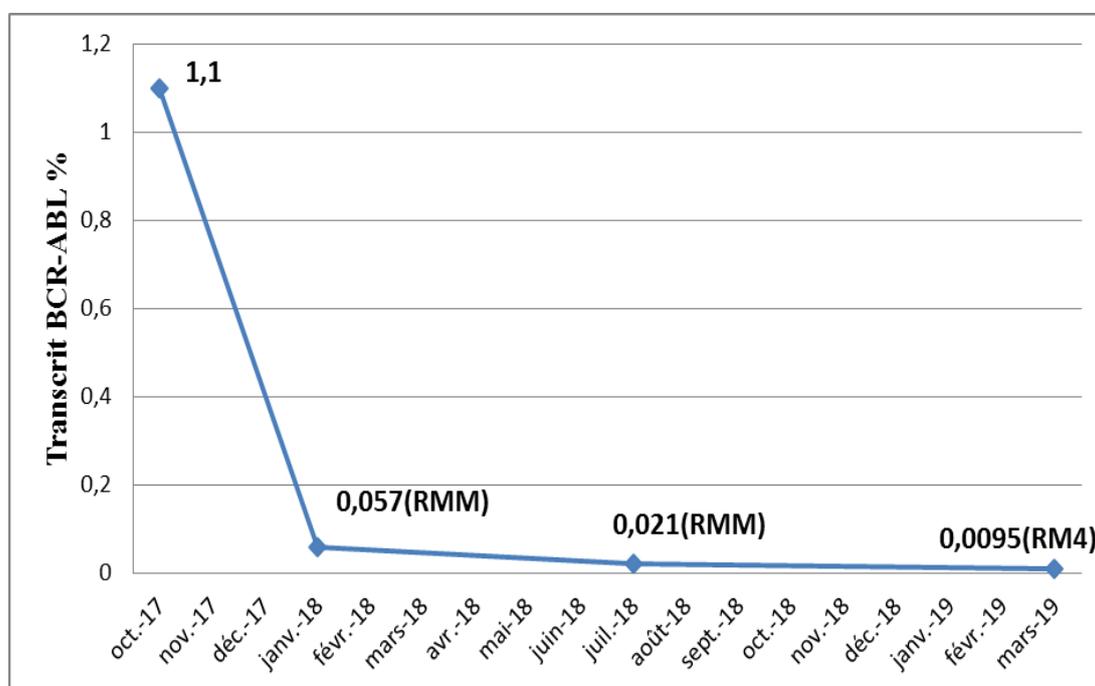


Figure 29: Résultats de suivi moléculaire du patient N°2.

D'après la cinétique de la réponse, le taux de transcrite BCR-ABL observé après 3 mois de traitement par imatinib égal à 1,1%. Une réponse moléculaire majeure a été observée après 6 et 12 mois du traitement, et une réponse moléculaire profonde (RM4) égal à 0,0095% après 18 mois.

➤ **Deuxième groupe** : les mauvais répondeurs

Premier cas :

- **Initial** : MM.

- **Sexe** : Masculin.
- **Age** : 29 ans.
- **Région** : Chlef.
- **Date de diagnostic** : Le21/06/2017.
- **FISH** : Présence du chromosome Philadelphie dans 97% des noyaux.
- **Signes cliniques** : Une splénomégalie.
- **Signes biologiques** : Une hyperleucocytose à 316830 éléments/mm³, une myélémie à 47%, une anémie sévère à 6,3 gr/dl et un score de sokalintermédiaire.
- **Traitement** : Jour 1 de l'Imatinib : Le 13/07/2017.

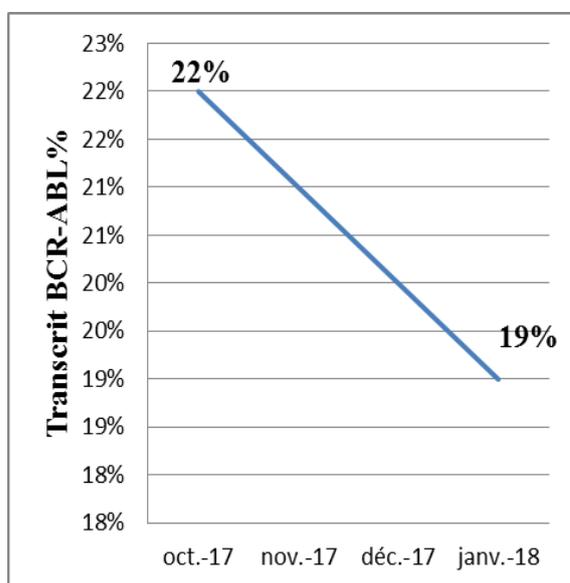


Figure 31 : Résultats de suivi moléculaire du patient N°3.

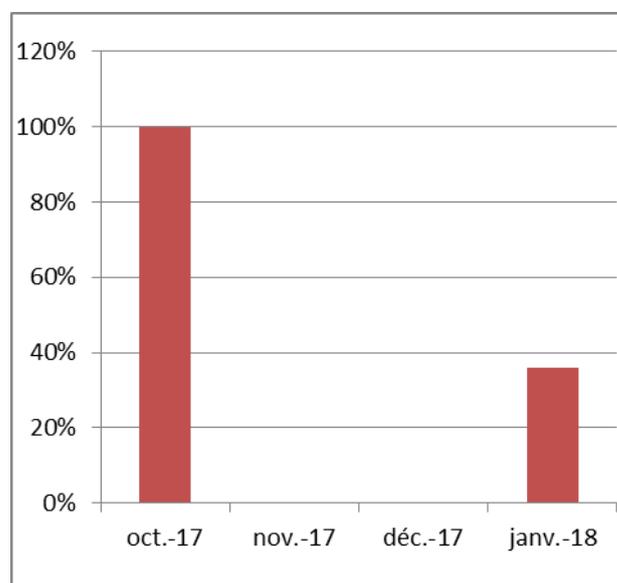


Figure 30 : Résultats de suivi cytogénétique du patient N°3.

Après 3 mois de traitement par imatinib, le patient a présenté un taux de transcrite BCR-ABL égal à 22% ; et aucune réponse cytogénétique n'a été observée ; d'où l'augmentation de la dose de l'imatinib à 600g/jour a été prescrite. (Sans optimisation des doses de l'imatinib / Dosage sérique de l'imatinib).

A 6 mois, une réponse cytogénétique mineure a été obtenue avec un taux de transcrits BCR-ABL toujours supérieur à 10% ce qui nécessite un switch vers un ITK de deuxième génération le dasatinib.

Deuxième cas :

- **Initial** : MS.
- **Sexe** : féminin.

- **Age** : 38 ans.
- **Origine** : Ain Defla.
- **Date de diagnostic** : Le 06/11/2017.
- **FISH** : Observation du chromosome de Philadelphie dans 96% des noyaux.
- **Signes cliniques** : Une splénomégalie.
- **Signes biologique** : Une hyperleucocytose à 123520 éléments/mm³, une myélémie à 15%, une anémie à 9 gr/dl et un score de sokal haut.
- **Traitement** : Jour 1 de l'Imatinib : Le 30/11/2017.

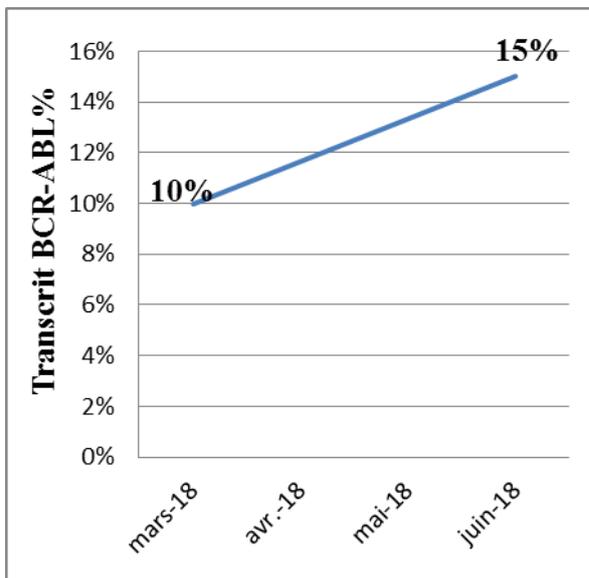


Figure 33: Résultats de suivi moléculaire de patient N°4.

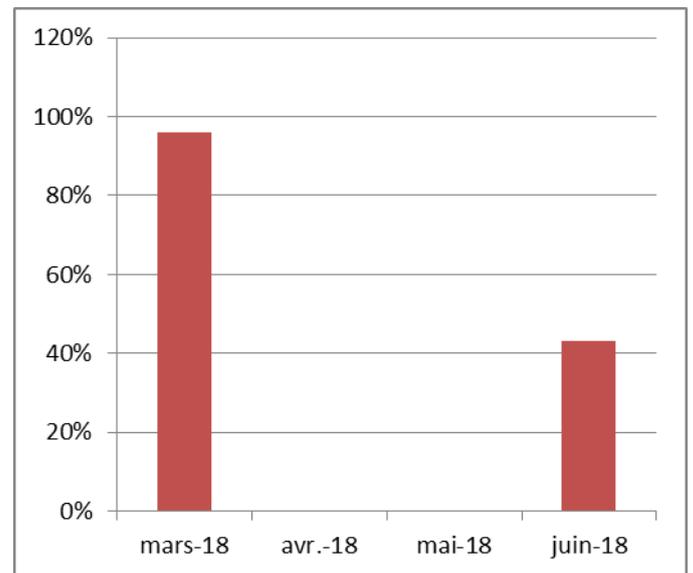


Figure 32 :Résultatsde suivi cytogénétique du patient N°4.

Après 3 mois de traitement par imatinib aucune réponse cytogénétique n'a été observée et le taux de transcrits BCR-ABL était égal à 20%.

Après 6 mois de l'imatinib, le taux de transcrits BCR-ABL a augmenté par rapport à la première évaluation ; donc une progression par échec à l'imatinib le patient a été switcher a l'ITK de deuxième génération le nilotinib.

➤ **Troisième groupe : Résistants aux anti tyrosines kinases**

- **Initial :** MH.
- **Sexe :** Féminin.
- **Age :** 27 ans.
- **Origine :** Ain Defla.
- **Date de diagnostic :** Le 23/02/2015.
- **FISH/ caryotype :** Taux de t(9;22)(q34;q11) égale à 100%.
- **Signes cliniques :** Une splénomégalie, phase accélérée de la maladie.
- **Signes biologiques :** Une hyperleucocytose à 116620 éléments/mm³, une thrombocytose à 658000 éléments/mm³, une myélémie à 36%, une anémie à 11.8gr/dl et un score de sokal haut.
- **Traitement :** jour 1 de l'Imatinib : Le 09/03/2015.

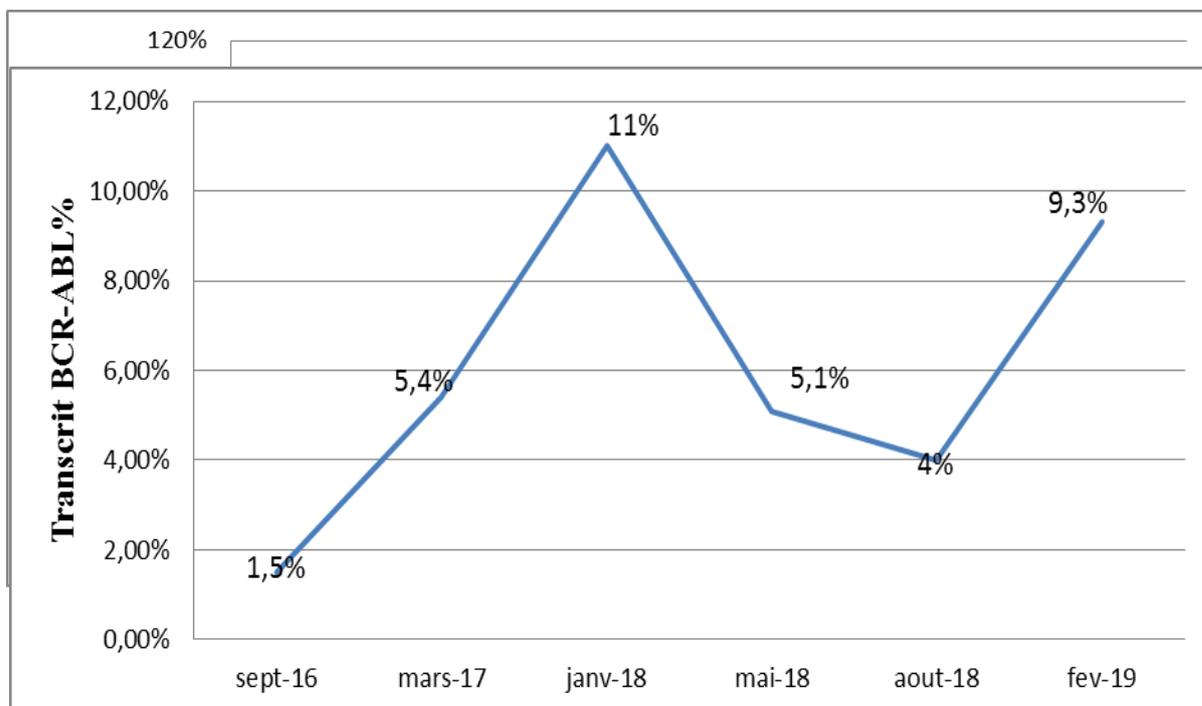


Figure 35 :Résultats de suivi moléculaire du patient N°5.

Le suivi du traitement dans les quatre premiers contrôles a été réalisé par FISH. Après 12 mois de l'imatinib on observe qu'il existe une réponse cytogénétique partielle.

À partir du 5^{ème} contrôle, la PCR a été réalisée pour détecter le transcrite BCR-ABL. On observe que ce dernier a augmenté après 24 mois du traitement par imatinib, la patiente a été switcher vers lenilotinib.

Evaluation du deuxième ITK de deuxième génération

Après 3 mois de la prise du nilotinib, on observe une augmentation du taux de transcrits BCR-ABL, la patiente a bénéficié du 2^{ème} ITK2, le dasatinib.

Après 3 et 6 mois de traitement par dasatinib le taux de transcrits BCR-ABL était à 4 et 9,3% respectivement, d'où un échec au 3^{ème} ITK disponible. L'intérêt d'avoir l'ITK de troisième génération.

IV. DISCUSSION

La leucémie myéloïde chronique est un syndrome myéloprolifératif clonal à prédominance granuleuse, caractérisée par une anomalie cytogénétique unique et acquise : le chromosome Philadelphie « Ph ».

Le diagnostic de la LMC repose sur un diagnostic clinique, cytologique, biologique et un diagnostic moléculaire.

L'objectif de notre étude était de définir l'intérêt de la biologie moléculaire par la PCR automatisée dans la recherche quantitative du transcrit M-BCR-ABL dans la leucémie myéloïde chronique (LMC) ; au diagnostic et au suivi des patients sous anti tyrosines kinases de première génération l'imatinib en vue de la surveillance de la maladie résiduelle (MRD) ou la réponse moléculaire selon les recommandations de l'ELN 2013.

Elle a portée sur 22 patients suivis au laboratoire de recherche de cytogénétique conventionnelle et moléculaire du service d'hématologie de l'EHSELCC de Blida.

Au moment de diagnostic, tous nos patients soit les 100% avaient la translocation t(9 ; 22).

Sur les 22 patients atteints de la LMC ; nous avons eu 13 hommes (59%) et 9 femmes (41%) ; on note une prédominance masculine avec un sexe ratio H/F =1,4 et un âge médiane de 45 ans.

Ces résultats se rapprochent à celui de **Hughes et al [15]** qui a trouvé une prédominance masculine avec un sexe ratio de 1,3 et avec celui de **Djouadi et al [17]** qui apporte un sexe ratio de 1,2 et un âge médiane de 48 ans.

Sur le plan clinique, la splénomégalie est retrouvée dans la majorité des cas (73%) chez nos patients, représentant ainsi un maître symptôme de la maladie.

Les résultats qu'on a trouvé concordent avec celui de **Rea[45]** qui avait retrouvé chez plus de 50% des cas la splénomégalie.

Cependant, ils sont inférieurs à ceux retrouvés par **Kueviakoet al [76]** et **Mukiihi et al [77]** qui ont trouvé respectivement une proportion de 87,3% et 86,7%.

Sur le plan biologique, l'hémogramme a montré une hyperleucocytose majeure chez tous nos patients avec un taux moyen de 209084,091 éléments/mm³ avec des extrêmes allant de [30000 à 594000] ce qui concorde avec celui de **Kueviakoet al [76]** trouvent une valeur moyenne de leucocytose 204930 éléments/mm³.

L'étude comparative de nos résultats aux données de **Burkina Faso [78]**, permet de noter que la leucocytose moyenne 243000 éléments/mm³ est également supérieur à celle observé chez nos patients ; en outre on a observé 63% de cas avec un taux de globules blancs entre 100.000-400.000/mm³ et 10% étaient supérieur à 400.000/mm³ au moment de diagnostic.

Alors que ce taux de globules blancs dépasse 400.000/mm³ dans 50% des cas dans la série **Aghrbi [79]**. Cette différence peut être expliquée que le diagnostic est plus précoce chez nos patients. Le nombre de plaquettes varie entre 165000 et 1030000 éléments/mm³ avec une moyenne de 430136,36 éléments/mm³ chez nos patients.

Nos résultats sont supérieurs à celle de **Sanogo en 2010 [80]** qui a apporté une moyenne de 360800 éléments/mm³ et se rapproche aux résultats obtenus par **Mukihi en 2008 [77]**.

Nous avons noté une thrombocytémie chez 45% des patients ; une thrombocytose chez 36.3% des cas, alors que 59% avaient un taux de plaquettes normal.

Nos résultats sont opposés à ceux obtenus par **Mukihi et al [77]** en 2008 qui ont observé une thrombocytose dans 44% des cas ; un nombre de plaquette normal dans 42% des cas.

Selon nos résultats et les résultats de **Mukihi et al** ; on constate que le taux de plaquette est le plus souvent élevé ou normal.

La thrombocytose peut être expliquée par l'activation constitutive de la voie JAK/STAT qui l'une des voies déclenchées par le BCR-ABL et qui est une voie responsable de la production des plaquettes et des mégacaryocytes.

La moyenne de taux d'hémoglobine chez nos patients était de 10,36 g/dl, nos résultats se rapprochent de ceux obtenus par **Segbena en 2012 [81]** qui a retrouvé une moyenne de 10,57 g/dl.

Une anémie a été observée chez 59% des malades ; nos résultats sont inférieurs à ceux obtenus par **Kueviakoet al en 2014 [76]** qui ont observés une anémie chez 88,89% des patients.

Il est bien connu dans la littérature que la LMC est une maladie progressive, caractérisée non seulement par une augmentation du nombre de globules blancs et de plaquettes mais aussi par une diminution du nombre de globule rouge associées à des modifications clinique, en particulier la rate.

D'après nos connaissances sur le BCR-ABL, normalement on a un nombre élevé de globule rouge, car le BCR-ABL active de manière constitutive plusieurs voies de signalisation dont la voie JAK/STAT qui est responsable de la production de globules rouges.

Le BCR-ABL active cette voie même en absence du signal extracellulaire conduisant à un nombre élevé du globule rouge.

On peut expliquer cette contradiction par la diminution de taux d'hémoglobine chez nos patients, car en absence de ce dernier la capacité des érythrocytes à transporter l'oxygène est réduite, ce qui fait que la rate détruit les globules rouges et les fait sortir de la circulation sanguine.

L'examen de frottis sanguin permet de déterminer le taux de blastes et de myélémie dans le sang. Chez nos patients le taux moyen des blastes était 3,0% avec des extrêmes allant de [0 à 15%].

Seulement, deux patients soit 9,09% avaient un taux de blastes supérieur à 10%. Les résultats qu'on a trouvé concorde avec les données de la littérature [47] qui portent à la connaissance que le taux de blastes sanguins dans le cas d'une LMC en phase chronique est inférieur à 10%.

Le taux des précurseurs de la lignée granuleuse (myélémie) était compris entre 15 et 55% avec une moyenne de 38,54%.

La majorité de nos patients (95,5%) avait un taux supérieur à 20% ce qui confirme les données de la littérature [46] ; qui informe que le taux de myélémie en cas de LMC doit être supérieur à 20%.

Les résultats de suivi moléculaire par la PCR en temps réel automatisée nous ont permis de répartir les patients sous traitement en 3 groupes : bonne réponse, mauvaise réponse et échec thérapeutique.

Tous nos patients soit 100% avaient une réponse hématologique complète (RHC), nos résultats concordent avec les recommandations de l'ELN 2013 [75] qui définit la RHC par une absence de la rate, une numération sanguine normale, une absence de myélémie et un taux de blastes inférieur à 5%.

Après 3 mois de traitement : 66,66% des patients avaient une réponse optimale (réponse moléculaire et cytogénétique) ; 23,80% étaient en warning et 9,54% en échec thérapeutique (**Tableau II**), qui ont nécessité un switch vers une antityrosine kinase de deuxième génération.

Après 6 mois de traitement : 64,70% des patients avaient une réponse optimale dont 1 cas était en RMM3 ; 11,76% étaient en avertissement et 23,54% avaient un échec thérapeutique. Ce qui nécessite un switch vers une antityrosine kinase de deuxième génération.

Après 12 mois de traitement 53,84% des patients avaient une réponse optimale dont 1 patient était en RMM3 ; 23,07% étaient en alerte et 23,09% en échec qui a nécessité un switch vers un anti tyrosine kinase de deuxième génération.

Après 18,24 mois et plus de traitement : 71,42% des patients avaient une réponse optimale dont 42,85% avaient une RMM4.5 ; 42,85% avaient une RMM4 et 14,28 des cas avaient une RMM5 après 36 mois de traitement(**Tableau II**).

Les résultats qu'on a obtenu nous ont permis de répartir les patients en 3 groupes :

- Les patients du premier groupe qui avaient une diminution de taux de ratio BCR-ABL/ABL , le traitement a permis d'obtenir une rémission moléculaire chez 7 patients (32%) dont deux RMM3, deux RMM4, deux RMM4.5 et une RMM5. Selon ces résultats on peut dire que l'imatinib est très efficace en première ligne.

Comparativement à la littérature internationale, les données de l'étude **IRIS (82,83,84)**, le taux de réponse cytogénétique complète après une année d'imatinib est de 49% à 77% et la réponse moléculaire aussi après une année en moyenne de 18% à 58% , avec un meilleur taux de RMM après 8 ans de 86% ; donc nous nous rapprochons des données de la littérature sur le taux de la RMM , sauf que le recul est insuffisant pour cette petite série

- Les patients de deuxième groupe avaient une augmentation du taux de BCR-ABL après chaque contrôle, ce qui signifie que ces patients n'ont pas répondu à l'imatinib en première ligne et nécessite une deuxième ligne.

Ces échecs thérapeutiques à l'imatinib en première ligne ont nécessité une autre arme plus puissante qui sont les ITK2 qui ont un spectre plus large sur les mutations d'où une efficacité plus importante en RMM.

- Le suivi moléculaire a permis de marquer un échec moléculaire aux 3 ITKs disponibles chez les patients de troisième groupe, d'où l'intérêt d'avoir la troisième génération et la biologie moléculaire avec séquençage (NGS) pour la recherche du profil mutationnel afin de conditionner la conduite du traitement de première ligne.

CONCLUSION

Au terme de notre étude, il en ressort que la mise à profit des techniques biomoléculaires dans le diagnostic et le monitoring des transcrits BCR-ABL, s'avère indispensable pour assurer une meilleure prise en charge des patients atteints de LMC. En effet, de par sa sensibilité et sa standardisation, la PCR constitue un puissant outil pour évaluer l'efficacité du traitement et par conséquent surveiller la maladie résiduelle.

A la lumière de ce qui précède, certaines dispositions sont à préconiser, en l'occurrence :

- La sensibilisation des citoyens à faire un bilan de santé périodique, incluant impérativement un hémogramme nécessaire à un éventuel diagnostic précoce.

- Eduquer les patients à la prise régulière et continue du traitement et le respect du calendrier des investigations biomoléculaires ainsi que les rendez-vous des consultations médicales, suggérant ainsi une surveillance rigoureuse des cas à réponse moléculaire sous-optimale ou un échec.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., ...&Vardiman, J. W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, *127*(20), 2391-2405.
2. Clarke, M. F. (2004). Chronic myelogenous leukemia—identifying the hydra's heads. *New England Journal of Medicine*, *351*(7), 634-636.
3. Nowell, P., & Hungerford, D. (1960). A minute chromosome in human chronic granulocytic. *Science*, *132*, 1497.
4. Rowley, J. D. (1973). A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenousleukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*, *243*(5405), 290.
5. Ben-Neriah, Y., Daley, G. Q., Mes-Masson, A. M., Witte, O. N., & Baltimore, D. (1986). The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science*, *233*(4760), 212-214.
6. Deininger, M. W., Goldman, J. M., &Melo, J. V. (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, *96*(10), 3343-3356.
7. Hughes, T. P., Ross, D. M., &Melo, J. V. (2014). *Handbook of Chronic Myeloid Leukemia*. Springer.
8. Bennett, J. H. (1845). Case of hypertrophy of the spleen and liver, in which death took place from suppuration of the blood. *Edinburgh Med Sug J*, *64*, 413-423.
9. Tefferi, A. (2008). The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. *Leukemia*, *22*(1), 3.
10. Dameshek, W. (1951). Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*, *6*(4), 372-375.
11. Heisterkamp, N., Stam, K., Groffen, J., de Klein, A., &Grosveld, G. (1985). Structural organization of the bcr gene and its role in the Ptranslocation. *Nature*, *315*(6022), 758.
12. Konopka, J. B., Watanabe, S. M., & Witte, O. N. (1984). An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell*, *37*(3), 1035-1042.
13. Druker, B. J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G. M., Fanning, S., ...&Lydon, N. B. (1996). Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr–Abl positive cells. *Nature medicine*, *2*(5), 561.

14. Druker, B. J., Talpaz, M., Resta, D. J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J. M., ...& Sawyers, C. L. (2001). Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, 344(14), 1031-1037.
15. Hughes, T. P., Ross, D. M., & Melo, J. V. (2014). Management of patients with chronic myeloid leukemia. In *Handbook of Chronic Myeloid Leukemia* (pp. 35-51). Adis, Cham.
16. Castagnetti, F., Gugliotta, G., Baccarani, M., Breccia, M., Specchia, G., Levato, L., ...& Pregnò, P. (2014). Differences among young adults, adults and elderly chronic myeloid leukemia patients. *Annals of Oncology*, 26(1), 185-192..
17. Djouadi, K., Harieche, F., et al (2016). Approche épidémiologique de la leucémie méloïde chronique : Etude Algéro-Tunisienne. A propos de 1195 cas sur 05 ans (2010 - 2014). *Revue Algérienne D'hématologie*.
18. Heyssel, R., Brill, A. B., Woodbury, L. A., Nishimura, E. T., Ghose, T., Hoshino, T., & Yamasaki, M. (1960). Leukemia in Hiroshima atomic bomb survivors. *Blood*, 15(3), 313-331.
19. Van Maele-Fabry, G., Duhayon, S., Mertens, C., & Lison, D. (2008). Risk of leukaemia among pesticide manufacturing workers: a review and meta-analysis of cohort studies. *Environmental research*, 106(1), 121-137.
20. Bruzzoni-Giovanelli, H., González, J. R., Sigaux, F., Villoutreix, B. O., Cayuela, J. M., Guilhot, J., ... & Rousselot, P. (2015). Genetic polymorphisms associated with increased risk of developing chronic myelogenous leukemia. *Oncotarget*, 6(34), 36269.
21. Ansari, M., & Krajcinovic, M. (2007). Pharmacogenomics of acute leukemia.
22. Heerema-McKenney, A., & Arber, D. A. (2009). Acute myeloid leukemia. *Hematology/oncology clinics of North America*, 23(4), 633-654.
23. Groffen, J., Stephenson, J. R., Heisterkamp, N., de Klein, A., Bartram, C. R., & Grosveld, G. (1984). Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*, 36(1), 93-99.
24. Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., O'Brien, S., Kurzrock, R., & Kantarjian, H. M. (1999). The biology of chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, 341(3), 164-172.
25. Deininger, M. W., Goldman, J. M., & Melo, J. V. (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 96(10), 3343-3356.

26. Van Etten, R. A. (1999). Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends in cellbiology*, 9(5), 179-186.
27. Taagepera, S., McDonald, D., Loeb, J. E., Whitaker, L. L., McElroy, A. K., Wang, J. Y., & Hope, T. J. (1998). Nuclear-cytoplasmic shuttling of C-ABL tyrosine kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(13), 7457-7462.
28. BENGUERAICHI, F. (2014) . Analyse mutationnelle du gène JAK2 V617F et son association potentielle à la translocation BCR-ABL dans la leucémie myéloïde chronique . Université Mohamed KHIDER Biskra.
29. Hantschel, O., Nagar, B., Guettler, S., Kretschmar, J., Dorey, K., Kuriyan, J., &Superti-Furga, G. (2003). A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl. *Cell*, 112(6), 845-857.
30. Zhu, J., & Shore, S. K. (1996). c-ABL tyrosine kinase activity is regulated by association with a novel SH3-domain-binding protein. *Molecular and cellular biology*, 16(12), 7054-7062.
31. Wang, J. Y. (2000). Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase. *Oncogene*, 19(49), 5643.
32. Yuan, Z. M., Shioya, H., Ishiko, T., Sun, X., Gu, J., Huang, Y., ...&Kufe, D. (1999). p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature*, 399(6738), 814.
33. Sorel, N., Cayssials, É.,Brizard, F., &Chomel, J. C. (2017, March). Actualisation des traitements et du suivi moléculaire dans la prise en charge de la leucémie myéloïde chronique. In *Annales de Biologie Clinique* (Vol. 75, No. 2, pp. 129-145).
34. Wetzler, M., Talpaz, M., Van Etten, R. A., Hirsh-Ginsberg, C., Beran, M., &Kurzrock, R. (1993). Subcellular localization of Bcr, Abl, and Bcr-Abl proteins in normal and leukemic cells and correlation of expression with myeloid differentiation. *The Journal of clinical investigation*, 92(4), 1925-1939.
35. Wetzler, M., Talpaz, M., Yee, G., Stass, S. A., Van Etten, R. A., Andreeff, M., ... &Kurzrock, R. (1995). Cell cycle-related shifts in subcellular localization of BCR: association with mitotic chromosomes and with heterochromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(8), 3488-3492.
36. McWHIRTER, J. R., Galasso, D. L., & Wang, J. Y. (1993). A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abloncoproteins. *Molecular and cellular biology*, 13(12), 7587-7595.

37. Sawyers, C. L., McLaughlin, J., & Witte, O. N. (1995). Genetic requirement for Ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the Bcr-Abl oncogene. *Journal of Experimental Medicine*, 181(1), 307-313.
38. Goldman, J. M., & Melo, J. V. (2003). Chronic myeloid leukemia—advances in biology and new approaches to treatment. *New England Journal of Medicine*, 349(15), 1451-1464.
39. Quintas-Cardama, A., & Cortes, J. (2009). Molecular biology of bcr-abl1–positive chronic myeloid leukemia. *Blood*, 113(8), 1619-1630.
40. Melo, J. V., & Deininger, M. W. (2004). Biology of chronic myelogenous leukemia—signaling pathways of initiation and transformation. *Hematology/Oncology Clinics*, 18(3), 545-568.
41. Leguay, T., & Mahon, F. X. (2005). Leucémie myéloïde chronique. *EMC-Hématologie*, 2(3), 187-205.
42. Le Morvan, V., & Robert, J. (2016). L'exploration in silico des collections de cellules et de tumeurs permet-elle l'innovation?. *Innovations & Thérapeutiques en Oncologie*, 2(1), 36-42.
43. Nadia, Ch., Baptiste, C., Julien, G., et Julie J (rédactrice). (Mai 2006). Etudiants du module BCP608 "signalisation cellulaire", Université Bordeaux-1.
44. Chouaib, N., Coutaud, B., Gibon, J., Janvore, J. (Mai 2006). Principes généraux de signalisation cellulaire et voies affectée pas bcr-abl. Transduction Education-Active Learning Projects-Gleevec Project. Université Bordeaux-1,
45. SALHANE, H. (2013). *Anomalies cytogénétiques dans les leucémies aiguës myéloïdes: données récentes* (Doctoral dissertation).
46. Baccarani, M., Pileri, S., Steegmann, J., Muller, M., Soverini, S., Dreyling, M., et al. (2012). Chronic myeloid leukemia : ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. ; 23(suppl 7) :vii72-vii7.
47. Cayuela, J., Huguet, F. (2012). Chronic myeloid leukemia (CML) diagnosis in 2012. *Oncologie* ; 14(10-11) :561-568.
48. Baccarani, M., Deininger, M. W., Rosti, G., Hochhaus, A., Soverini, S., Apperley, J. F., ...& Hjorth-Hansen, H. (2013). European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*, 122(6), 872-884.
49. Tefferi, A., & Vardiman, J. W. (2008). Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *leukemia*, 22(1), 14.
50. Image de Professeur Taoussi. CAC Blida.

51. Burmeister, T., & Reinhardt, R. (2008). A multiplex PCR for improved detection of typical and atypical BCR–ABL fusion transcripts. *Leukemia research*, 32(4), 579-585.
52. Weerkamp, F., Dekking, E., Ng, Y. Y., Van der Velden, V. H. J., Wai, H., Böttcher, S., ... & Van Poecke, N. (2009). Flow cytometric immunobead assay for the detection of BCR–ABL fusion proteins in leukemia patients. *Leukemia*, 23(6), 1106.
53. Burmeister, T., & Reinhardt, R. (2008). A multiplex PCR for improved detection of typical and atypical BCR–ABL fusion transcripts. *Leukemia research*, 32(4), 579-585.
54. Harieche, N. Toukal, N. Abdennebi, F. Boukhemia, W. Assouak, R. Belhimeur, F. Zerhouni, R. M. Hamladji, R. Ahmed-Nacer. Evaluation d'une méthode Automatisée de Quantification du Transcrit BCR-ABL dans la LMC : CepheidXpert Monitor Assay™. F. Laboratoire de biologie moléculaire ; Service d'hématologie CPMC Alger.
55. Michael, J., Mauro, M. Leader, Myeloproliferative Neoplasms Program, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, <http://www.cepheid.com/en/cepheid-solutions/clinical-ivd-tests/oncology-genetics/xpert-bcr-abl-ultra>.
56. O'Brien, S. G., Guilhot, F., Larson, R. A., Gathmann, I., Baccarani, M., Cervantes, F., ... & Lechner, K. (2003). Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, 348(11), 994-1004.
57. Hasford, J., Pfirrmann, M., Hehlmann, R., Allan, N. C., Baccarani, M., Kluin-Nelemans, J. C., ... & Ansari, H. (1998). A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 90(11), 850-859.
58. Hasford, J., Baccarani, M., Hoffmann, V., Guilhot, J., Saussele, S., Rosti, G., ... & Simonsson, B. (2011). Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score. *Blood*, 118(3), 686-692.
59. Baccarani, M., Deininger, M. W., Rosti, G., Hochhaus, A., Soverini, S., Apperley, J. F., ... & Hjorth-Hansen, H. (2013). European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*, 122(6), 872-884.
60. Yang, T. Y. (2014). *Use of peptide biosensors for monitoring activity of kinases in chronic myelogenous leukemia* (Doctoral dissertation, Purdue University).
61. Thèse de doctorat en science médicales. Le transcrit de fusion BCR-ABL1 : Intérêt de la quantification par la QRT-PCR dans le diagnostic et le suivi moléculaire de la

maladie résiduelle chez les patients atteints de la leucémie myéloïde chronique traitée par Imatinib Mesylate. Soutenue publiquement le 17 Décembre 2017 par Dr. Nachi Mourad.

62. Ali, M. A. (2016). Chronic myeloid leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitors: an evolving paradigm of molecularly targeted therapy. *Molecular diagnosis & therapy*, 20(4), 315-333.
63. Hehlmann, R., Berger, U., Pfirrmann, M., Hochhaus, A., Metzgeroth, G., Maywald, O., ... & Löffler, H. (2003). Randomized comparison of interferon α and hydroxyurea with hydroxyurea monotherapy in chronic myeloid leukemia (CML-study II): prolongation of survival by the combination of interferon α and hydroxyurea. *Leukemia*, 17(8), 1529.
64. Preudhomme, C., Guilhot, J., Nicolini, F. E., Guerci-Bresler, A., Rigal-Huguet, F., Maloisel, F., ... & Rea, D. (2010). Imatinib plus peginterferon alfa-2a in chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, 363(26), 2511-2521.
65. Simonsson, B., Gedde-Dahl, T., Markevörn, B., Remes, K., Stentoft, J., Almqvist, A., ... & Malm, C. (2011). Combination of pegylated IFN- α 2b with imatinib increases molecular response rates in patients with low-or intermediate-risk chronic myeloid leukemia. *Blood*, 118(12), 3228-3235.
66. Buchdunger, E., Zimmermann, J., Mett, H., Meyer, T., Müller, M., Druker, B. J., & Lydon, N. B. (1996). Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer research*, 56(1), 100-104.
67. Perrotti, D., Jamieson, C., Goldman, J., & Skorski, T. (2010). Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation. *The Journal of clinical investigation*, 120(7), 2254-2264.
68. Roche-Lestienne, C., Mahon, F. X., & Preudhomme, C. (2004). Origin of resistance to Imatinib mesylate: lessons learned from this experience. *Medicine sciences: M/S*, 20(12), 1125-1130.
69. Buchdunger, E., Cioffi, C. L., Law, N., Stover, D., Ohno-Jones, S., Druker, B. J., & Lydon, N. B. (2000). Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 295(1), 139-145.
70. Kantarjian, H., Sawyers, C., Hochhaus, A., Guilhot, F., Schiffer, C., Gambacorti-Passerini, C., ... & Talpaz, M. (2002). Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *New England Journal of Medicine*, 346(9), 645-652.

71. Weisberg, E., Manley, P. W., Breitenstein, W., Brügger, J., Cowan-Jacob, S. W., Ray, A., ...& Kung, A. L. (2005). Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer cell*, 7(2), 129-141.
72. Etienne, G. (2012). Treatment by second-generation tyrosine-kinase inhibitors in patients with imatinib failure. *Oncologie.* ; 14(10) :589.
73. BENNINI, S. (2016). *Les inhibiteurs de la tyrosine kinase dans la leucémie myéloïde chronique* (Doctoral dissertation).
74. Turhan, A. G. (2005). Leucémie myéloïde chronique: actualités biologiques et thérapeutiques. *Bulletin du cancer*, 92(1), 75-82.
75. Baccarani, M., Deininger, M. W., Rosti, G., Hochhaus, A., Soverini, S., Apperley, J. F., ...& Hjorth-Hansen, H. (2013). European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*, 122(6), 872-884.
76. Kueviakoe, M. I., Agbetiafa, K., Padaro, E., Layibo, Y., Kolou, M., Amavi, T., & Segbena, A. (2014). Profil évolutif des patients souffrant de leucémie myéloïde chronique sous imatinib au Togo: étude de 63 cas colligés en 10 ans au CHU-campus de Lomé. *Journal de la Recherche Scientifique de l'Université de Lomé*, 16(2), 473-482.
77. Mukiihi, J. M., Nyirenda, C. M., Paul, B., Aduwuyi, J. O., Mzula, E. I. B., & Malata, H. N. (2003). Chronic myeloid leukaemia in central Africans. *East African medical journal*, 80(9), 470-475.
78. Kouliadiati, J. (2014). La leucémie à tricholeucocytes : A propos d'un cas documenté au BURKINA FASO. *Revue Africaine et Malgache de Recherche Scientifique/Sciences de la Santé*, 2(1).
79. Agharbi, F. (2008). La leucémie myéloïde chronique avancées diagnostiques et thérapeutiques. *Faculté de médecine de Fès*. 86-80.
80. ToloDiebkilé, A., Koffi, K. G., & Sawadogo, G. D. (2010). Impact thérapeutique de l'interféron alpha dans la prise en charge des patients de leucémie myéloïde chronique. *Mali Med*, 25(1), 22-27.
81. Segbena, A. Y., Kueviakoe, I. M. D., Agbetiafa, K., Padaro, E., Layibo, Y., Dorkenoo, A., ...& Bories, D. (2012). Leucémie myéloïde chronique et imatinib, expérience du CHU Campus de Lomé au Togo. *Médecine et Santé Tropicales*, 22(3), 307-311.
82. Cervantes F, Lopez-Garrido P, Montero MI, et al. Early intervention during imatinib therapy on patients with newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: a study of the Spanish PETHEMA group. *Haematologica*. 2010;95(8):1317–1324. doi: 10.3324/haematol.2009.021154.

- 83.** Gugliotta G, Castagnetti F, Palandri F, et al. Frontline imatinib treatment of chronic myeloid leukemia: no impact of age on outcome, a survey by the GIMEMA CML Working Party. *Blood*. 2011;117(21):5591–5599. doi: 10.1182/blood-2010-12-324228.
- 84.** Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2006;355(23):2408–2417.

ANNEXES

Annexe 1 : Réactif et matériel de culture cellulaire, FISH et Caryotype

1/ Réactifs pour culture, sortie de culture, caryotype et FISH

| Réactif | stockage | fournisseur |
|--|----------|-------------|
| <p>RPMI 1640 sans glutamine</p>  | +4C° | Eurobio |
| <p>Sérum de veau fœtal</p> | -20c° | |
| <p>Héparine lithium</p>  | TA | |
| <p>Synchro test solution A</p> | -20C° | |
| <p>Synchro test solution B</p> | -20C° | |
| <p>Colcémid</p>  | +4C° | |

KCL poudre

TA

Méthanol absolu

TA



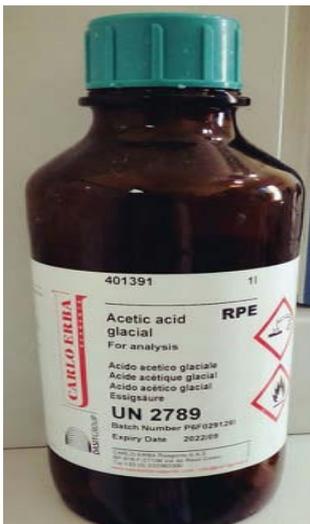
Ethanol

TA



Acide acétique glacial

TA



Acide citrique

TA

NaH₂PO₄ poudre

TA

**Giemsa**

TA

**SSC 10X**

TA

CytoCell

Tween 20

TA



IGEPAL

TA



DAPI sonde BCR-ABL

+4C°



Préparation des réactifs

1. Milieu de culture: RPMI complet

A préparer stérilement et à conserver à +4C (de préférence à congeler par 100ml et mettre le flacon en cours d'utilisation à +4C)

- RPMI sans glutamine : 400ml
- Sérum de veau foetal : 100ml
- Héparine lithium : 1ml
- Peni- strepto-L glutamine : 5ml

2. KCL:

Peser 5,6 g de KCL , faire dissoudre dans un litre d'eau distillée , conserver à +4C. Mettre 200ml dans une étuve à 37C au moins 30 minutes avant de procéder au choc hypotonique.

3. Préparation de la solution de fixation :

3 volumes Méthanol + 1 volume acide acétique

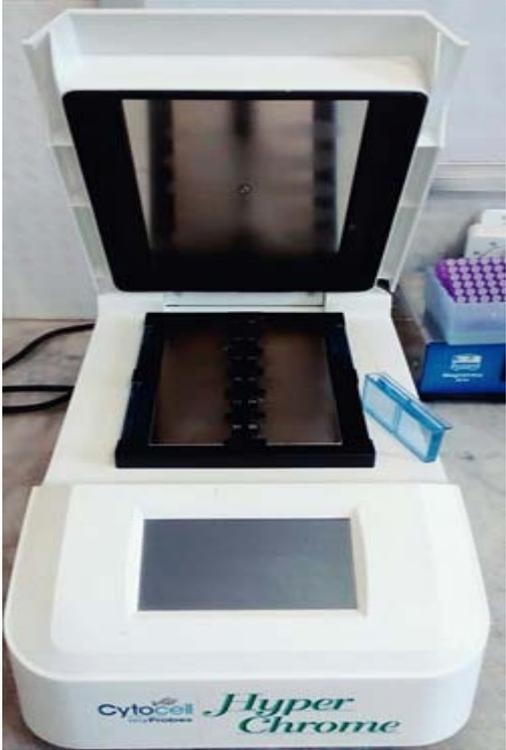
4. Préparation de NaH_2PO_4 :

Peser 120 g du sodium phosphate et faire dissoudre dans un litre d'eau distillée.

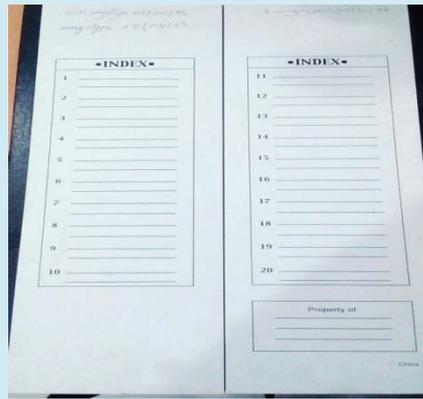
5. Préparation de Giemsa:

- Verser dans un flacon de 100ml, 4ml de Giemsa.
- Ajuster à 100ml avec de l'eau distillée.
- Ce mélange est versé dans un bac en porcelaine et les lames.

2/ Matériels:

| Titre | image |
|-------------|---|
| Etuve |  |
| thermobrite |  |

Boîte à lames



Lames porte-objet



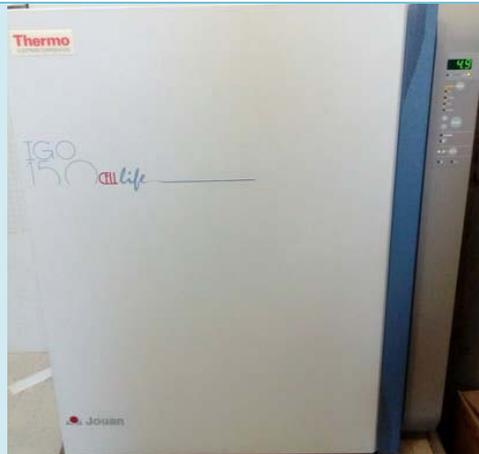
Hotte à flux laminaire



Hotte chimique



Etuve à CO₂



Lecture de FISH par microscope à épifluorescence



Annexe 2 : Gene Xpert

1/ Composition de Kit :

| | | |
|----------------------------|---|--|
| Cartouche GeneXpert |  A white GeneXpert cartridge with a blue base. The label includes 'GeneXpert', 'LOT 07901', '2019 12 29', 'Xpert BCR-ABL Ultra', a QR code, and the numbers '060486079011953' and '0164653114'. | |
| Protéinase K |  A clear plastic vial with a white cap. The label features 'PK', 'Xpert BCR-ABL Proteinase', 'LOT 18E', and '2020 0'. | |
| Solution de Lyse |  A clear plastic vial with a white cap. The label includes 'LY', 'Xpert BCR-ABL Lysis Rgt., 5.3 ml', 'LOT 18H2256', and '2020 05 04'. | |
| Tampon |  A clear plastic vial with a white cap. The label shows 'Xpert BCR-ABL Wash Rgt., 2.9 ml', 'LOT WK601', and '2020 01 01'. | |

2/ Matériel :

**Micropipette 100
microlitre**



**Micropipette 500
microlitre**



Vortex



Tube EDTA



**Appareil Gene Expert
avec l'ordinateur**



3/ Protocole de manipulation:**Protocole de manipulation :****Etape 1 :**

Ajouter 100 microlitres de protéinase K dans le flacon de 50 ml.

**Etape 2 :**

Inverser le tube de sang à EDTA dix fois.

**Etape 3 :**

Ajouter 4 ml de sang total au flacon

**Etape 4 :**

* Vortexer pendant 10 sec.

*Incuber une minute à RT.



Etape 5 :

- *Ajouter 2,5 ml de réactif de lyse.
- *Vortexer 10 sec : incuber 5 min.
- *Second vortex 10 sec : incuber 5 min.

**Etape 6 :**

Transférer 1ml du lysat dans un nouveau flacon de 50 ml.

**Etape 7 :**

- *Ajouter 1,5 ml de tampon de lyse.
- *Vortexer 10 secondes.
- *Incuber 10 min à RT.



Etape 8 :

- *Ajouter 2 ml d'éthanol.
- *Vortexer pendant 19 sec.

**Etape 9 :**

- Ajouter le tampon de lavage dans l'ouverture 1.

**Etape 10 :**

- Ajouter la totalité du lysat dans l'ouverture S.

**Etape 11 :**

- Scanner le code barre de la cartouche.



Etape 12 :

Placer la cartouche dans l'appareil et fermer la porte.

**4/ Résultats obtenus:**

Module Name A1

Sample ID
El arbi OMK

Assay Xpert BCR-ABL Ultra

Version 1

Reagent Lot ID* 06801

Test Type Specimen

Sample Type Whole blood

Other Sample Type

Notes
LMC 3 mois sous Nilotinib , 1er controle PCR Ultra

Start Time 16/12/18 11:26:05

End Time 16/12/18 13:11:14

Status Done

User ABAD

Views
Result View
Primary Curve

Test Result Analyte Result Detail Errors History Support

Assay Name Xpert BCR-ABL Ultra Version 1

Test Result **BCR-ABL was not detected at a detection limit of 0.000063% (IS)**

For In Vitro Diagnostic Use Only.

Views
Result View
Primary Curve

Fluorescence

Cycles

Legend
 BCR-ABL; Primary
 ABL; Primary

Save Changes Export Report Select Graphs View Test

Module Name A2

Sample ID
Sebaa Hassiba ne 1964

Assay Xpert BCR-ABL Ultra

Version 1

Reagent Lot ID* 07801

Test Type Specimen

Sample Type Whole blood

Other Sample Type

Notes
LMC sous imtinib 12 mois controle pcr ultra

Start Time 03/02/19 10:11:31
End Time 03/02/19 11:57:29
Status Done
User ABAD

Views

Result View

Primary Curve

Test Result Analyte Result Detail Errors History Support

Assay Name Xpert BCR-ABL Ultra Version 1

Test Result **BCR-ABL has been detected at a level of 1.3% (IS)**

For In Vitro Diagnostic Use Only.

Views

Result View

Primary Curve

| Cycles | Light Blue Curve (Fluorescence) | Dark Blue Curve (Fluorescence) |
|--------|---------------------------------|--------------------------------|
| 10 | ~50 | ~0 |
| 15 | ~150 | ~0 |
| 20 | ~350 | ~50 |
| 25 | ~400 | ~400 |
| 30 | ~400 | ~650 |
| 35 | ~400 | ~720 |