

**LA REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE 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

Filière : Sciences biologiques

Option : Génétique et Physiologie

Thème :

**Intérêt de la recherche des transcrits BCR-ABL par
biologie moléculaire dans la leucémie myéloïde
chronique**

Réalisé par

Mlle ZINE Soumia

&

Mlle GUENTOUR Fatma Zohra

Soutenu publiquement devant le jury composé de :

Mme. BENCHABANE.S	MAA	USDB1	Présidente
Mme. KEBBAS.S	MAA	USDB1	Examinatrice
Mr. MEDDOUR.Y	MCA	HCA	Promoteur
Mr. BESSAAD.M-A	MCB	USDB1	Co-promoteur

Promotion : 2016/2017

Remerciements

Nous tenons à remercier à travers ces quelques lignes les nombreuses personnes qui ont contribué au succès de notre stage et qui, par la confiance, la patience et l'amitié qu'ils ont manifestées à notre égard.

Nous profitons de cette occasion pour adresser nos sincères remerciements à Madame Chaïb Samia chef service d'immunologie HCA, qui nous a permis de collecter le matériel biologique nécessaire pour réaliser cette étude.

Nous tenons à exprimer notre reconnaissance, notre haute considération et notre profond respect à notre encadreur professeur MEDDOUR Yanis qui nous a guidé et encouragé au cours de ce travail, également pour ces précieux conseils.

Nous tenons à remercier également Mr BESSAAD Mohamed El Amine, ses conseils et ses encouragements ont permis à ce travail d'aboutir.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions.

Enfin nos remerciements à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

Je présent de tout mon cœur ce travail à tout ceux qui m'ont donné un coup de main de près ou de loin.

A mon cher père ZINE Ahmed

Aucune expression, aussi élaborée qu'elle soit, ne pourrait traduire ma profonde gratitude et ma reconnaissance pour toutes ces années de sacrifices et de dévouement pour mon instruction et mon bien être.

A ma chère mère NAAB Nacira

*Je ne trouverai de mots assez forts pour vous exprimer mon affection et mon estime pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis ma naissance.
conseils que tu n'as jamais cessé de nous prodiguer.*

A Mes adorables sœurs, Nabila, Faiza, Lamia, Radia, Fatima Zahra et Nadjet.

A Mon unique frère Mohamed.

A Mon mari, Hassen.

A Mes chères nièces et mes chers neveux.

A toutes mes amies et collègues.

A tous ceux et celles qui m'ont encouragés, entourés de leur soutien durant les moments difficiles avec tant d'amour et de compréhension.

Soumia

Dédicace

A mes chers parents.

*Ma mère pour m'avoir mis au monde et pour
m'avoir accompagné tout le long de ma vie. Mon père qui
sans lui je ne serais pas arrivée jusqu'ici. J'espère toujours
rester fidèle aux valeurs morales que vous m'avez
appries.*

Ma très chère sœur et mes frères .

A toute ma famille.

*A toutes les personnes que je porte dans le cœur, mes
très chers ami(e)s : Nawel , Hiba , Ahlem , Djamel ,
Riyad et Ismail .*

*Je vous dédie ce travail car je ne peux que vous offrir
ce que j'ai appris de mieux dans ma vie.*

Fatima Zahra.

Résumé :

La leucémie myéloïde chronique (LMC) représente un modèle privilégié pour l'étude des remaniements moléculaires liés à une anomalie cytogénétique elle-même associée à une maladie.

L'objectif de ce travail est de connaître les particularités de la leucémie myéloïde chronique, le diagnostic de la maladie ainsi le suivi des patients, en utilisant des techniques de la biologie moléculaire pour déterminer le choix du traitement ou pour prédire la rechute.

Nous avons effectué une étude prospective portant sur 40 sujets adressés au service d'immunologie pour suspicion de LMC. Au moment de diagnostic nous avons utilisé la technique de PCR en temps réel pour détecter et quantifier la présence de la translocation BCR-ABL P210.

28 patients (70%) sont positifs avec un âge moyen de 41,54 ans, et une sex-ratio H/F de 1,8.

Cliniquement, la splénomégalie est notée dans 75% des cas. Biologiquement, l'hémogramme était anormale avec hyperleucocytose chez tous les patients, l'anémie a été retrouvée chez 75 % de nos malades, une thrombopénie dans 17.86 % des cas et une hyperplaquettose dans 42.86 % des cas. L'examen de frottis sanguin permet de déterminer une myélémie chez 85,71% (supérieur à 20 %), la majorité de nos patients (92.86 %) avaient un taux de blaste inférieure à 10 %.

Le suivi moléculaire a permis de répartir les patients en 03 groupes : bonne réponse, rechute et échec thérapeutique, selon le taux de ratio BCR-ABL.

En conclusion, la recherche et la quantification du transcrite BCR-ABL par RT-PCR permet un diagnostic rapide et fiable du transcrite BCR-ABL et un suivi efficace des malades.

Mots clé : LMC, RT-PCR, ratio BCR-ABL, suivi moléculaire, anomalie cytogénétique.

Abstract:

Chronic myeloid leukaemia (CML) is an excellent model for the study of molecular rearrangements caused by a cytogenetic anomaly associated with a disease.

The objective of this work is to know the chronic myeloid leukemia, the diagnosis of the disease, thus the monitoring of patients, by using the techniques of the molecular biology to determine the effectiveness of treatment or to predict the relapse.

We conducted a retrospective study of 40 patients referred to the Immunology service for suspicion of CML. On diagnosis, we used the technique of Real-Time PCR to detect and quantify the presence of translocation BCR-ABL P210.

28 patients (70%) were positive with an average age of 41.54 years, and sex ratio 1.18 in favor of men.

Clinically, splenomegaly is noted in 75% of cases. Biologically, the Complete blood count exam was abnormal with hyperleukocytosis in all patients, anemia was found in 75% of our patients, thrombocytopenia in 17.86% of cases and a hyperplaquettose in 42.86% of cases.

The blood smear examination allows to determine myeloma in 85.71% (greater than 20%), the majority of our patients (92.86%) have a blast rate of less than 10%.

The molecular monitoring has allowed to divide the patients according to the rate of ratio BCR-ABL in three groups: Good response to treatment, relapse and therapeutic failure.

In conclusion, the research and quantification of the transcript BCR-ABL by RT-PCR allows rapid and reliable diagnosis of transcript BCR-ABL and effective monitoring of patients.

Key words: CML, RT-PCR, BCR-ABL ratio, molecular monitoring, cytogenetic anomaly.

ملخص :

ابيضاض الدم النقوي المزمن هو النموذج المفضل لدراسة التغيرات الجزيئية المرتبطة بشذوذ وراثي خلوي نفسه مرتبط بالمرض.

الهدف من هذه الدراسة هو معرفة ابيضاض الدم النقوي المزمن، تشخيص المرض ورصد المرضى وذلك باستخدام تقنيات البيولوجية الجزيئية لتحديد فعالية العلاج أو تنبؤ الانتكاس.

أجرينا دراسة رجعية و استطلاعية عن 40 مريض موجهة إلى قسم علم المناعة لاشتباه في ابيضاض الدم النقوي المزمن. في وقت التشخيص استخدمنا تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل اللحظي لكشف وقياس إزفاء BCR-ABL P210.

نتائج التحاليل بينت ان 28 مريض كانوا ايجابيين للمرض حيث يبلغ متوسط عمر 41.54 عاما وبنسبة بين الجنسين مقدارها 1.8.

سريريا، لوحظ تضخم الطحال في 75% من مرضى. بيولوجيا، العد الدموي الشامل كان غير طبيعي، اظهر وجود تكاثر غير عادي للكريات الدموية البيضاء عند جميع المرضى، فقر الدم في 75% من المرضى، نقص الصفيحات في 17.86% من الحالات، وكثرة الصفيحات في 42.86% من الحالات.

فحص شريحة الدم بتحديد نسبة سلانف الخلايا المحببة في الدم (أكثر من 20%) عند 85.71% من مرضى، اما نسبة الخلايا الأرومية كانت اصغر من 10% عند غالبية المرضى (92.86% من الحالات).

المتابعة الجزيئية سمحت بتقسيم المرضى اعتمادا على نسبة BCR-ABL الى 3 مجموعات: استجابة جيدة للعلاج انتكاس و فشل العلاج.

وفي الختام، كشف وقياس مستنسخ BCR-ABL P210 بواسطة تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل اللحظي سمح بتشخيص سريع و موثوق به ومراقبة فعالة للمرض.

الكلمات الدالة : أبيضاض الدم النقوي المزمن، نسبة BCR-ABL، تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل اللحظي، المتابعة الجزيئية، الشذوذ الوراثي الخلوي.

Sommaire :

Introduction	1
I. Généralité	2
1) Définitions	2
2) Epidémiologie	4
3) Physiopathologie	4
a) Facteurs de risques.....	4
b) Anomalies moléculaires	5
C) Gènes impliqués dans la translocation	5
4) Fusion BCR-ABL et conséquences des anomalies sur les cellules leucémiques.....	9
5) Diagnostic	16
a) Examen Clinique	16
b) Examen biologique	17
c) Examen de la cytogénétique	17
d) Examen de la biologie moléculaire	18
e) Critères internationaux de diagnostic et de suivi	19
II. Matériels et méthodes	21
III. Résultats	37
IV. Discussion	53
V. Conclusion	62
VI. Bibliographie	63
VII. Annexes	

Liste des abréviations

ABL : Abelson

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ARNm : acide ribonucléique messenger

BCR : breakpoint cluster region

Cbl: Casitas-B-lineage lymphoma

CDK: Cyclin-dependent kinase

CDKI: Cyclin-Dependant Kinase Inhibitor

CI: control interne

CP: control positive

Crkl: sarcoma virus CT10 oncogene homolog-like

CSH : cellule souche hématopoïétique

EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique.

ELN : European Leukemia Net

FISH: fluorescence in situ hybridation.

Gab2: GRB2 Associated Binding Protein 2

GAP: GTPase activating protein

GDP: guanosine diphosphate

Grb2: Growth factor receptor-bound protein 2

GTP: guanosine triphosphate

JAK: janus kinases

Kda: kilo dalton

LAL : leucémie aiguë lymphoblastique

LAM : leucémie aiguë myéloïde

LMC : leucémie myéloïde chronique

MAP-kinase: mitogene activator protein kinase

M-BCR: major breakpoint cluster region

m-BCR: minor BCR

MEK: MAPK Erk Kinase

Myc: Myelocytomatosis viral oncogene homolog

NFKB: Nuclear Factor kappa-B

NFS : numération-formule sanguine

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR: polymerase chain reaction

PDGF: platelet-derived growth factor

Ph⁻ : philadelphie négatif.

Ph⁺: philadelphie positif.

PI3K: phosphatidyl inositol-3 kinase

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

SMP : Syndromes MyéloProlifératifs

STAT: signal transducer and activator of transcription

TK: tyrosine kinase

μ-BCR: micro-BCR

Liste des figures

Figure 1 : Translocation réciproque équilibrée entre les bras longs des chromosomes 9 et 22	3
Figure 2 : Gène ABL. L'emplacement des deux points de cassure (break points) possibles : au niveau de l'intron séparant les exons 1A et 1B ou entre les exons 1A et a2	6
Figure 3 : Structure de la protéine Abl	7
Figure 4 : Gène BCR et les différents points de cassure	8
Figure 5 : Structure de la protéine BCR	8
Figure 6 : Variantes protéiques BCR-ABL en fonction des points de cassure	10
Figure 7 : Représentation de la forme active et inactive d'ABL	10
Figure 8 : Structure de la protéine de fusion p210 BCR-Abl	12
Figure 9 : comparaison entre la voie de signalisation de Ras normal et induite par BCR-Abl Schéma original adapté des articles	13
Figure 10: Comparaison entre la voie PI3K normal et induite par BCR-Abl. Schéma original adapté des articles	14
Figure 11: comparaison entre la voie JAK/STAT normal et induite par BCR-Abl. Schéma original adapté des articles	14
Figure 12 : Photo d'une FISH sur une cellule en interphase	18
Figure 13 : les réponses moléculaires (RM).....	19
Figure 14 : Schéma résumé de l'extraction d'ARN.....	23
Figure 15 : Schéma résumé de la transcription inverse.....	25
Figure 16 : Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles	27
Figure 17 : Principe de la sonde TaqMan®	28
Figure 18 : Schéma résumé de la PCR en temps réel qualitative.	30

Figure 19: Schéma d'une plaque 96-puits partielle chargée en duplicata.....	32
Figure 20: Schéma résumé de la PCR en temps réel quantitative.....	33
Figure 21 : Le suivi en temps réel d'une réaction PCR (patient BCR-ABL ⁻).....	34
Figure 22 : Le suivi en temps réel d'une réaction PCR (patient BCR-ABL ⁺).....	35
Figure 23 : les courbes d'amplifications.....	36
Figure 24 : Répartition des patients selon le sexe.....	38
Figure25: Histogramme montrant la répartition des patients en fonction de l'âge.....	38
Figure 26 : Distribution des patients selon les signes cliniques.....	39
Figure 27: Répartition des patients en fonction de taux de globule blanc	40
Figure 28 : Distribution des patients en fonction de taux d'hémoglobine.....	40
Figure 29 : Distribution des patients en fonction de taux de plaquette.....	41
Figure 30 : Histogramme montrant la distribution des patients en fonction de taux de blaste	41
Figure 31 : La distribution des patients en fonction de taux de myélémie.....	42
Figure 32 : Pourcentage des cas positifs et négatifs pour LMC.....	42
Figure 33 : Répartition des patients atteints de LMC selon le sexe.....	43
Figure 34 : Répartition des patients atteints de LMC selon les tranches d'age.....	43
Figure 35 : Répartition des patients atteints de LMC selon les tranches d'age et le sexe...	44
Figure 36 : Histogramme présentant la fréquence des signes cliniques de la LMC.....	45
Figure 37 : Histogramme montrant le taux de globules blancs chez les sujets atteints de LMC	45
Figure 38: Histogramme représentant le taux d'hémoglobine chez les sujets atteints de LMC.....	46

Figure 39: Histogramme montrant le taux des plaquettes chez les sujets atteints de LMC.	46
Figure 40: Histogramme représentant le taux des blastes chez les sujets atteints de LMC.	47
Figure 41: Histogramme montrant le taux de myélémie chez les sujets atteints de LMC.	47
Figure 42 : Diagramme de suivie moléculaire du patient n°1.	48
Figure 43 : Diagramme de suivie moléculaire du patient n°2.	49
Figure 44 : Diagramme de suivie moléculaire du patient n°3.	50
Figure 45 : Diagramme de suivie moléculaire du patient n°4.	50
Figure 46 : Diagramme de suivie moléculaire du patient n°5.	51
Figure 47 : Diagramme de suivie moléculaire du patient n°6.	52
Figure 48 : voie principale de la production des globules rouges et les mégacaryocytes et leur cascade de signalisation dans le cas de LMC et le cas normal.	59

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les symptômes cliniques de la LMC.	16
Tableau 2 : Critères de réponses au traitement selon l'ELN 2013	20
Tableau 3 : Caractéristiques de la population étudiée.....	22
Tableau 4 : Mélange réactionnel de la transcription inverse	26
Tableau 5 : Cycle de la transcription inverse	26
Tableau 6 : Amorces sens et antisens utilisées pour l'amplification de gène de contrôle ABL par PCR en temps réel.....	29
Tableau 7 : Amorces sens et antisens utilisées pour l'amplification par PCR de transcrit de BCR-ABL P210.....	29
Tableau 8 : Séquences des sondes	29
Tableau 9 : Mélange réactionnel de la PCR en temps réel qualitative.....	30
Tableau 10 : Mélange réactionnel de la PCR en temps réel quantitative.....	32
Tableau 11 : principaux signes cliniques retrouvés chez patients atteints deLMC.....	44
Tableau 12 : La comparaison de sexe-ratio des différentes séries rapportées.....	55
Tableau 13 : La comparaison d'âge des différentes séries rapportées.....	55

Introduction :

Les leucémies sont des maladies cancéreuses graves, surtout si elles ne sont pas traitées à temps, désignées aujourd'hui dans le langage courant de « cancer du sang ».

Le terme de leucémie signifie littéralement "sang blanc" et provient du fait que le nombre de globules blancs (leucocytes) augmente, si bien qu'ils submergent les globules rouges.

La leucémie myéloïde chronique(LMC) est une variété de syndrome myéloprolifératif, est caractérisée par une production excessive et persistante au sein de la moelle osseuse des globules blancs aboutissant à une hyperplasie granuleuse, c'est une maladie grave, mortelle dans les cas sévères ce qui conduit à poser les questions suivantes :

Quelle sont les particularités de ce type de maladie ? Le diagnostic de certitude ? Comment survit-elle?

Au cours des 20 dernières années, plusieurs études portant sur la LMC ont identifié plusieurs gènes impliqués dans la cancérogénèse. Toute fois la translocation philadelphie t (9;22) demeure de loin le marqueur le plus spécifique de cette pathologie. La recherche de cette anomalie se fait par plusieurs techniques, cytogénétique, biologie moléculaire... etc, dont les avantages et les inconvénients sont les facteurs limitants.

L'objectif de ce travail est le diagnostic de la leucémie myéloïde chronique et le suivi des patients, en utilisant des techniques de la biologie moléculaire pour déterminer l'efficacité du traitement ou pour prédire la rechute.

Nous avons utilisé pour cela deux techniques de PCR en temps réel, une PCR en temps réel qualitative pour détecter l'anomalie au moment de diagnostic et une PCR en temps réel quantitative pour suivre les patients sous traitement. Cette étude a été réalisée sur un échantillon de (40) patients algériens adressés au service d'immunologie pour suspicion de LMC.

I. Généralité :

1. Définitions :

1-a. Les syndromes myéloprolifératifs :

Les syndromes myéloprolifératifs (SMP) sont des maladies chroniques caractérisées par une prolifération clonale des cellules myéloïdes (précurseurs des lignées granulocytaires, érythroïdes et mégacaryocytaires) avec une conservation de leur capacité de différenciation [1]. Ce sont des maladies acquises [2], caractérisées par :

*La production excessive de cellules sanguines myéloïdes matures, fonctionnelles [3], et indépendantes des cytokines [4].

*L'évolution chronique [5].

*Le risque accru de développer une leucémie myéloïde aiguë [6,7].

Le terme syndrome myéloprolifératif a été introduit pour la première fois en 1951 par William Dameshek. [8].

Il décrit quatre maladies différentes avec ressemblances cliniques et biologiques et connue ainsi comme SMP classique :

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est caractérisée par la prolifération prédominante de la lignée granulocytaire et par la présence d'un marqueur chromosomique : chromosome de Philadelphie [9].

La Polyglobulie Vraie (PV) (maladie de Vaquez ou polyglobulie primitive) est une affection clonale caractérisée par la prolifération de la lignée érythroïde qui aboutit à une production excessive de globules rouges et à un moindre degré des lignées granuleuses et mégacaryocytaires [10, 11]. Elle survient surtout après 50 ans, avec une prédominance masculine [12].

La Thrombocytémie Essentielle (TE) est caractérisée par le nombre élevé de mégacaryocytes dans la moelle osseuse et par un nombre élevé de plaquettes sanguines (thrombocytose ou hyperplaquetose), dont la conséquence est l'apparition des complications thrombotiques et/ou hémorragiques [13].

La Myélofibrose Primitive (MFP) touche la lignée granuleuse et la lignée mégacaryocytaire, elle est caractérisée par le développement d'une fibrose avec en parallèle une hématopoïèse extra-médullaire [14].

Les trois syndromes (TE, PV et MFP) ont la particularité de la présence de la mutation acquise dénommée Jak2 (V617F) [15].

1-b. La leucémie myéloïde chronique :

La LMC est une hémopathie maligne d'une cellule souche pluripotente hématopoïétiques [16], caractérisée par la prolifération prédominante de la lignée granulocytaire dans le sang ,et l'hyperplasie myéloïde dans la moelle osseuse [17].

Elle a été la première maladie associée à une anomalie cytogénétique acquise spécifique : le chromosome Philadelphie (Ph₁), cette anomalie est une translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22 (**Figure 1**).

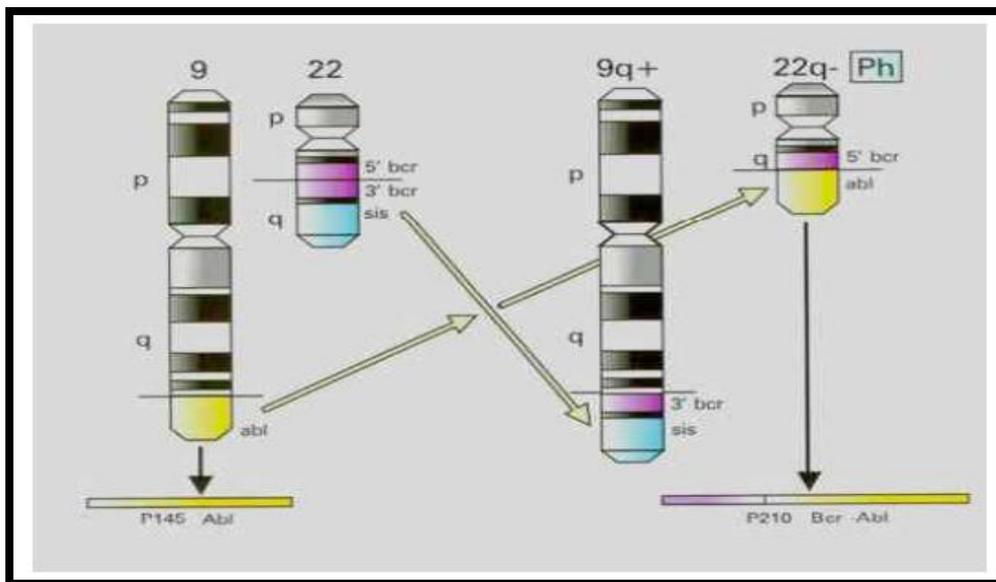


Figure 1 : Translocation réciproque entre les bras longs des chromosomes 9 et 22 [18].

La conséquence de cette translocation est la formation d'un gène hybride dit BCR-ABL. Ce gène code pour une protéine chimérique (fusion) à activité tyrosine kinase constitutivement dérégulée et est directement responsable de la transformation leucémique [19].

La LMC évolue, en l'absence de traitement en trois phases :

- ✓ **Une phase chronique** : Cette première phase est d'installation progressive, elle dure en moyenne 4 à 5 ans, avec une blastose sanguines ou médullaire inférieur à 10%.
- ✓ **Une phase accélérée** : Elle correspond à la transition entre la phase chronique et la phase blastique. Sa durée est de 12 à 18 mois en moyenne, caractérisée par la présence de plus de 10 % de blases sanguines ou médullaires.
- ✓ **Une phase blastique** : c'est une phase de transformation en leucémie aiguë. Elle survient avec un délai médian de 4 ans et se définit par la présence de plus de 20 % de blastes médullaires ou plus de 30 % de blastes et promyélocytes sanguins ou médullaires [20].

2. Epidémiologie :

L'incidence de la leucémie dans le monde varie en fonction des pays, la plus basse incidence est de 0,7 retrouvée en Suède et en Chine, et la plus haute est de 1,7 en Suisse et aux Etats Unis [21].

Elle en augmente avec l'âge, avec un âge médian au moment du diagnostic de 53 ans [20]. L'âge médian au diagnostic se situe entre 30 et 50 ans.

Cette affection touche préférentiellement les hommes, avec une sex-ratio proche de 2 [22].

En Algérie, une étude épidémiologique a été réalisée sur une période de 16ans (1994-2009) à propos de 1927 cas.

De 1994 à 2009 la prévalence relative de la LMC est passé de 1,8 cas /100000 habitants en 1994 à 2,3 cas /100000 habitants en 2009.

L'incidence globale, si on considère la période 1994 -2009 est de 0 ,34/100 000 habitants et le nombre moyen des nouveaux cas par année est de 109.

Une légère prédominance masculine est retrouvée avec un sex-ratio de 1,01 et un âge moyen de 43,5 ans [23].

3. physiopathologie :

a) Facteurs de risques :

Comme pour la plupart des hémopathies malignes, il n'existe pas d'étiologie bien définie. Cependant La LMC peut être le résultat de multiples facteurs, les personnes exposées au benzène d'une manière chronique et les patients traités par des agents chimio-thérapeutiques

ou des immunosuppresseurs, semblent présenter un risque modérément plus important de développer une LMC [24].

L'exposition à des radiations ionisantes pourrait aussi jouer un rôle favorisant. Cette hypothèse, suggérée par l'augmentation de l'incidence de la LMC chez les survivants de la bombe atomique d'Hiroshima, et est confortée in vitro par l'augmentation de la fréquence de détection du réarrangement BCR-ABL après irradiation de lignées cellulaires initialement BCR-ABL négatives [25].

b) Anomalies moléculaires : Le chromosome Philadelphie :

C'est un chromosome 22 raccourci, résultant d'une translocation réciproque, la t(9 ;22) (q34 ; q11). Cette translocation transpose un segment 3' du proto-oncogène c-ABL présent sur le chromosome 9q34 en amont d'un segment 5' du gène BCR situé sur le chromosome 22q11, créant ainsi un gène hybride BCR-ABL [26].

Le chromosome Philadelphie est présent dans environ 95% des cas de LMC [28] 27, mais aussi dans 5 % des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) de l'enfant et 15 à 30 % des LAL de l'adulte, et plus rarement (< 1 %) dans les leucémies aiguës myéloblastiques de novo [26].

Le gène chimérique BCR-ABL situé sur le chromosome Ph est transcrit en un ARNm qui sera traduit par la suite en protéine oncogénique BCR-ABL doté d'une forte activité enzymatique de type tyrosine kinase conduira à la transformation leucémique [28].

C) Gènes impliqués dans la translocation :

1. Gène ABL et sa protéine :

Le gène c-ABL est l'homologue de l'oncogène v-Abl porté par le virus leucémogène murin Abelson, responsable de la leucémie chez la souris. Il code pour une protéine tyrosine kinase de 145kDa [29].

Le c-ABL est localisé sur le bras long du chromosome 9 en position 9q34 [20] . Il s'étend sur 250-300 kb et comporte 11 exons dont 2 exons alternatifs, 1A et 1B [30] . **(Figure 2)**

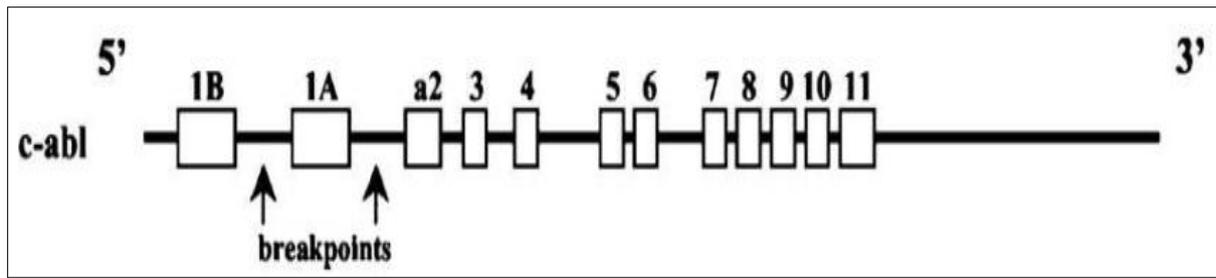


Figure 2 : Gène ABL. L'emplacement des deux points de cassure (break points) possibles : au niveau de l'intron séparant les exons 1A et 1B ou entre les exons 1A et a2 [31].

Le gène ABL est transcrit en ARNm de 6 ou 7 kb, qui donne naissance à deux isoformes protéiques [31].

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

La protéine ABL est caractérisée par une extrémité N-terminale unique N- cap [32], elle participe à la machinerie cellulaire de transmission du signal, avec une séquence signal pour la myristoylation (le cas de l'isoforme 1B), qui a un double rôle dans l'auto-inhibition de l'activité kinase et dans la localisation au niveau de la membrane [33]. Suivie par les domaines :

***SH3** (Src homology) interagit avec des séquences riches en proline [34].

***SH2** interagit avec les protéines comportant des résidus tyrosines phosphorylés [1].

***SH1** il comporte le site de fixation de l'ATP, le site catalytique et la boucle d'activation. Il est le support de l'activité tyrosine kinase [20].

La protéine, ABL possède une partie C-terminale [33] codés par le dernier exon [34] , Cette extrémité comprend :

➤ Trois séquences de localisation nucléaire (NLS pour nuclear localization signal) [36], une séquence d'export nucléaire NES (nuclear export signal), ces séquences permettent la navette continue entre le cytoplasme et le noyau en réponse aux signaux de l'environnement [29].

➤ Un domaine de liaison avec l'actine (AB) et un domaine de liaison avec l'ADN (DB).

➤ Trois motifs conservés Pro-XX-Pro qui peuvent servir de sites de liaison pour les Protéines contenant le domaine SH3 [37] telles que les protéines adaptatrices Crk, Grb2 [29] (**Figure 3**).

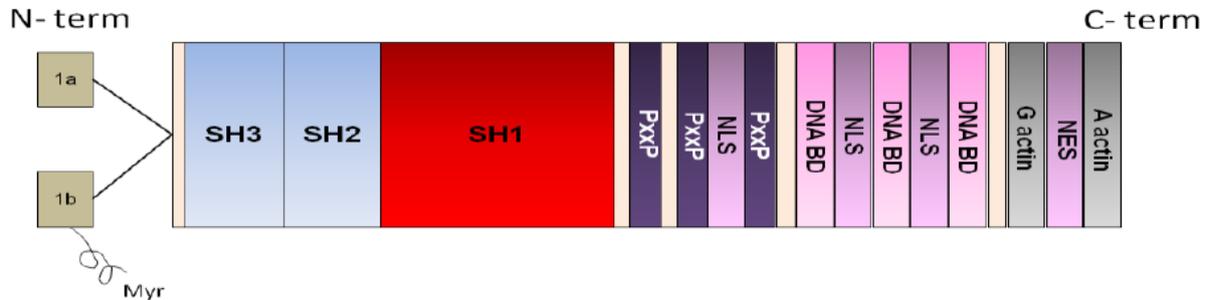


Figure 3 : Structure de la protéine Abl [20].

➤ **Fonction de la protéine Abl :**

L'ABL kinase à localisation nucléaire peut être impliquée dans des fonctions essentielles comme la régulation de la transcription des gènes au cours du cycle cellulaire. Lors de la phase S, l'Abl peut activer les facteurs de transcription tels que CREB (cAMP Responsive Element Binding Protein) [36].

En réponse aux dommages d'ADN, l'ABL est capable de transloquer vers le noyau où Interagit avec plusieurs protéines, comme ATM, Art et DNA-PK, impliquées dans des aspects distincts de la réparation d'ADN [38 ,39].

ABL à localisation cytoplasmique serait plutôt impliquée dans la transduction du signal pour la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaire, initiée par certains récepteurs aux facteurs de croissance [20] comme : PDGF et EGF [32].

2. Gène BCR et sa protéine :

Le gène est situé sur le bras long du chromosome 22. Il s'étend sur 135 kb, comprend 23 exons et 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 [20].

L'inactivation de BCR ne donne aucune explication sur le rôle éventuel de BCR dans l'hématopoïèse [40].

Le gène BCR code pour une sérine thréonine kinase cytoplasmique de 160 kDa exprimée de façon ubiquitaire avec des quantités élevées au niveau des cellules hématopoïétiques et du cerveau [27]. (**Figure 4**)

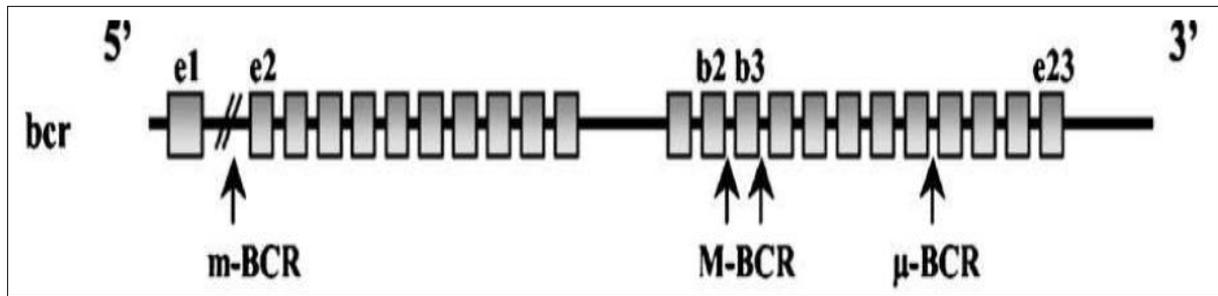


Figure 4 : Gène BCR et les différents points de cassure [31].

La protéine BCR possède plusieurs domaines importants :

* **Partie N terminal** : possède un domaine d'activité sérine-thréonine kinase ainsi qu'un domaine d'oligomérisation de type coiled-coiled responsable de l'activité transformante de la molécule. La régulation de la protéine Bcr se fait à travers la phosphorylation de résidus tyrosine. Par exemple, la phosphorylation de la Tyr177 par diverses kinases permet le recrutement de protéines adaptatrices via leur domaine SH2 (par exemple Grb2) [20].

* **Partie centrale** : est composée d'un domaine DBL-like, homologue à la pleckstrine, qui a un rôle de stimulation de l'échange GTP-GDP par la protéine Rho-GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) [41].

* **Partie C terminale** : a une fonction GAP (GTPase activating protein) pour des protéines G de type Rac et joue un rôle dans la bactericidie des polynucléaires. Néanmoins cette partie est absente dans la protéine de fusion [20]. (**Figure 5**)

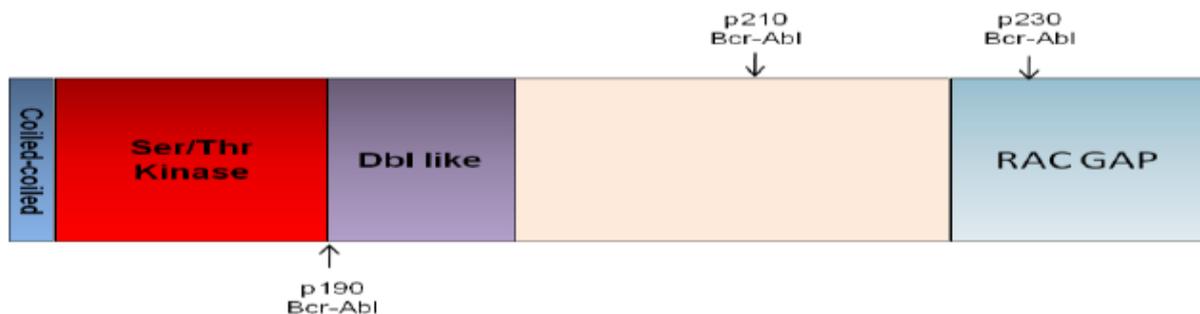


Figure 5 : Structure de la protéine BCR [20].

➤ **Fonction de la protéine BCR :**

La fonction biologique précise de BCR reste encore mal connue. De part de sa séquence, il est vrai semblable qu'elle est impliquée dans les phénomènes de transduction du signal [20].

4. Fusion BCR-ABL et conséquences sur les cellules leucémiques :

4.1. Gène de fusion BCR-ABL et sa protéine :

La translocation t (9 ; 22) entraîne un réarrangement des gènes situés au voisinage des points de cassure, et la constitution sur le chromosome 22 d'un gène de fusion, hybride, comportant la partie 5' (N-terminale) du BCR et la partie 3' (C terminale) d'ABL [30].

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 [42].

En fonction de la localisation des points de cassures sur le gène BCR, plusieurs types de leucémies peuvent être générées selon l'oncogène transcrit : p190 BCR-Abl, p210 BCR-Abl ou encore p230 BCR-Abl.

Région μ BCR (pour *micro* BCR) : entre les exons 19 et 20, permet la synthèse d'une protéine chimérique de 230 kDa. Cette région est impliquée dans < 0.1 % des LMC.

Région m-BCR (pour *minor* BCR) : le point de cassure se localise entre les exons 1 et 2 de BCR et génère un transcrit e1a2 qu'il se traduit en p190 KDa [43] . Cette région est impliquée dans 0.4 % des LMC [42].

Région M-BCR (pour *major* BCR) : majoritairement impliquée dans la LMC qui correspond aux exons 12 à 16 du gène BCR (b1 à b5). La coupure au sein de cette région se produit préférentiellement entre les exons b2 et b3 ou b3 et b4 [20] . Ainsi se forment, respectivement, les produits de fusion b2a2 (35% des cas) et b3a2 (60% des cas) [42].

Les ARN messagers ainsi produits codent tous deux pour une protéine chimérique de 210 kDa retrouvée dans 95% des LMC, 30% des LAL. Cependant, la protéine

codée par le variant b3a2 est plus fréquente et comprend 25 acides aminés de plus que celle du variant b2a2, aucune étude n'a permis de démontrer une différence d'évolution clinique ou biologique entre ces deux variantes [30] (**Figure 6**).

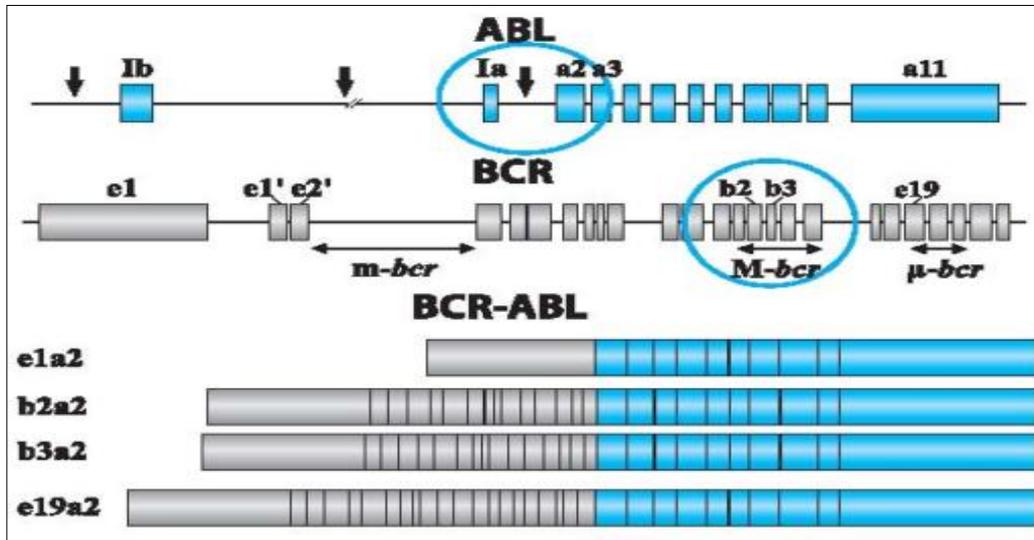


Figure 6 : Variantes protéiques BCR-ABL en fonction des points de cassure [42].

4-2. Dérégulation de l'activité kinase d'ABL :

L'activité de la protéine kinase ABL est régulée par un ensemble complexe d'interactions intramoléculaires qui bloque l'accès au domaine kinase et conduit à une inhibition efficace de son activité. La protéine ABL possède deux principales conformations : une forme compacte et inactive, et une forme étendue et active [34] (**Figure 7**).

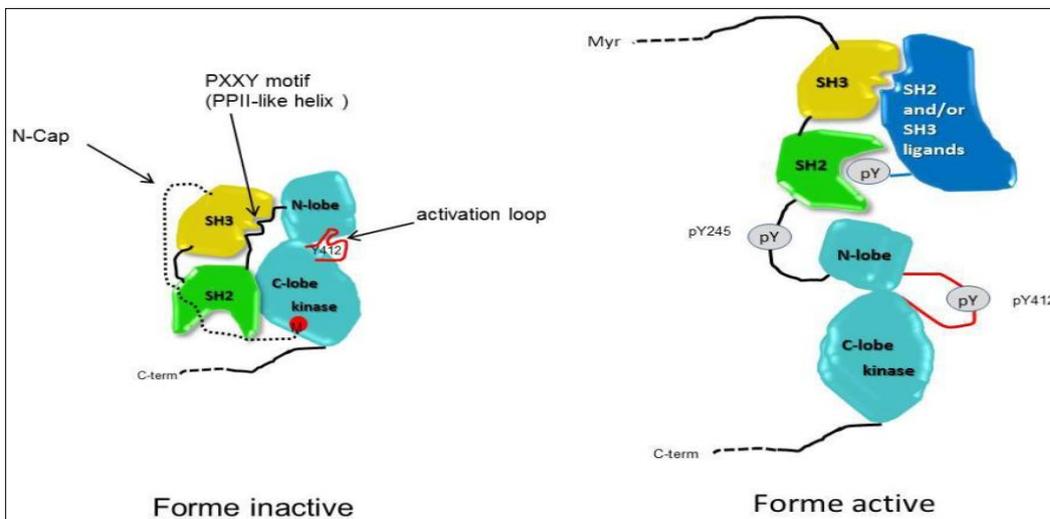


Figure 7 : Représentation de la forme active et inactive d'ABL [34].

Dans le cas normal, l'auto inhibition d'ABL est assurée principalement par l'action d'un groupe myristoyl qui est rattaché au domaine N terminal de la kinase. Ce myristate trouve également un point d'ancrage réversible, au niveau d'une poche hydrophobe du lobe C formant ainsi un verrou. Ce verrou a pour conséquence de fermer la kinase, en induisant un clamp entre les domaines SH et les deux lobes du domaine kinase ; les domaines SH2 et SH3 se retrouvant alors respectivement très proches des lobes C et N. Le clamp ainsi créé, prévient la phosphorylation du segment d'activation en le séquestrant, de sorte que la tyrosine 412 de ce segment ne soit pas accessible aux kinases. Ce segment d'activation lorsqu'il est non phosphorylé sur Y412 empêche l'accrochage du substrat d'ABL et de l'ATP au niveau du domaine catalytique, grâce à une conformation non adaptée, non reconnue par les deux substrats [34, 32, 44].

Au vue de toutes ces interactions, il est clair que l'activation d'Abl mettra en jeu toutes sortes de réactions (protéines et kinases), qui viseront à rouvrir Abl,

La première de ces réactions, consistera à déverrouiller le groupe myristoyl du lobe C, de sorte de pouvoir « declamper » les domaines SH du domaine kinasique. La seconde réaction est la phosphorylation de résidus tyrosine Y245 qui abolit toutes les interactions intramoléculaires.

Dans le cas de LMC, la fusion des deux protéines BCR et ABL entraînent la production de l'oncoprotéine BCR-ABL qui est constitutivement active. Les mécanismes de régulation d'ABL sont altérés au sein de la protéine de fusion et participent à l'oncogénicité de l'enzyme [45].

Du coté ABL la protéine BCR-ABL ne possède pas de groupement myristate, l'absence de cet élément entraîne la perte d'un ensemble d'interaction nécessaire à la stabilisation de la conformation inactive d'ABL. En effet, l'absence de l'ancrage du groupement myristoyl engendre la perte de l'interaction entre le domaine SH et le lobe C et N du domaine catalytique. De ce fait, la tyrosine 245 et la tyrosine 412 du segment d'activation sont exposées à l'environnement, favorisant leur phosphorylation et l'activation du domaine kinase d'ABL dans BCR-ABL [28].

Du côté BCR, la partie de BCR apporte de nouveaux éléments favorables à l'oncogénicité de BCR-ABL.

➤ **Le domaine d'oligomérisation : (Le domaine coiled-coiled) :**

Est nécessaire à la dimérisation de la protéine BCR-ABL. Conduisant à l'ouverture de l'activité tyrosine kinase. En effet, cette partie de BCR est également présente dans la chimère BCR-Abl et conduit à la dimérisation de la protéine BCR/ABL.

L'oligomérisation de l'oncoprotéine BCR-ABL permet une autophosphorylation croisée sur plusieurs résidus de tyrosine et donc son auto-activation de l'activité kinase de BCR-Abl. Cette autophosphorylation crée des sites de fixation pour domaines SH2 des protéines adaptatrices ou catalytiques [20].

➤ **Phosphorylation du résidu Tyrosine 177 :**

Le résidu tyrosine 177 présente une importance fonctionnelle majeure. Il est la cible de l'autophosphorylation des résidus tyrosine de BCR par l'activité tyrosine kinase d'Abl dans BCR-Abl. Ce résidu tyrosine 177 phosphorylé joue un rôle très important dans la transformation des cellules hématopoïétiques. En effet, c'est sur cette tyrosine phosphorylée que se fixe l'adaptateur Grb-2 (Growth factor receptor-bound protein 2) [46] par l'intermédiaire de son domaine SH2 [47]. L'association de BCR-Abl avec la protéine Grb-2 apparaît essentielle au pouvoir oncogénique de BCR-Abl [48].

Ces modifications protéiques expliquent l'activation permanente de la tyrosine kinase de BCR/ABL indépendante des signaux extracellulaires [20] (**Figure 8**).

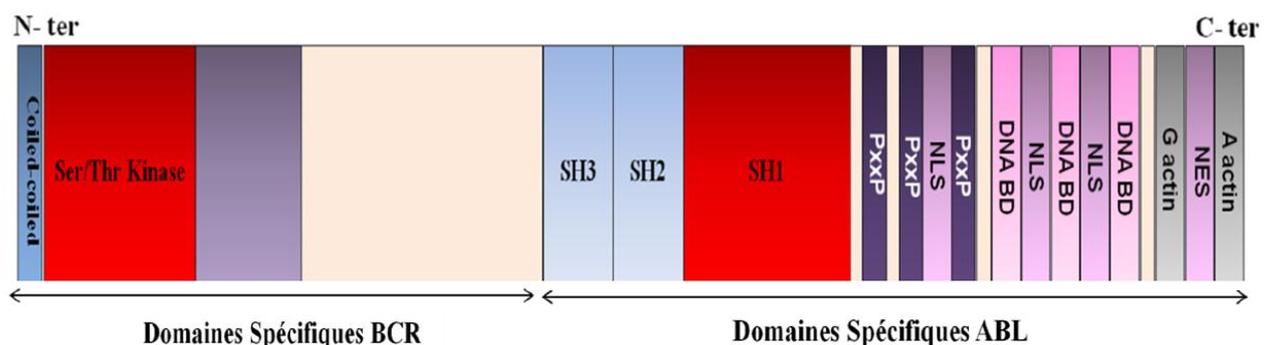


Figure 8 : Structure de la protéine de fusion p210 BCR-Abl [40].

4-3 Mécanismes physiopathologiques :

La protéine Abl, physiologiquement, constitue une navette entre le noyau et le cytoplasme mais, lorsqu'elle est fusionnée à BCR, l'onco-protéine perd cette propriété et est principalement retenue dans le cytoplasme [49], où elle induit une phosphorylation d'un nombre très important de substrats, ce qui est responsable des propriétés de la cellule leucémique.

En effet, l'auto-activation et la perte de la régulation de l'activité tyrosine kinase entraînent une phosphorylation excessive qui active différentes voies de signalisation cellulaire (les voies Ras, JAK/STAT et PI3K) normalement « empruntées » dans les cellules normales par des signaux extracellulaire [15].

L'autophosphorylation du résidu tyrosine 177 de la protéine BCR-Abl permet la fixation de la protéine Grb-2 qui, liée à Sos, stabilise la forme activée de Ras. Ras activée peut, via les protéines Raf, Mek et Erf, activer à son tour d'autres gènes induisant un signal prolifératif (**Figure 9**).

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 (**Figure 11**).

De même, la voie des PI3 kinases peut aussi être activée via Grb2 en association avec GAB2, induisant un signal prolifératif et anti-apoptotique via Akt. Cependant, deux autres protéines substrats de BCR-Abl peuvent aussi activer PI3K : Cbl et Crkl se liant respectivement à SH2 et à SH3 d'ABL [20] (**Figure 10**).

✓ **La voie de RAS :**

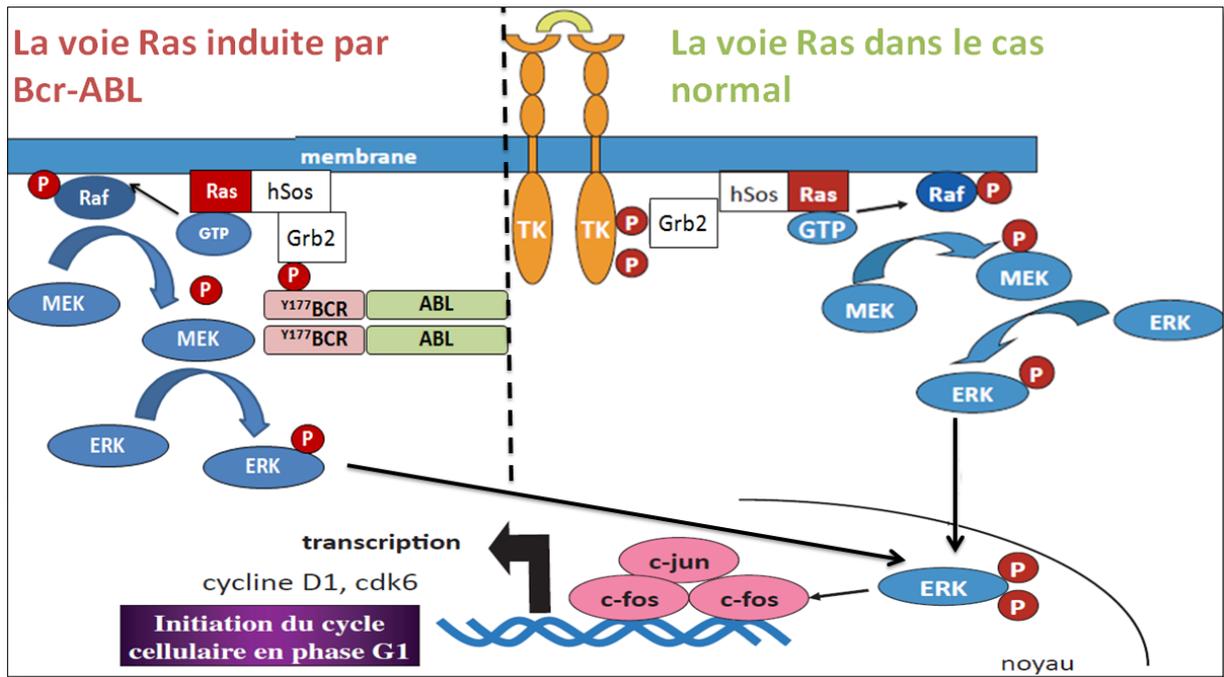


Figure 9 : comparaison entre la voie de signalisation de Ras normal et induite par BCR-Abl
Schéma original adapté des articles [20, 50].

✓ **La voie de PI3K :**

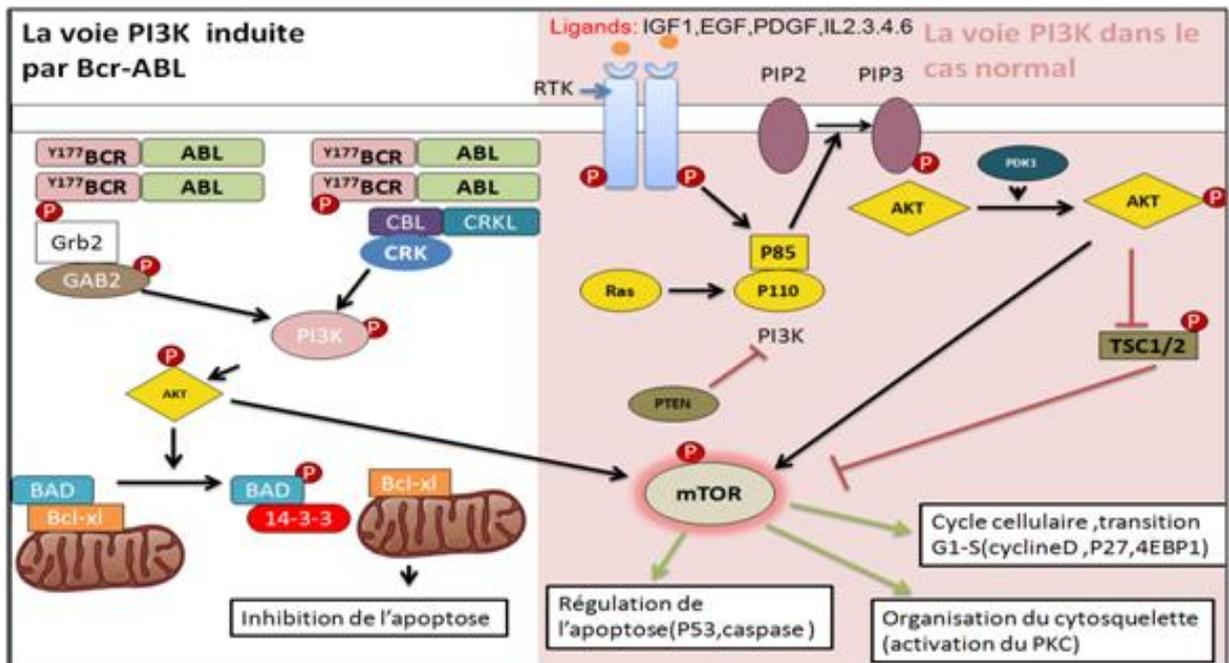


Figure 10: Comparaison entre la voie PI3K normal et induite par BCR-Abl.

Schéma original adapté des articles [20,42, 51,52].

✓ **La voie de STAT :**

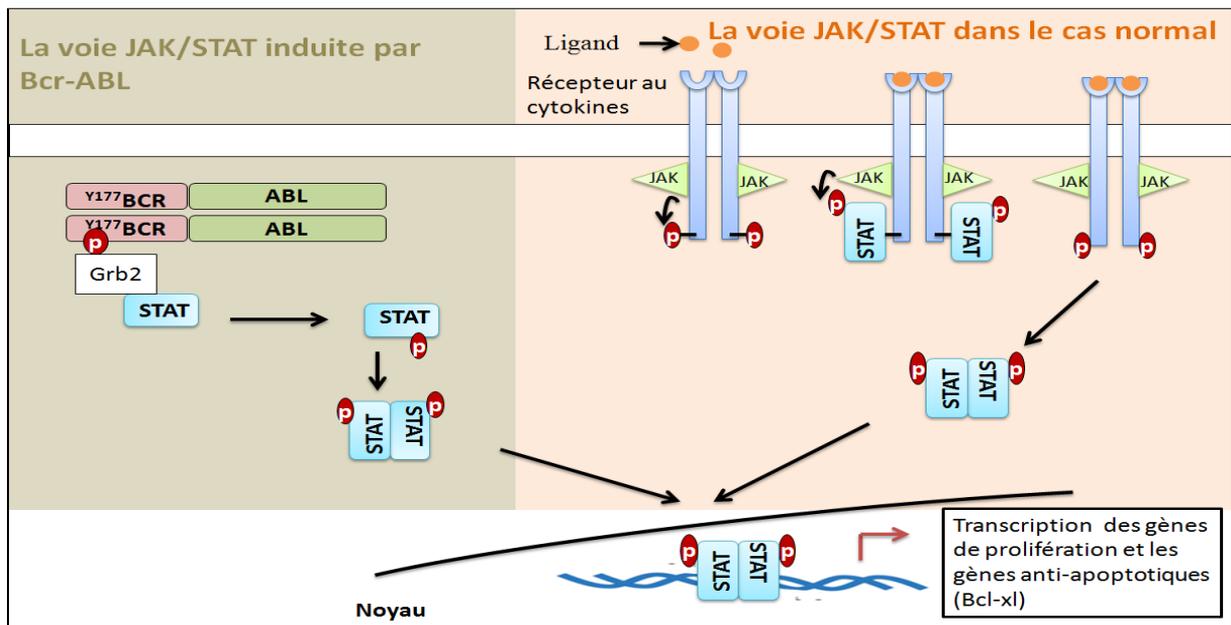


Figure 11 : comparaison entre la voie JAK/STAT normal et induite par BCR-Abl .

Schéma original adapté des articles [20,53].

4.4. Les conséquences des anomalies sur les cellules leucémiques :

• **Croissance et prolifération :**

La prolifération cellulaire consécutive à l'entrée en cycle des cellules est contrôlée par les CDK et leurs inhibiteurs CDKI appartenant à la famille des protéines Cip/Kip [54].

Parmi les CDKI, la protéine p27 Kip est une protéine nucléaire inhibitrice des complexes cyclinE/CDK2. La p27 Kip joue un rôle primordial dans la régulation de la phase G1, son expression est diminuée ou son activité inhibée dans de nombreux cancers.

L'inhibition de l'expression de p27 dans les cellules BCR-ABL semble par ailleurs être un événement dépendant de l'activité du système ubiquitine-protéasome. De manière remarquable, cet effet inhibiteur semble faire intervenir l'activation d'AKT/PKB par BCR-ABL via des mécanismes dépendant de PI3K.

La dégradation de p27 Kip va conduire à une activation des CDK, ce qui conduit à une prolifération importante des cellules.

Récemment, l'équipe de Borriello a identifié un autre CDKI impliqué dans la prolifération des cellules BCR-Abl+, la protéine p57 Kip2. En effet, l'inhibition de l'activité kinase de BCR-Abl par des inhibiteurs de tyrosine kinase entraîne une surexpression de p57 Kip2. Cette surexpression bloque ainsi la prolifération des lignées BCR-Abl+ et des cellules primaires des patients LMC [54].

- **Inhibition de l'apoptose :**

Un 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 [27] (**Figure 10**) et qui bloque le relargage du cytochrome C par la mitochondrie, ce qui induit l'inactivation de la voie des caspases, ou à l'hyperexpression de la protéine anti apoptotique Bcl-2 via des voies de signalisation Ras ou PI3 kinases dépendantes. D'autres partenaires moléculaires, telles les protéines STAT ou encore la voie NfκB interviennent dans l'inhibition d'apoptose induite par BCR-ABL [20].

- **Instabilité génomique :**

BCR-ABL est la seule anomalie cytogénétique détectable au cours de la phase chronique de la maladie. La progression vers les phases accélérée puis blastique s'accompagne d'anomalies génétiques additionnelles marqueurs d'une instabilité génomique croissante (duplication du chromosome Ph, trisomie 8 ou isochromosome 17). De nombreux travaux, réalisés principalement chez des patients en phase blastique de LMC, ont montré l'activation fréquente d'oncogènes tels que c-Myc ainsi qu'une augmentation croissante de l'activité télomérase dans les cellules Ph+. Largement impliquées dans le développement de tumeurs solides, des mutations de Ras n'ont été qu'exceptionnellement rapportées. Des altérations (délétions, réarrangements) de gènes suppresseurs de tumeur tels que P53 et P16 ont été mises en évidence.

La responsabilité de BCR-ABL dans la genèse de cette instabilité est fortement suspectée. Un des mécanismes possibles récemment mis en évidence est une régulation négative d'enzymes de réparation de l'ADN (DNAPKcs) induite par BCR-ABL via la voie du protéasome [55].

5. Diagnostic de la LMC :

a. Examens cliniques :

Les principaux signes cliniques de la leucémie sont récapitulés dans le tableau 1 :

Symptômes / phase de LMC	Phase chronique	Phase d'accélération	Phase blastique
Altération de l'état général (AEG)	Fièvre Pâleur Asthénie Perte de poids	Augmentation de la fièvre d'autres signes	AEG +++ Augmentation du fièvre. Sueurs nocturnes
Syndrome Tumoral	Splénomégalie	Augmentation du splénomégalie	Splénomégalie ++ -hépatomégalie -adénopathies -douleurs osseuses
Autres manifestations	-Leucostase pulmonaire ou cérébrale - Hyperuricémie	-Début de l'évolution cytogénétique -Début de la résistance au Traitement	-Lésions hémorragiques - Proliférations blastiques extramedullaires

Tableau 1 : Les symptômes cliniques de la LMC [20, 30].

b. Les examens biologiques :

1. Hémogramme :

L'hémogramme ou Formule Numération Sanguine (FNS) est l'examen biologique de référence, il permet à lui seul d'orienter le diagnostic de la LMC. Il se fait sur un échantillon de sang prélevé par ponction veineuse et recueilli dans un anticoagulant. Il est complété par un frottis sanguin coloré au May-Grünwald-Giemsa (MGG) [56].

Les anomalies sanguines les plus souvent rencontrées sont :

- Une hyperleucocytose franche [30].
- La myélémie qui est constituée de métamyélocytes, de myélocytes et quelques promyélocytes et plus rarement de myéloblastes.
- Une anémie peu courante et modérée
- Une thrombocytose[20].

2. Myélogramme :

Il affirme le syndrome myéloprolifératif en montrant une moelle extrêmement riche, faite essentiellement de cellules granuleuses qui sont des myélocytes, des métamyélocytes, et des polynucléaires, avec tous les stades de la maturation représentés (absence d'hiatus de maturation) [20 ,55].

c. Examen cytogénétiques :

1. Cytogénétique conventionnelle (caryotype)

Le caryotype est réalisé sur un échantillon médullaire, ou sur un prélèvement du sang si la myélémie est importante [57], il permet de mettre en évidence le chromosome Ph dans 95 % des cas, et de détecter les anomalies caryotypiques additionnelles au chromosome Ph qui peuvent être présentes au diagnostic, ou apparaître au cours de la progression de la maladie [58].

Dans 5% des cas, le gène de fusion BCR-ABL résulte soit : d'une translocation variante complexe, impliquant un 3ème, voire plusieurs chromosomes, ou d'une insertion cryptique de matériel chromosomique, indétectable par les techniques de cytogénétique conventionnelle. Dans ce cas, la LMC est dite Ph négative, BCR-ABL positive, et seules les techniques d'Hybridation in Situ en Fluorescence et de biologie moléculaire permettront la détection du gène hybride et du transcrit BCR-ABL respectivement [59].

2. Fluorescence in situ hybridation ou FISH :

La FISH est un test cytogénétique plus précis réalisé à partir d'un échantillon de sang ou de moelle osseuse [60]. Elle repose sur la capacité des fragments d'ADN

marqués par un ou plusieurs fluorochromes (sondes) de s'hybrider spécifiquement avec un ADN complémentaire cible [61].

Cette technique permet de visualiser directement le gène de fusion BCR-ABL sur les noyaux, qu'il y ait translocation visible en cytogénétique ou pas, et de détecter les remaniements BCR-ABL sans chromosome Philadelphie et d'être plus sensible que le caryotype [20] (**Figure 12**).

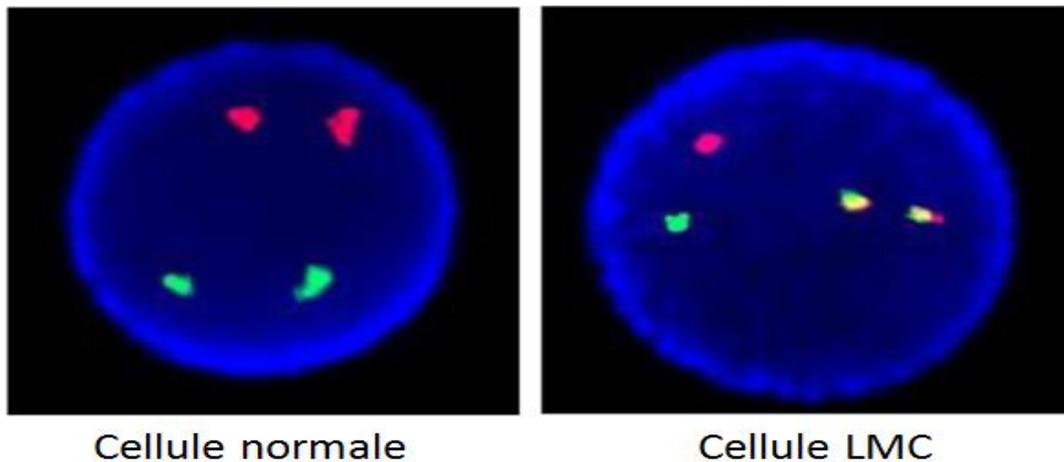


Figure 12 : Photo d'une FISH sur une cellule en interphase [62].

Sonde BCR en vert, sonde ABL en rouge ABL, Détection du gène de fusion BCR-ABL en jaune.

d. Examens de biologie moléculaire :

Real Time PCR ou PCR en temps réel :

Compte tenu de la grande dispersion des points de cassure sur l'ADN lors d'une LMC, l'amplification directe de celui-ci est impossible. Il faut donc utiliser une enzyme : la Reverse Transcriptase qui convertit l'ARNm en ADNc, plus stable que l'ARNm [1].

Cet examen est réalisé à partir des cellules médullaires ou sanguines, il permet la détection et la quantification avec une extrême sensibilité les transcrits de fusion BCR-ABL P 230, P210 et P190. Cette technique montre que plus de 50 % des patients pour lesquels la cytogénétique était négative sont en fait BCR/ABL⁺.

La PCR en temps réel constitue un bon moyen pour le diagnostic et de suivi l'évolution de la LMC, ainsi, pour l'appréciation de la réponse moléculaire lors du traitement [15, 20].

e. Critères de diagnostic et suivi : (recommandations internationales) :

• **Critères de diagnostic :**

- ❖ plénomégalie fréquente. S
- ❖ hyperplasie granuleuse médullaire et sanguine. H
- ❖ yélémie sans hiatus (le passage dans le sang de précurseurs des granulocytes). M
- ❖ chromosome Philadelphie ou réarrangement BCR-ABL [63]. C

• **Critères de suivi :**

L'expression du rapport BCR-ABL1/ABL1 selon l'échelle internationale (IS) a permis de définir plusieurs seuils (réponses moléculaires ou RM) permettant de vérifier l'efficacité thérapeutique (**Figure 13**). Ces points sont définis comme une diminution de 3, 4, 4½ ou 5 logarithmes décimaux par rapport à une ligne de base théorique au diagnostic. Ainsi une valeur de 0,1 % correspond à la réponse moléculaire majeure (RMM ou RM3), des valeurs de 0,01 %, 0,0032 %, 0,001 % définissent respectivement les réponses moléculaires RM4, RM4.5 et RM5 [63].

Un suivi régulier des patients est nécessaire chaque 3 mois jusqu'a RMM puis tous les 6 mois pour identifier ceux qui ne répondent pas au traitement [64].

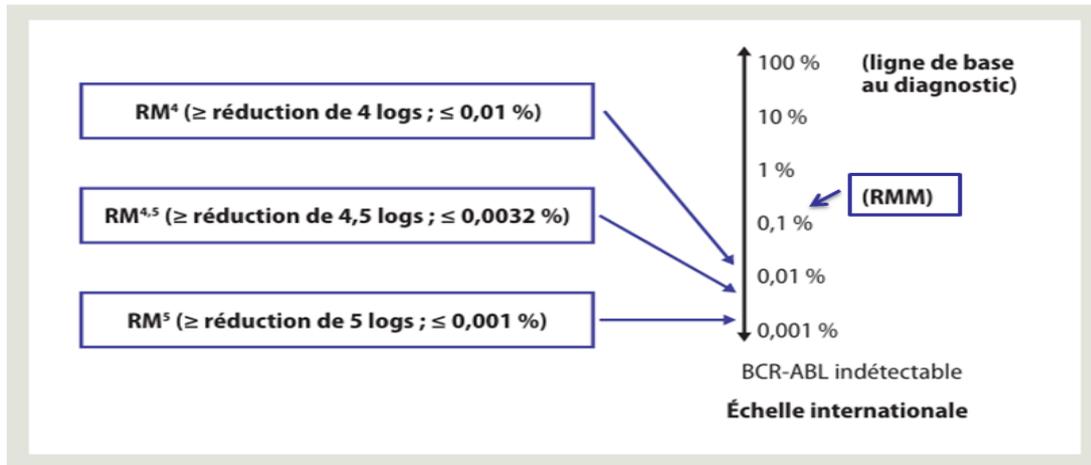


Figure 13 : les réponses moléculaires (RM) [65].

Trois critères sont utilisés pour évaluer l'efficacité du traitement dans la LMC (**Tableau 2**) :

- Réponse hématologique : évalue la disparition des signes biologiques et cliniques par le contrôle de l'hémogramme et l'auscultation du patient.
- Réponse cytogénétique : se base sur la proportion de cellules portant le chromosome Philadelphie (en %) issue du caryotype médullaire et de l'analyse par FISH.
- Réponse moléculaire : s'appuie sur le ratio « BCR-ABL » calculé à partir des résultats de l'examen moléculaire [66].

Réponse hématologique complète (RHC)	Réponse cytogénétique (RCy)	Réponse moléculaire (RM)
<ul style="list-style-type: none"> • Plaquettes <500x10⁹L • Leucocytes<10x10⁹L • Pas de myélémie • Basophiles <5% • Pas de splénomégalie 	Complète (RCyC) Ph ⁺ 0% Partielle (RCyP) Ph ⁺ 1-35% Mineure (RCym) Ph ⁺ 36-65% Minimale Ph ⁺ 66-95% Aucune Ph ⁺ >95%	Ratio BCR-ABL/ gène de contrôle *Réponse majeure ≤ 0,10% (RMM) *Réponse moléculaire « complète » -RMC ⁴ < 0,01% -RMC ^{4,5} < 0,0032% -RMC ⁵ < 0,001%
Suivi <ul style="list-style-type: none"> • Tous les 15 jours jusqu'à obtention de la RHC • Puis tous les 3 mois 	Suivi <ul style="list-style-type: none"> • Au diagnostic à 3 et 6 mois • Tous les 6 mois jusqu'à RCyC 	Suivi <ul style="list-style-type: none"> • Tous les 3 mois jusqu'à RMM • Puis tous les 6 mois

Tableau 2: Critères de réponses au traitement selon l'ELN 2013[67].

II. Matériels et méthodes

1. Patients :

Notre étude pratique à été réalisée au niveau du service d'immunologie de l'Hôpital Central de l'Armée « Mohamed seghir nakach » sur une période de 4 mois du Février au Juin 2017.

Cette étude prospective à porté sur 40 patients adressés au service d'immunologie pour suspicion de LMC.

N	40	100%
Homme	23	57.5 %
Femme	17	42.5 %
Sex-ratio (H/F)	1,35	
Age moyen	45,75	

Tableau 3: caractéristique de la population étudiée.

Une fiche de renseignement a été remplie pour chaque patient par le médecin traitant incluant des informations sur son âge, le sexe, région d'origine, la date de prélèvement, les différentes manifestations clinico-biologiques et l'examen demandé (la recherche du transcrit BCR-ABL1) (**Annexe 1**).

En pratique, cet examen est réalisé sur échantillon de sang veineux dans des conditions stériles dans des tubes EDTA avec une étiquette portant l'identité du patient. Le tube doit être agité par retournement successifs pour éviter la formation de micro-caillots.

2. Méthodes :

2-1. Extraction d'ARN :

Principe de kit :

Le kit « AMBION RNA LeukoLOCK™ Total RNA Isolation System » est optimisé pour une utilisation avec le sang total humain. C'est une méthode de fractionnement du sang total.

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

Protocole :

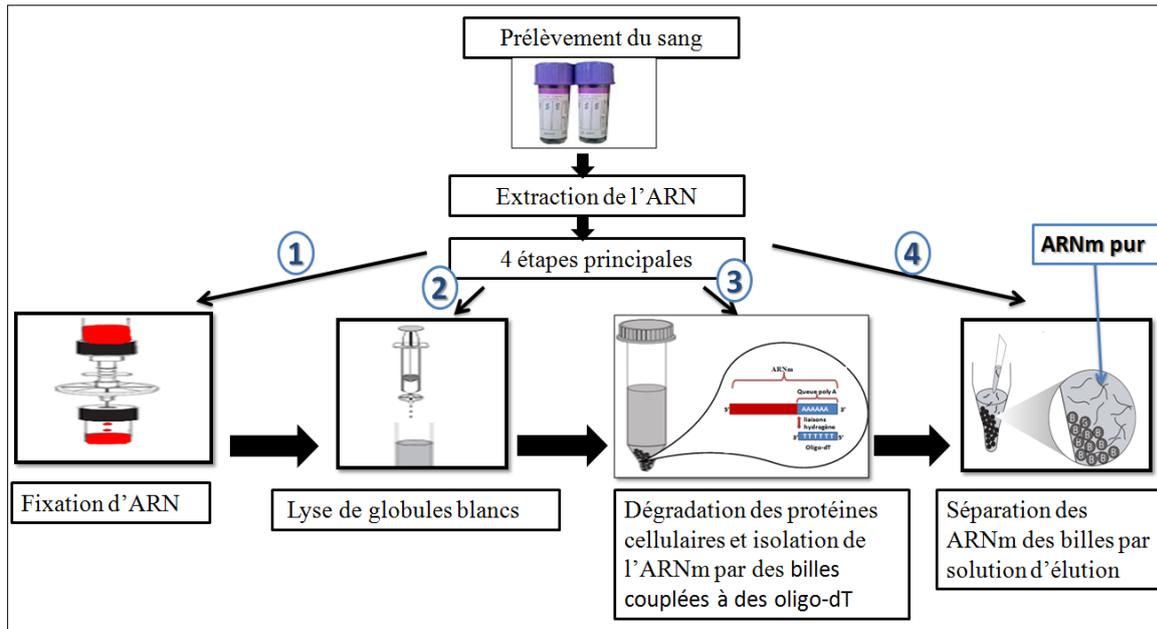


Figure 14: Schéma résumé de l'extraction d'ARN.

✓

Fixation d'ARN :

La totalité du sang anticoagulé du patient (2 tubes EDTA) est passé à travers une colonne fournie par le kit qui contient un filtre leukoLOCK™ qui capture la population totale de leucocytes tout en éliminant les globules rouges, les plaquettes et le plasma.

On fait un rinçage avec 3ml de solution salée tamponnée au phosphate (PBS) pour éliminer les globules rouge résiduels, ensuite on ajoute 3ml de solution de stabilisation « ARN Later » qui protège l'ARN cellulaire dans des tissus intacts et riches en ARNase.

✓ **Lyse des globules blancs :**

On place la colonne sur un nouveau tube flacon, et on prépare un mélange de 2.5ml de solution SLB (solution de lyse des globules blanc) et de 70 µl de solution d'ajustement de pH.

On fait passer le mélange à travers la colonne ensuite on injecte de l'air 2 à 3 fois.

✓ **Isolation de l'ARN :**

On ajoute au lysat cellulaire 2.5µl de la protéinase K a fin de dégrader toutes les protéines cellulaires, et 2.5ml de H₂O nucléases free qui minimise la dégradation de l'ARN, on mélange doucement pendant 5 min.

Pour isoler l'ARNm on ajoute 50 µl de billes couplées à des oligo-dT, les ARNm vont se fixer aux oligo-dT par l'intermédiaire de la queue poly A.

Ensuite on ajoute 2.5 ml d'isopropanol, on vortex légèrement et on incube pendant 5 min.

Après l'incubation le mélange est centrifugé 3 min à 3200 t/min, puis on élimine le surnagent sans toucher les billes.

Une fois le surnagent est éliminé on effectue des lavages par les solutions de lavage N°1 et N°2/3 fournies par le kit.

On fait en premier temps un lavage par la solution de lavage N°1, on ajoute 600 µl de la solution, on vortex pendant 30 sec et on aspire la totalité des billes puis on les déposer dans un tube éppendorf fournie avec le kit.

Pour une deuxième fois on ajoute 600 µl de solution N°1, on vortex pendant 30 sec et on aspire la totalité des billes puis on les déposer dans un tube éppendorf.

On centrifuge à 1200 t/min pendant 30 sec puis on élimine le surnagent.

Une fois le surnagent est éliminé on fait des lavages par la solution N°2/3, on ajoute 750 µl de solution N°2/3, on vortex fortement pendant 30 sec, on centrifuge à 1200 t/min pendant 30 sec puis on élimine le surnagent.

On ajoute 750 µl de solution N°2/3 pour une deuxième fois et on vortex fortement pendant 30 sec ensuite, on centrifuge à 1400 t/min pendant 1 min puis on élimine le surnageant.

✓ **Elution :**

Pour séparer les ARNm des billes, on laisse sécher l'éppendorf sous la hotte 3 min puis on ajoute 70 µl de solution d'éluion, on vortex fortement et on centrifuge à 1400 t/min pendant 2 min.

À la fin on récupère le surnageant qui contient les ARNm dans un nouvel eppendorf.

2-2. Transcription inverse:

Principe :

C'est le processus de conversion de l'ARNm total extrait d'échantillon en ADN complémentaire en utilisant une enzyme appelée : RevertAid Reverse Transcriptase.

Protocole :

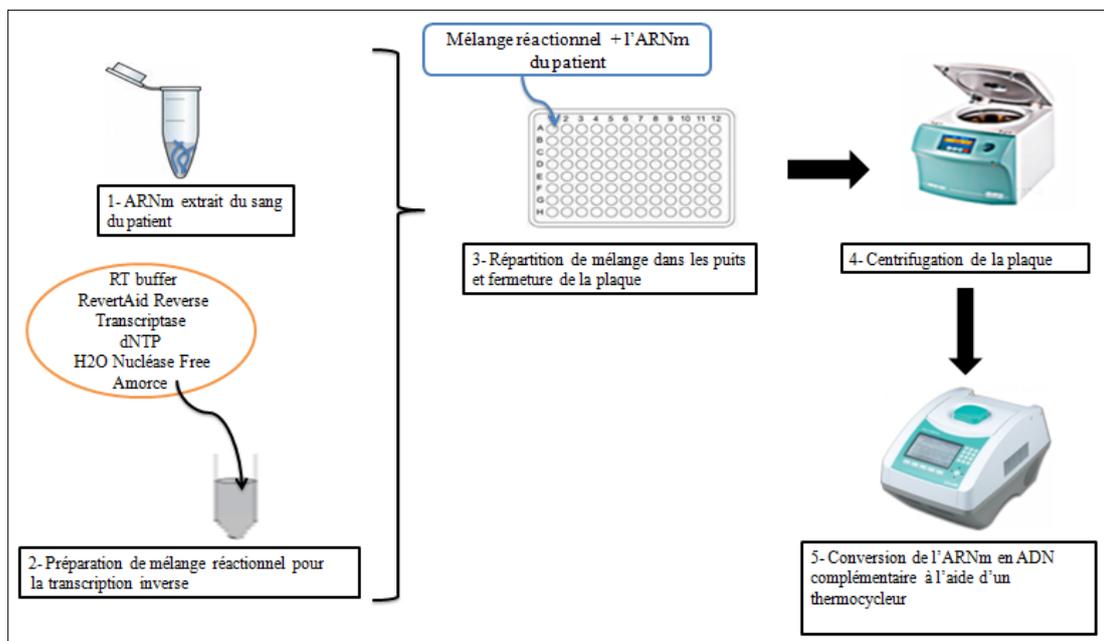


Figure 15 : Schéma résumé de la transcription inverse.

L'ADN complémentaire est synthétisé à l'aide d'un Thermocycleur en utilisant le kit de conversation d'ARN en ADNc qui contient le mélange de la réaction de reverse transcriptase :

Les amorces de type Random primer ou amorces aléatoires, qui sont des oligonucléotides de 6 bases (Hexamer) représentant toutes les séquences possibles pour cette taille, et qui ont la possibilité de recourir à tous les types d'ARN sans connaissance de séquence, les H₂O NUCLEASE FREE qui minimise la dégradation des ARN, RT Buffer, les dNTPs et l'enzyme RevertAid Reverse Transcriptase.

Avant de démarrer la procédure, on retire les réactifs de leur lieu de conservation, on les centrifuge brièvement pour rassembler la solution au fond.

On prépare le mélange réactionnel pour n échantillons qui contient les composants suivants :

Réactifs	Volume (en µl)
RT Buffer	2 x n
RevertAid Reverse Transcriptase	2 x n
Random Primer	2 x n
dNTP	0,8 x n
H ₂ O Nucléase Free	3,2 x n

Tableau 4 : Mélange réactionnel de la transcription inverse.

Dans une plaque de 96 puits on dépose 10 µl du mélange réactionnel par puits, ensuite on ajoute 10 µl d'ARNm.

On recouvre la plaque par un film optique adhésif, et on la centrifuge brièvement pour faire basculer le contenu et éliminer les bulles d'air des solutions.

A la fin on place la plaque dans le Thermocycleur biometra professional préalablement programmé pour la réalisation de la réaction de transcription inverse (RT), comprenant les étapes suivantes (**Tableau5**) :

Etapes	Température	Durée
Transcription inverse	50°C	30'
Dénaturation initiale	94°C	2'
Dénaturation par cycle	94°C	30''
Hybridation par cycle	55°C	30''
Elongation par cycle	68°C	90''
Conservation	4°C	∞
Nombre de cycle	40	

Tableau 5 : Cycle de la transcription inverse.

2-3. PCR en temp réel :

Principe :

L'introduction d'une molécule fluorescente dans le milieu réactionnel et la détection des amplifications cycle par cycle par une méthode fluorimétrique sont les bases des techniques de PCR en temps réel. Cette nouvelle technologie repose donc sur une analyse de la cinétique de la réaction d'amplification alors que la PCR classique s'appuie sur une détection en point final des produits formés. La PCR en temps réel se déroule en trois étapes, la phase d'initiation, La phase exponentielle et la phase plateau [68] (**Figure 15**).

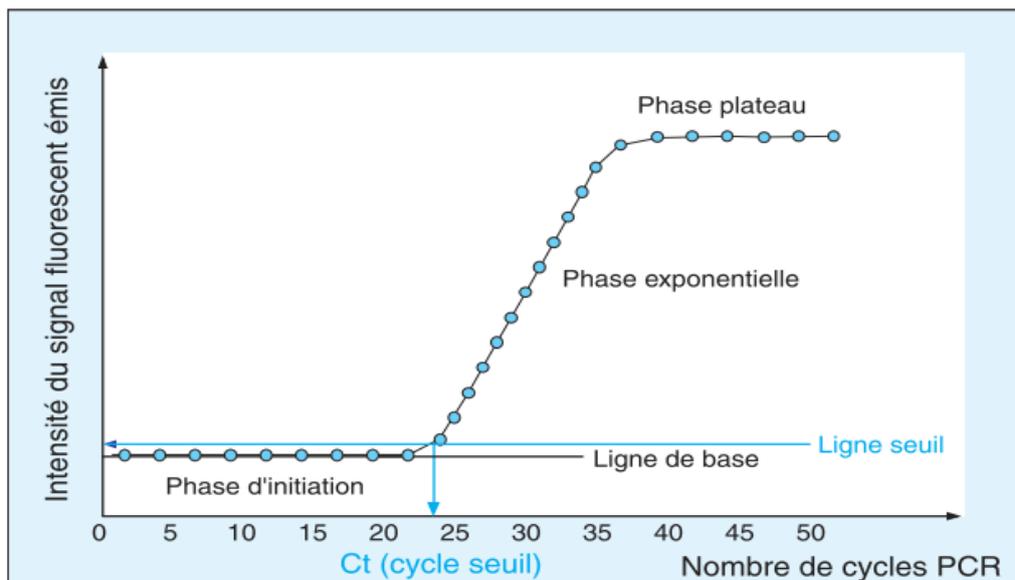


Figure 16 : Modèle graphique de la PCR en temps réel où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles [68].

Cycle seuil (Threshold cycle) :

Le concept du « cycle seuil » est à la base d'une quantification précise et reproductible pour les techniques fluorescentes en PCR. Les valeurs de fluorescence sont enregistrées au cours de chaque cycle et représentent la quantité d'amplicons produits en un point précis dans la réaction. Plus il y a de matrices (template) à amplifier au départ de la réaction PCR, moins élevé sera le nombre de cycle requis pour atteindre un point où le signal d'émission de fluorescence sera statistiquement et significativement plus élevé que le bruit de fond. Ce point est défini comme étant le cycle seuil, (Ct) et apparaîtra toujours au cours de la phase exponentielle d'amplification [69].

Détection :

La technique PCR utilisée lors de ce travail est basé sur le principe des sondes fluorescentes avec une technique de détection : la technologie d'hydrolyse de sonde taqman assay.

Ces sondes sont complémentaires à une séquence cible d'ADNc et marquées par un reporter fluorescent lié à l'extrémité 5' (FAM, VIC ...) et un quencher lié à l'extrémité 3' (TAMRA).

La technologie Taqman est basée sur l'activité 5'-exonucléasique de la Taq polymérase pour hydrolyser une sonde hybridée à sa séquence cible sur l'amplicon durant l'étape d'hybridation/extension de la PCR.

✓ **Fonctionnement des réactif TaqMan**

Lorsque la sonde est intacte la proximité de quencher réduit fortement la fluorescence émise par le reporter du fait d'un transfert d'énergie dans l'espace par principe FRET (fluorescence resonance energy transfer) qui dissipe cette énergie sous forme de chaleur plutôt que de mettre de la fluorescence. Si la séquence cible est présente la sonde s'hybride entre les amorces puis elle est clivée par l'activité 5' exonucléase de la Taq polymérase. Le clivage de la sonde sépare le reporter du quencher en augmentant le signal de premier, et supprime la sonde du brin cible et permet à l'amorce de poursuivre son extension jusqu'à la fin du brin modèle.

Une quantité croissante des molécules du reporter est libéré à chaque cycle ce qui augmente l'intensité de la fluorescence proportionnellement à la quantité d'amplicon produite [69] (**Figure 17**).

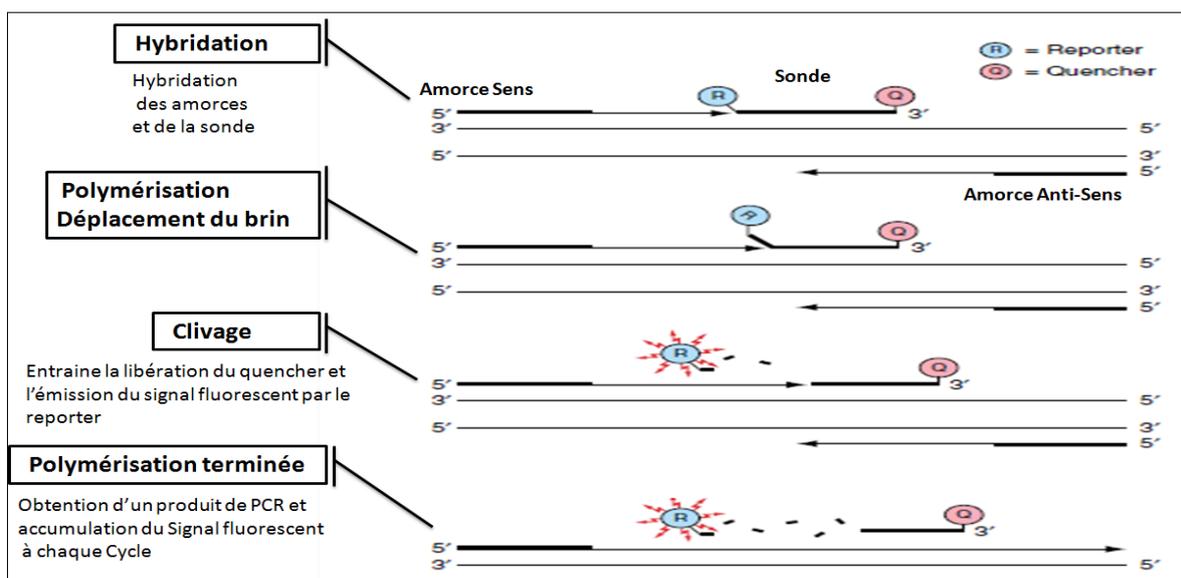


Figure 17: Principe de la sonde TaqMan® [69].

Séquences des amorces et des sondes utilisées pour l'amplification :

L'amplification du gène hybride BCR-ABL et le gène ABL est effectuée par les amorces représentées dans les **Tableaux 6 et 7** :

Amorce d'ABL	Séquence de l'amorce
Amorce sens	5'-AAAATGGCCAAGGCTGGG-3'
Amorce anti sens	5'-ACCAGGAGTGTTTCTCCAGACTG-3'

Tableau 6: Amorces sens et antisens utilisées pour l'amplification de gène de contrôle ABL par PCR en temps réel

Amorce de BCR-ABL	Séquence de l'amorce
Amorce sens b2	5'-ATCCGTGGAGCTGCAGATG-3'
Amorce sens b3	5'-GAGTCTCCGGGGCTCTATGG-3'
Amorce anti sens	5'TCAGATGCTACTGGCCGCTGAA3'

Tableau 7: Amorces sens et antisens utilisées pour l'amplification par PCR de transcrit de BCR-ABL P210.

La détection de gène ABL et le gène de fusion BCR-ABL est effectuée par les sondes représentées dans le **Tableau 8** :

Sonde	Sequence de la sonde
FAM-TAMRA	6-FAM-AAG AAA TTC AGA GGC CAG TAG C-TAMRA
VIC-TAMRA	VIC-CCA CCC CCT CTA CCC CGC ATC TAC-TAMRA

Tableau 8 : Séquences des sondes

PCR en temps réel qualitative :

Principe du kit :

Le Kit « Life technologie » est prévu pour la détection qualitative des transcrits de fusion BCR-ABL p210 (b2a2 et b3a2) dans des échantillons de sang périphérique.

Ce kit utilise un jeu d'amorce et des sondes d'hydrolyses marquées par un reporter « FAM » en 5' et un quencher « TAMRA » en 3'.

Protocole :

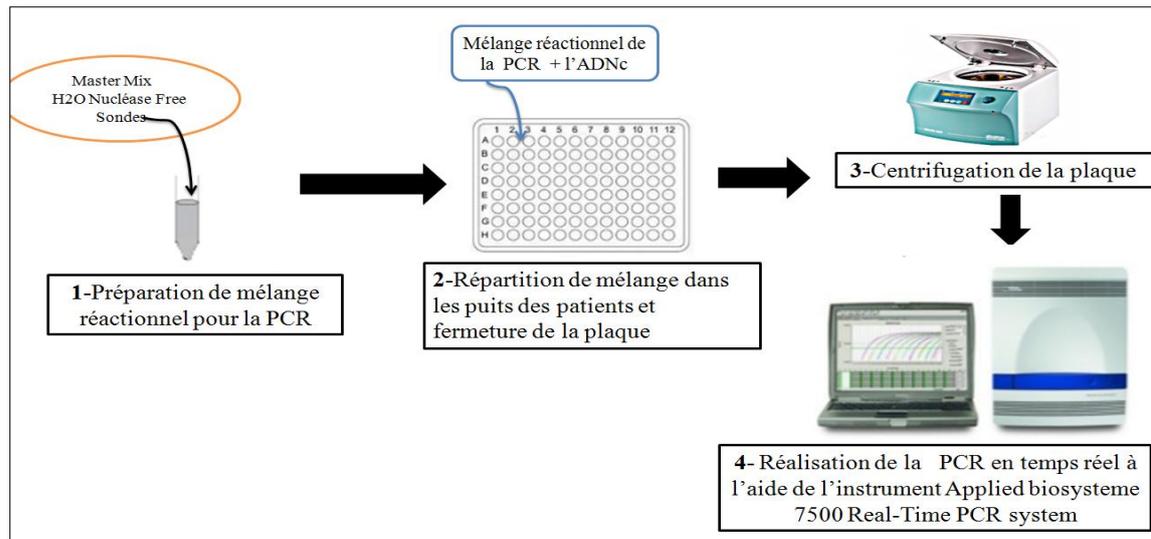


Figure 18 : Schéma résumé de la PCR en temps réel qualitative.

Avant la mise en place de la PCR tous les composants doivent être mélangés et centrifugés brièvement pour rassembler la solution au fond.

Pour la réaction de PCR on doit préparer pour chaque patient deux mélanges PCR, selon les sondes :

- ❖ Un mélange avec sonde BCR-ABL
- ❖ Un mélange avec sonde référence ABL

Le gène ABL est amplifié en tant que contrôle interne afin de vérifier la pureté des réactifs et le bon fonctionnement de l'amplification.

On prépare le mélange PCR pour n échantillons, le mélange contient les composants suivants :

Réactifs	Volume (en µl)
Master Mix	12,5 x n
H ₂ O Nucléase Free	8,25 x n
Sonde	1,25 x n

Tableau 9 : Mélange réactionnel de la PCR en temps réel qualitative.

* **Master Mix** : solution prémélangée et prête à l'emploi contenant de la Taq polymérase, les dNTP, les amorces et MgCl₂.

Une fois le mélange PCR est préparé, On vortex et on le centrifuge 10 s à 2 000 rpm.

On dépose 22 µl par puits, pour chaque patient on remplit deux puits, l'un correspond a un mélange avec sonde Bcr-ABL et l'autre correspond a un mélange avec sonde ABL. Après la répartition du mélange on ajoute 1,25 µl d'ADNc du patient par puits.

On scelle la plaque par un film adhésif optique puis on la centrifuger brièvement pour éliminer les bulles d'air.

A la fin on place la plaque dans l'instrument Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System.

PCR en temps réel quantitative :

Principe du kit :

Le kit BCR-ABL P210 (Mbcr) One-Step Detection « ENTROGEN » est prévu pour la détection quantitative des transcrits de fusion BCR-ABL p210 (b2a2 et b3a2) dans des échantillons de sang périphérique de patients pour lesquels un diagnostic de leucémie Myéloïde Chronique (LMC) a été établi.

Ce kit utilise un jeu d'amorces et des sonde d'hydrolyses marquées, une sonde marquée FAM pour détecter et quantifier la présence du transcrit de fusion BCR-ABL et une sonde marquée VIC pour détecter et quantifier l'amplification d'ABL comme contrôle interne. Cela permet au kit d'utiliser la quantification comparative (méthode Pfaffl) pour déterminer les ratios gène cible /gène de référence, sans recourir à la réalisation d'une gamme de standards avec un nombre de copies connu.

Ce kit a été formulé pour réaliser avec une haute reproductibilité, la synthèse d'ADNc premier brin suivie d'une PCR en temps réel, dans un seul tube.

Protocole :

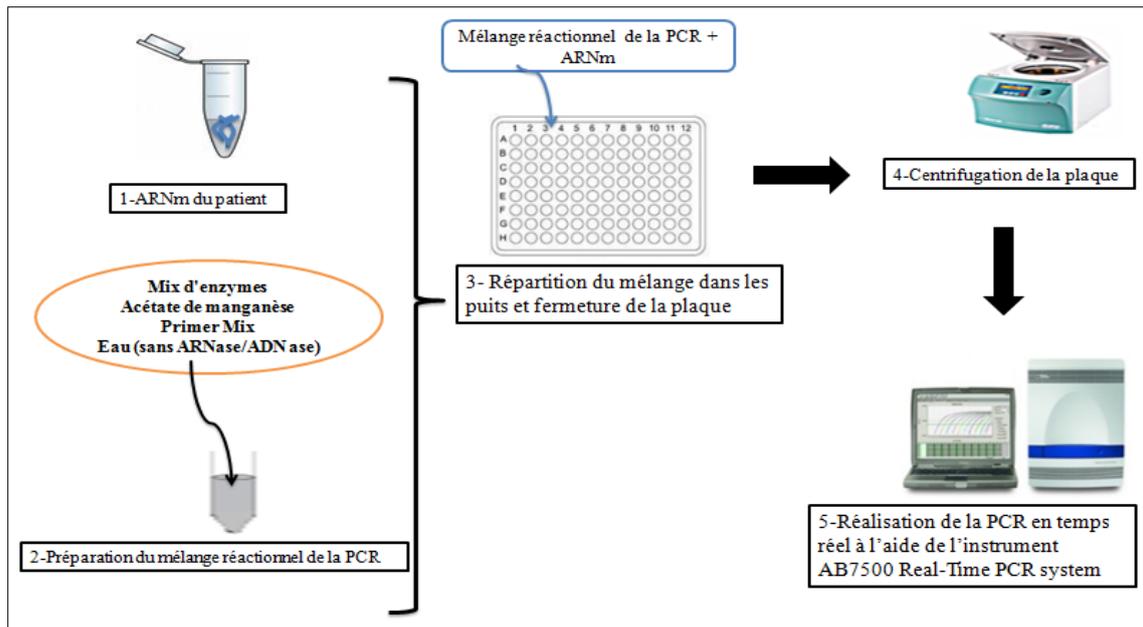


Figure 19 : Schéma résumé de la PCR en temps réel quantitative.

Avant de procéder à cette étape la surface de travail et l'équipement qui devront être utilisés dans la zone ont été nettoyés et décontaminés par l'éthanol 70%.

On doit retirer les réactifs de leur lieu de conservation, on les Centrifuge pendant 10 s à 2 000 rpm.

Un mélange réactionnel pour plusieurs échantillons (y compris les contrôles positifs et négatifs) doit être pré-mélangé en Master mix.

Le Master mix est préparé pour un nombre d'échantillons n en duplicata, il contient les composants suivants :

Réactifs	Volume
Mix d'enzymes	4 μ l x n x 2
Acétate de manganèse	0,8 μ l x n x 2
Primer Mix	3 μ l x n x 2
Eau (sans ARNase/ADNase)	7,2 μ l x n x 2

Tableau 10 : Mélange réactionnel de la PCR en temps réel quantitative.

***Le Primer mix** : contient les dNTP, les sondes et les amorces pour les transcrits de fusion BCR-ABL et pour le gène contrôle ABL.

On vortex le mélange et on le centrifuge 10 s à 2 000 rpm à température ambiante ensuite on dépose 15µl du Master mix par puits.

On ajoute dans les puits de réaction correspondants (Figure16) 5µl de :

- Contrôle positif (PC) : le mix de contrôles positifs est un mélange de séquences ARN synthétiques de BCR-ABL et ABL.
- Contrôle négatif (NTC) : l'eau.
- L'ARNm du patient (S).

On ajoute 5µl de control positif (PC), l'eau (NTC), et l'échantillon (S) dans les puits de réaction correspondants. (Figure16)

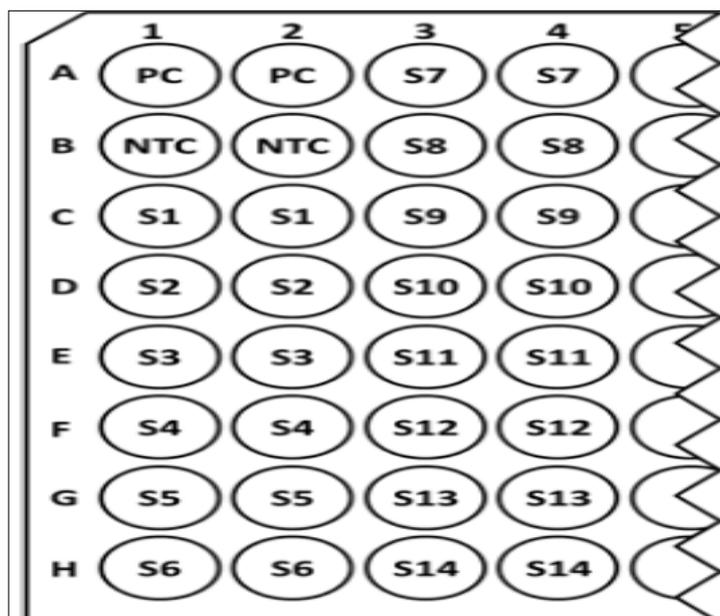


Figure 20 : Schéma d'une plaque 96-puits partielle chargée en duplicata.

On mélange par aspiration/refoulement à la pipette plusieurs fois, ensuite on scelle la plaque

avec le film optique adhésif, et on Centrifuge brièvement pour faire descendre les gouttelettes des parois.

On place la plaque dans l'instrument Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System.

Lecture et interprétation :

✓ Résultats qualitative :

Les résultats sont représentés sous forme d'une courbe d'amplification où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles.

- **Résultats BCR-ABL négative** : aucune amplification n'a été détectée ce qui signifie l'absence de gène cible BCR-ABL
- **Résultats BCR-ABL positive** : se traduit par une courbe d'amplification de gène cible. Cette amplification sera visualisé dès le 20^{ème} cycle.
- **Résultats du contrôle interne ABL** : le gène ABL est toujours amplifié autant que gène de référence exprimé dans la cellule normal.

Pour illustrer ces différents résultats, nous allons représenter un exemple de patient Bcr-ABL⁺ et un exemple Bcr-ABL⁻.

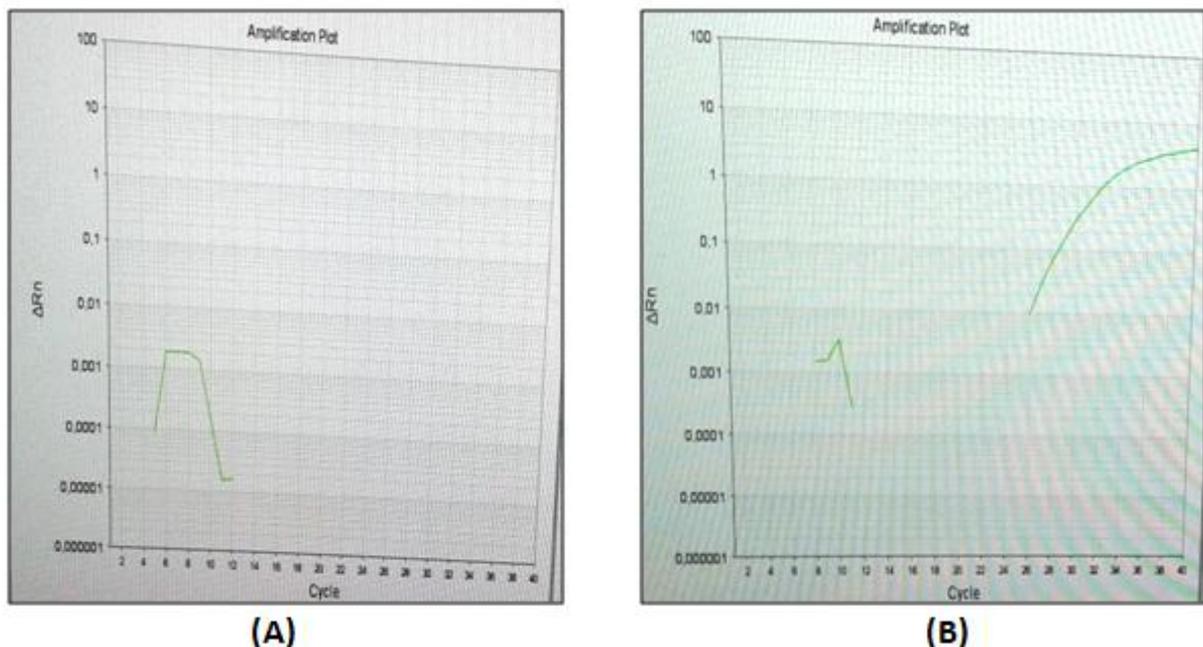


Figure 21 : Le suivi en temps réel d'une réaction PCR (patient BCR-ABL⁻)

(A) : BCR-ABL, (B):ABL

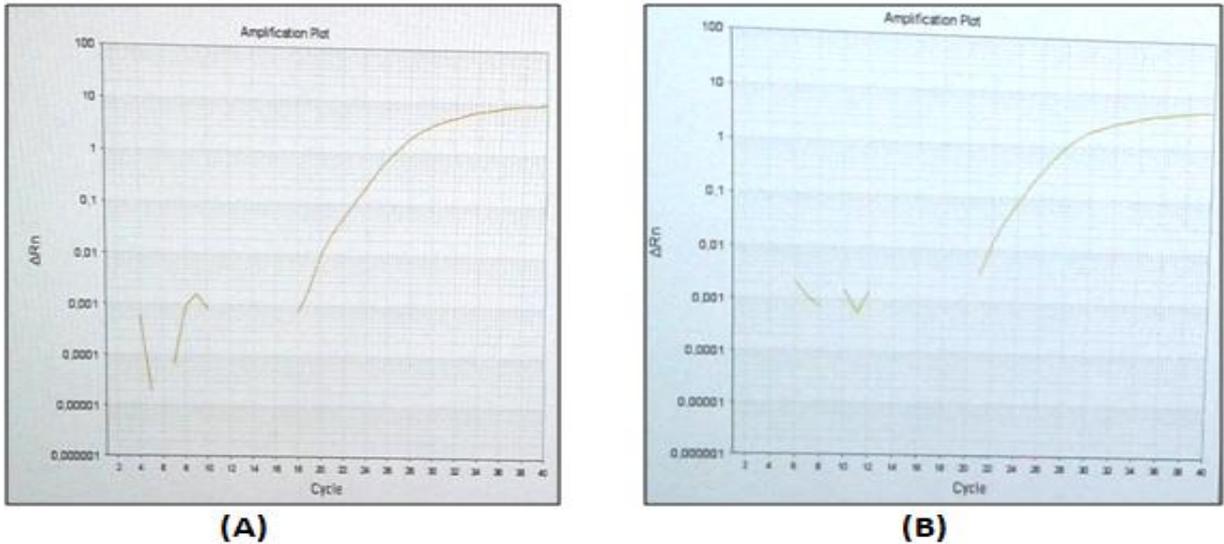


Figure 22 : Le suivi en temps réel d'une réaction PCR (patient BCR-ABL⁺)
 (A) : BCR-ABL, (B):ABL

Résultats quantitative :

- **la quantification comparative (méthode Pfaffl) :**

Le kit qu'on a utilisé pour la quantification est basé sur « la méthode de pfaffl » qui est un nouveau modèle mathématique a été présenté pour déterminer la quantification relative d'un gène cible par rapport à un gène de référence.

Le ratio d'expression relative est calculé uniquement à partir de l'efficacité (E) de PCR en temps réel et de la différence entre le Ct obtenues à partir des courbes d'amplification du gène cible et celui d'un gène de référence, (méthode du ΔCt).

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta CP_{\text{target}} (MEAN \text{ control} - MEAN \text{ sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta CP_{\text{ref}} (MEAN \text{ control} - MEAN \text{ sample})}}$$

E= l'efficacité de l'amplification

CP_{target} = Moyenne des Ct MBcr du PC - moyenne des Ct MBcr de l'échantillon

CP_{ref} = Moyenne des Ct ABL du PC - moyenne des Ct ABL de l'échantillon [70].

Calcul de ratio BCR-ABL/ABL % :

Les cycles seuils obtenus à partir des courbes d'amplifications (**Figure23**) sont utilisés pour calculer les moyenne de cycle seuil (CP) par le logiciel SDS version 2.0 et ultérieure.

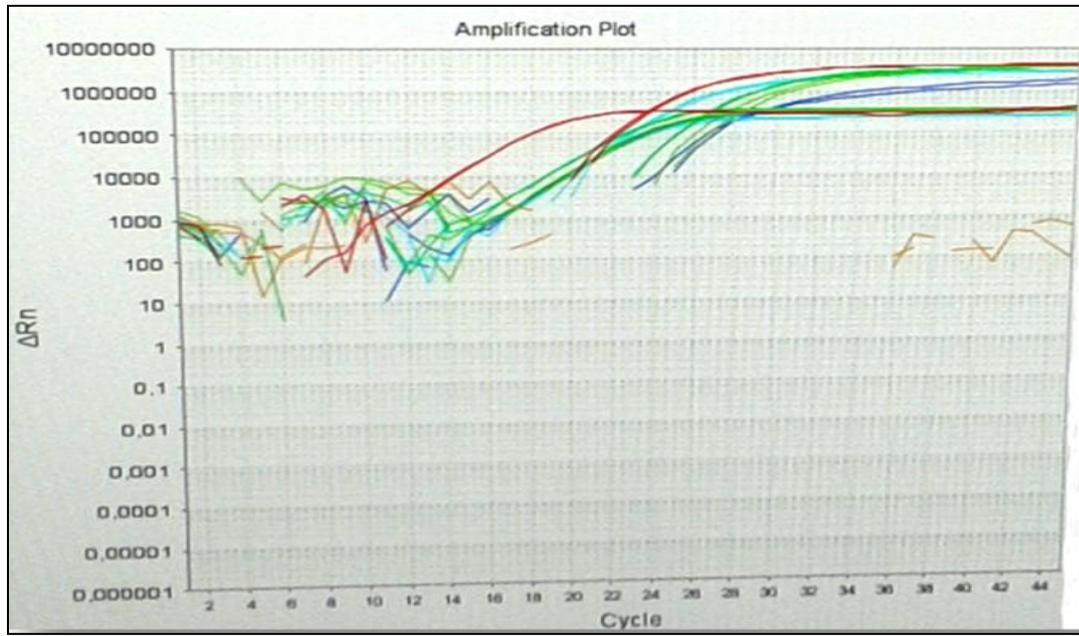


Figure 23 : les courbes d'amplifications

Nous avons calculé le ratio BCR-ABL/ABL pour chaque échantillon avec Microsoft Excel (Voir annexe 2b) en utilisant la formule précédente.

Afin d'obtenir des données comparables d'un laboratoire à l'autre, les résultats sont désormais exprimés selon une échelle internationale (IS pour international scale) grâce à des facteurs de conversion (FC) propres à chaque laboratoire.

Le ratio obtenu est multiplié par le facteur de conversion (CF) indiqué sur la notice spécifique pour chaque lot de contrôle positif utilisé dans la série, ensuite est multiplié par 100 afin d'obtenir le % ratio (**voir annexe 2b**).

III. Résultats

1. Caractéristiques démographiques de la population étudiée

1-1. Répartition des patients selon leur sexe :

Dans notre série, les 40 patients au moment du diagnostic se répartissent en 17 femmes et 23 hommes, soit un sexe ratio H/F de 1,35.

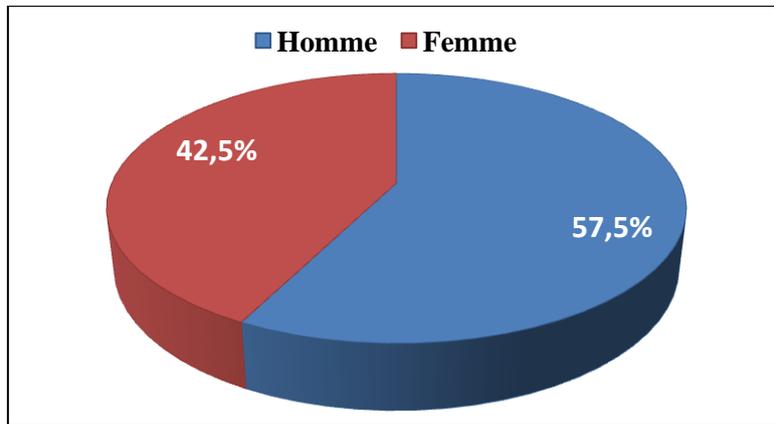


Figure24: Répartition des patients selon le sexe

1-2. La répartition des patients selon l'âge :

L'âge de nos patients au moment du diagnostic allait de 11 à 95 ans avec un âge moyen de 45.75 ans.

Nous avons effectué une répartition des malades selon 5 classes d'âge, la répartition selon les tranches d'âge retrouve un pic de fréquence dans la tranche allant de 20 à 40 ans.

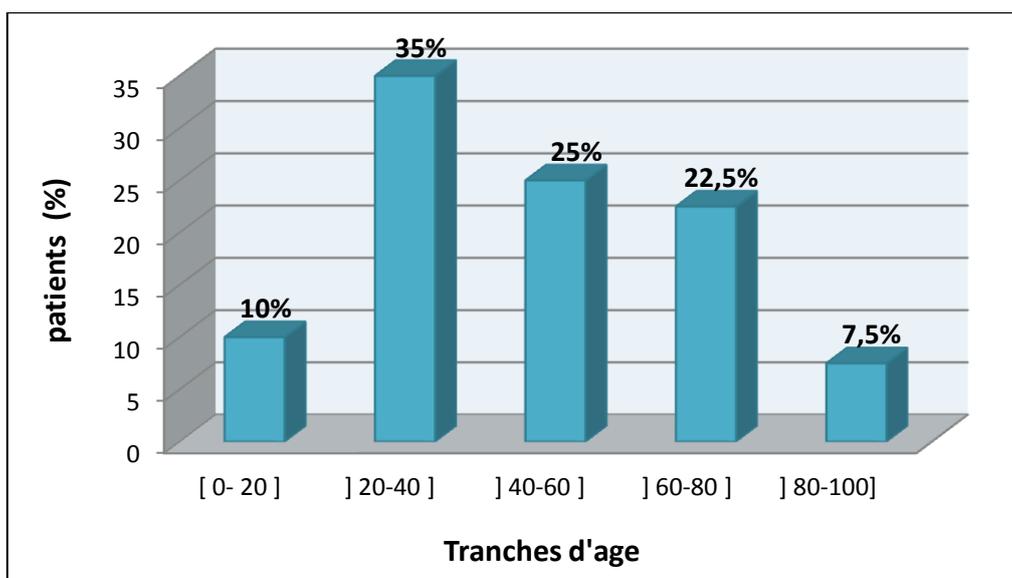


Figure 25: Histogramme montrant la répartition des patients en fonction de l'âge

2. Caractéristiques clinico-biologiques au moment du diagnostic :

2-1. Répartition des patients selon les données cliniques :

La splénomégalie, la pâleur et l'apyrexie étaient les motifs de consultation les plus élevés.

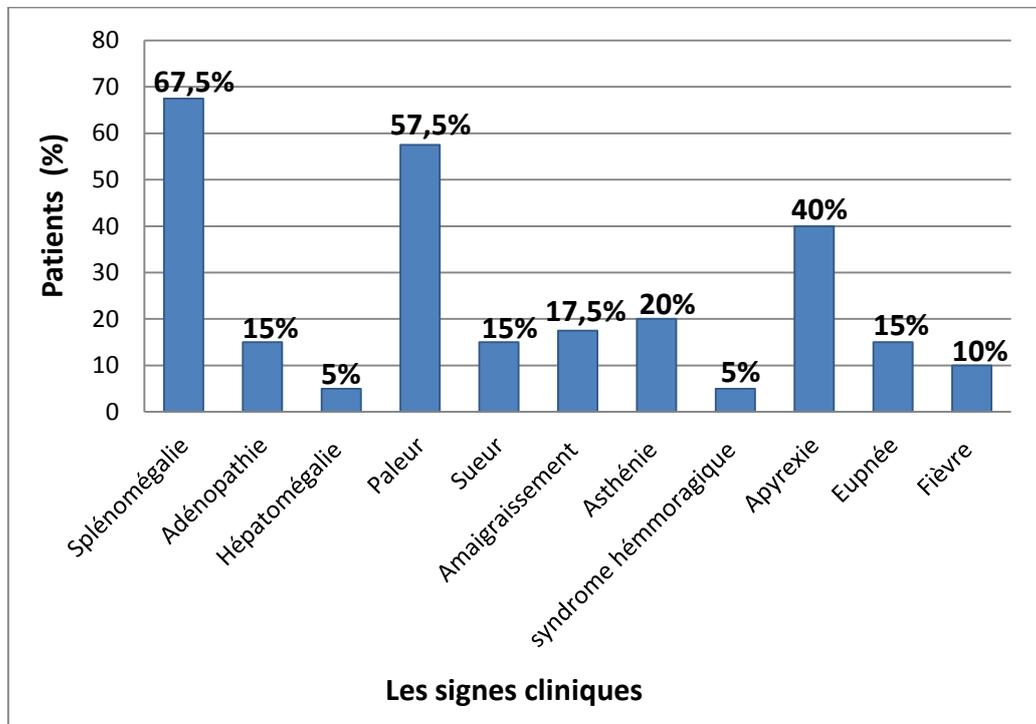


Figure26 : Distribution des patients selon les signes cliniques.

2-2. Répartition des patients selon les données biologiques :

A-Distribution des patients en fonction des données de l'hémogramme :

L'hémogramme a été pratiqué chez tous les malades de notre série, c'est l'examen le plus important car il permet à lui seul d'évoquer le diagnostic de la LMC.

Une hyperleucocytose, une anémie et une thrombocytose sont les anomalies sanguines les plus souvent rencontrées.

➤ L'hyperleucocytose:

Le taux des GB varie entre 950 élément/mm³ et 530650 élément/mm³ avec une moyenne de 164993,33/mm³ au diagnostic.

La plupart des patients (52,5%) avaient un taux d'hyperleucocytose compris entre 100.000 et 400.000 élément/mm³.

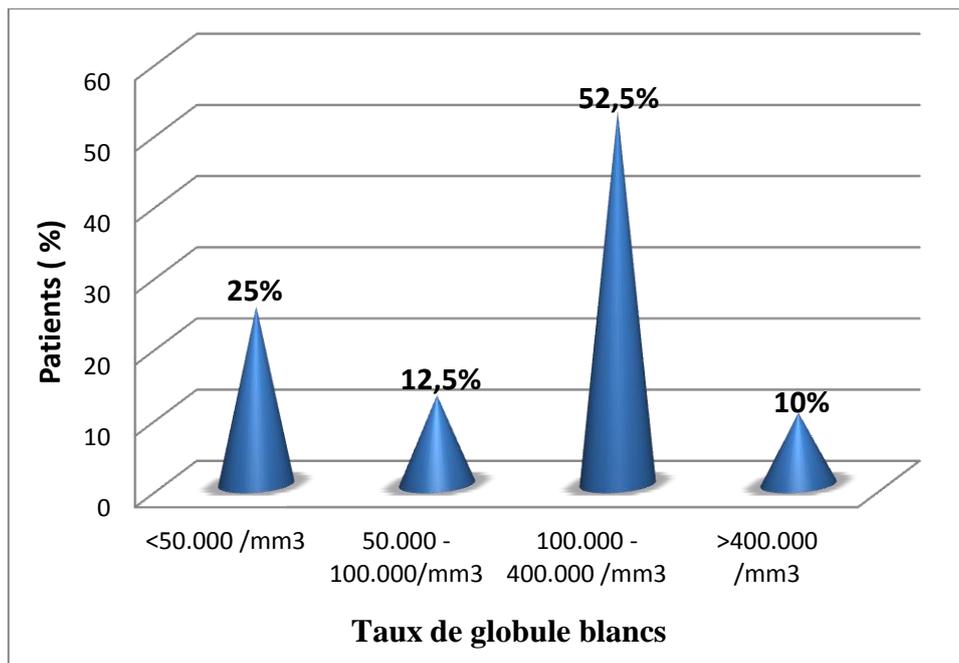


Figure 27: Répartition des patients en fonction de taux de globule blanc

➤ **Anémie :**

La valeur moyenne de HGB est de : 10 ,44 g/dl avec des extrêmes allant de 5,8g/dl à 20,8g/dl. L'analyse de nos résultats montre que 72,5% de nos malades ont une anémie comprise entre 5,8 et 11,3 g/dl.

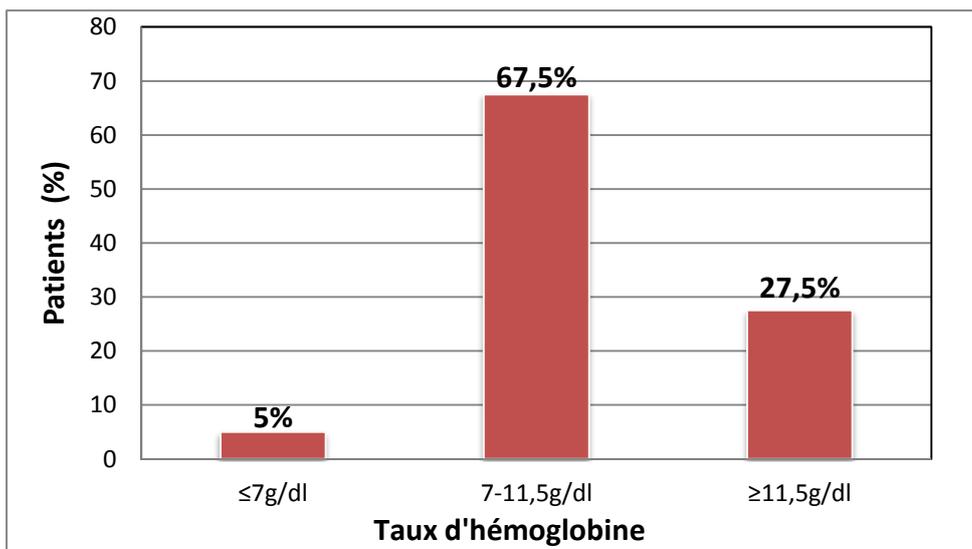


Figure28: Distribution des patients en fonction de taux d'hémoglobine.

➤ **Les plaquettes :**

Les taux des plaquettes varient entre 13000 éléments/mm³ et 1080000 éléments/mm³ chez les patients de notre série. D'après l'analyse de taux de plaquette 27,5% les patient ont un taux normal compris entre 130.000 et 400.000 élément /mm³, 30 % ont une thrombopénie et 42,5% ont une thrombocytose.

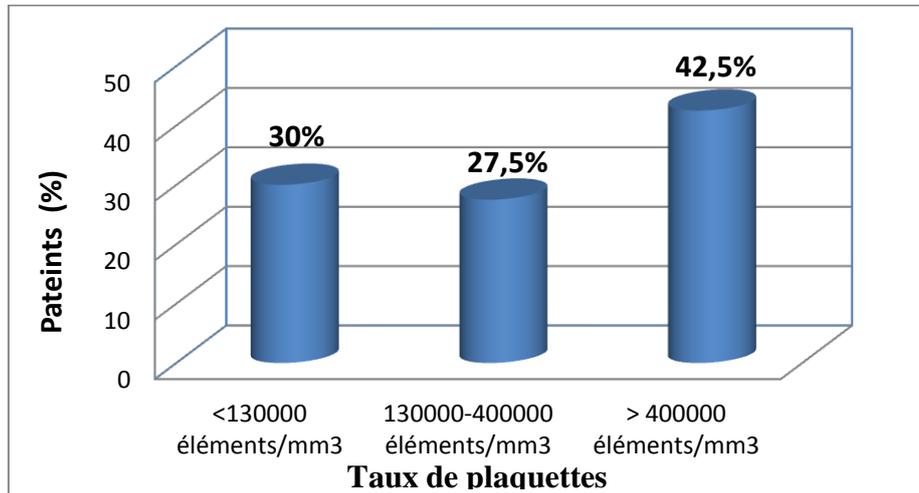


Figure29 : Distribution des patients en fonction de taux de plaquette

B- Distribution des patients en fonction des données du frottis sanguin :

➤ **Taux de blaste :**

Le taux des blastes varie de 0 à 48 % avec une moyenne de 9,14 %, la plus part des patients avaient un taux comprise entre 0 et 10 %.

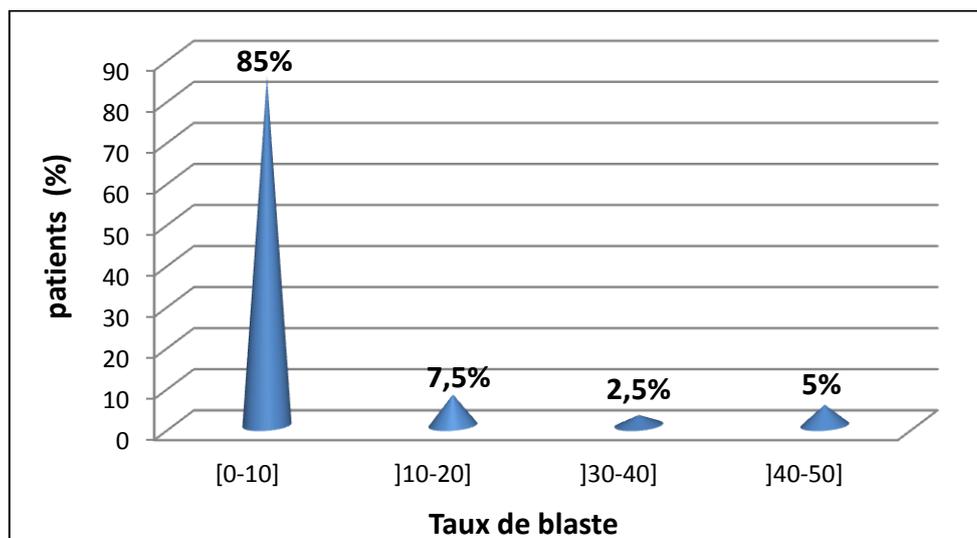


Figure30 : Histogramme montrant la distribution des patients en fonction de taux de blaste.

➤ La Myélémie :

L'examen de frottis sanguin montre la présence de cellules granuleuse immatures circulantes (la myélémie), le taux de cette dernière était compris entre 17 et 97 %. La majorité de nos patients (80%) avaient un taux entre 0 et 40 %

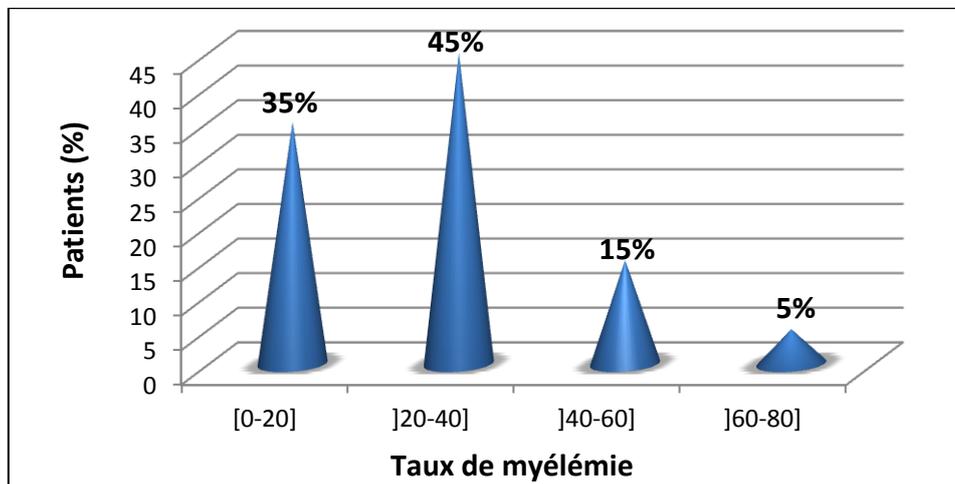


Figure 31: La distribution des patients en fonction de taux de myélémie.

3. Recherche du transcrit BCR-ABL par PCR en temps réel

La recherche du transcrit BCR-ABL par la RT-PCR qualitative a montré que sur les 40 cas reçus pour suspicion de LMC, 28 patients, soit 70%, sont avérés positifs.

Dans ce cas, on laisse tomber les 12 patients négatifs (30 %) et on étudie seulement les 28 patients positifs (70%).

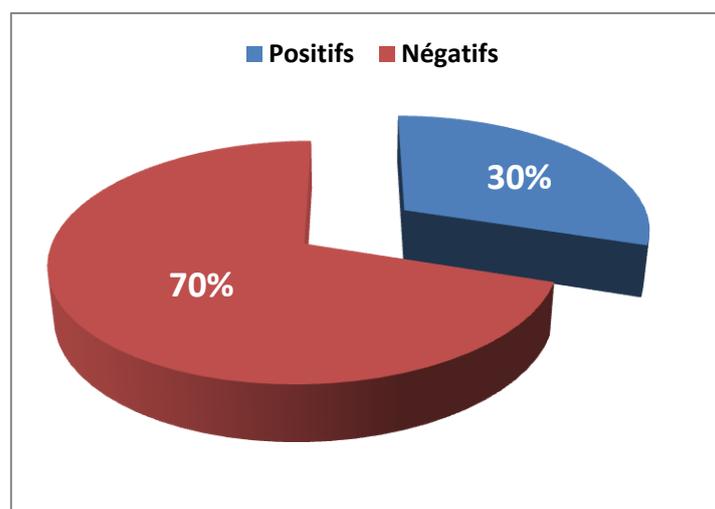


Figure 32: Pourcentage des cas positifs et négatifs pour LMC

3-1. Répartition des patients selon leur sexe :

Sur les 28 cas positifs nous avons noté une prédominance masculine. En effet, 64,3 % de nos patients (18/40) étaient de sexe masculin alors que 35,7 % (10/40) étaient de sexe féminin, soit un sex-ratio H/F de 1,8.

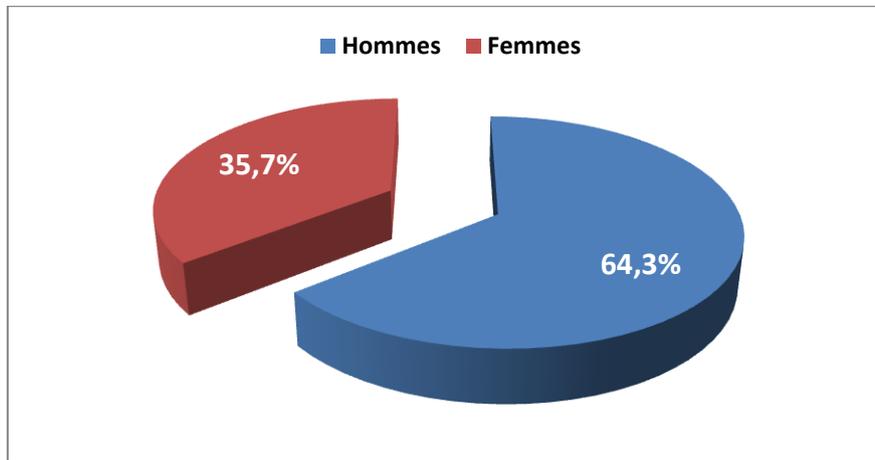


Figure 33: Répartition des patients atteints de LMC selon le sexe.

3-2. Répartition des patients par tranches d'âge :

L'âge des patients varie entre 11 et 81 ans avec une moyenne de 41,54 ans. Nous avons identifié 5 tranches d'âges dont la fréquence de survenue de LMC est variable.

La survenue était plus élevée chez les sujets âgés de 20 à 40 ans avec une fréquence de 39,3 %.

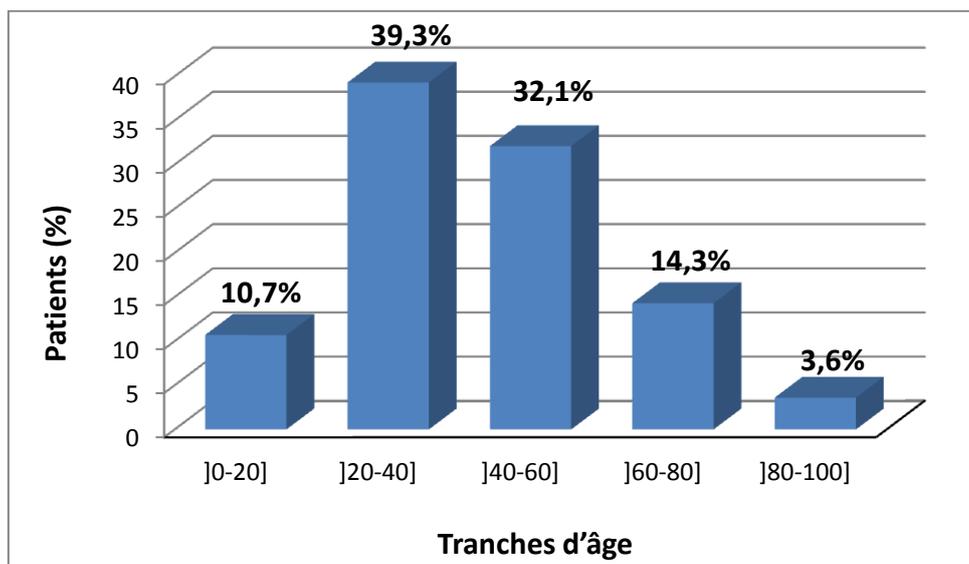


Figure 34 : Répartition des patients atteints de LMC selon les tranches d'âge.

3-3. Répartition de nos patients selon l'âge et le sexe.

On constate une prédominance masculine dans la plus part des tranches d'âge.

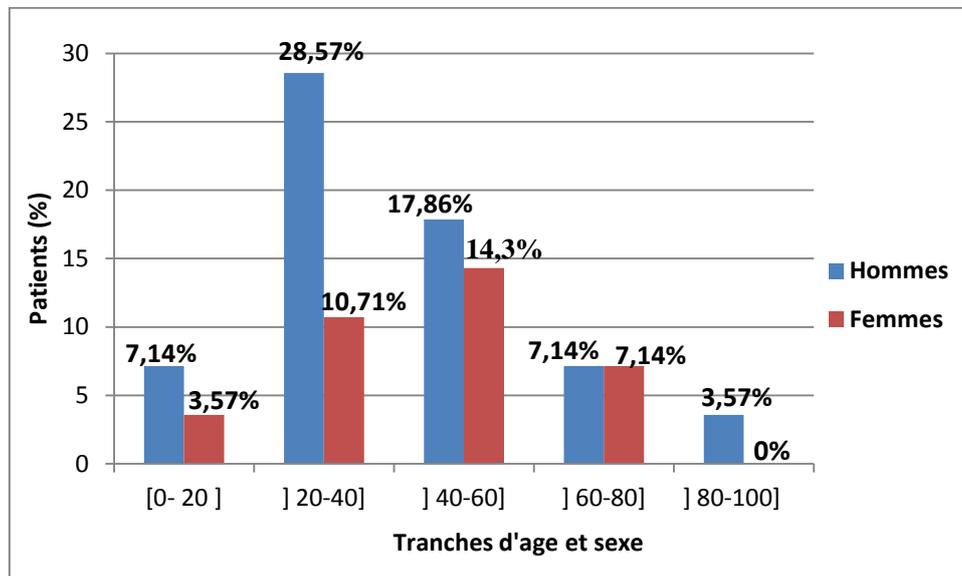


Figure35 : Répartition des patients atteints de LMC selon les tranches d'âge et le sexe.

4. Caractéristiques clinico-biologiques :

4-1. Répartition des patients selon les données cliniques :

Les principaux signes cliniques		Patients (%)
Syndrome tumoral	Splénomégalie	75
	Adénopathie	10,71
	Hépatomégalie	0
Syndrome anémique	Pâleur	57,14
Syndrome infectieux	Fièvre	7,14
Syndrome hémorragique		0
Altération de l'état général	Amaigrissement	21,43
	Asthénie	25
Autres signes cliniques	Sueur	14,29
	Apyrexie	35,71
	Eupnée	21,43

Tableau 11 : principaux signes cliniques retrouvés chez patients atteints de LMC

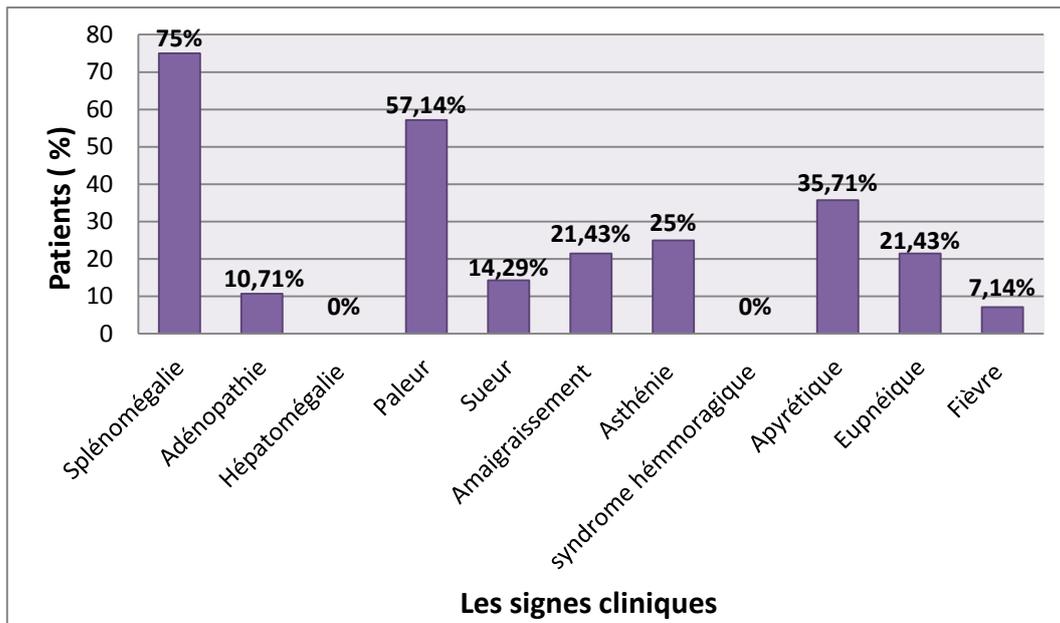


Figure36 : Histogramme présentant la fréquence des signes cliniques de la LMC

4-2. Distribution des patients selon les signes biologiques :

A- Distribution des patients en fonction des données de l'hémogramme.

➤ L'hyperleucocytose :

Dans notre série l'hyperleucocytose a été une anomalie observée chez tous les patients, le taux moyenne de globules blancs était de $202787,78 /\text{mm}^3$ avec des extrêmes allant de $24810 /\text{mm}^3$ et $530650 /\text{mm}^3$. On a observé que chez la majorité des patients soit $67,86\%$ avaient un taux de leucocytes compris entre à $100.000/\text{mm}^3$ et $400.000/\text{mm}^3$ au moment du diagnostic.

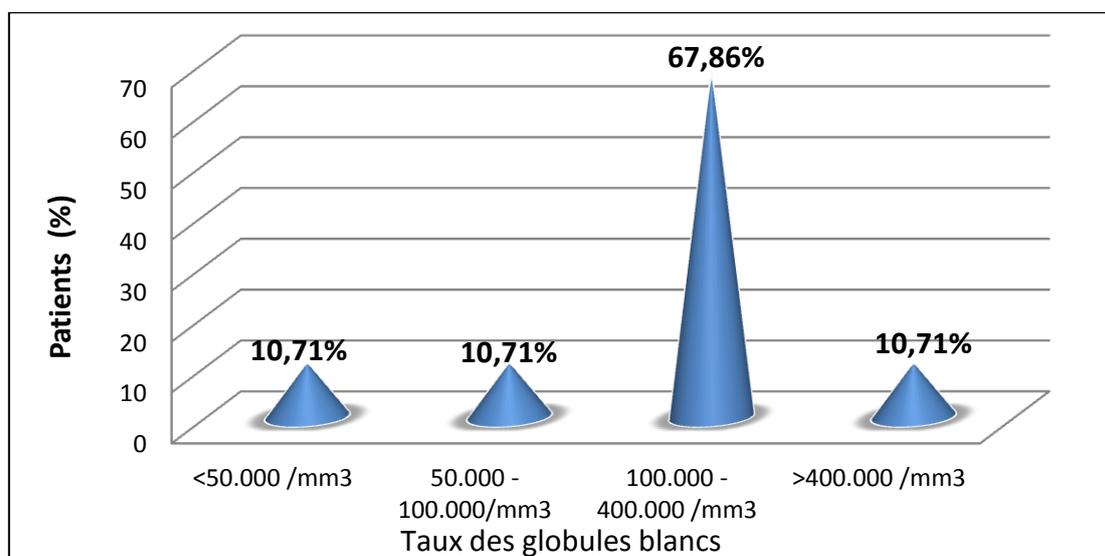


Figure37 : Histogramme montrant le taux de globules blancs chez les sujets atteints de LMC

➤ **Anémie :**

Chez nos patients, la valeur moyenne de HGB est de 10,29 g/dl avec des extrêmes allant de 6,9g/dl à 15,4g/dl. L'analyse du taux d'hémoglobine permet de constater que 21 de nos malades soit 75% ont une anémie et leur taux d'hémoglobine est compris entre 6.9 - 11.3/dl, alors que 25% des patients avaient un taux d'hémoglobine normale entre 11,6 et 15,4 g/dl.

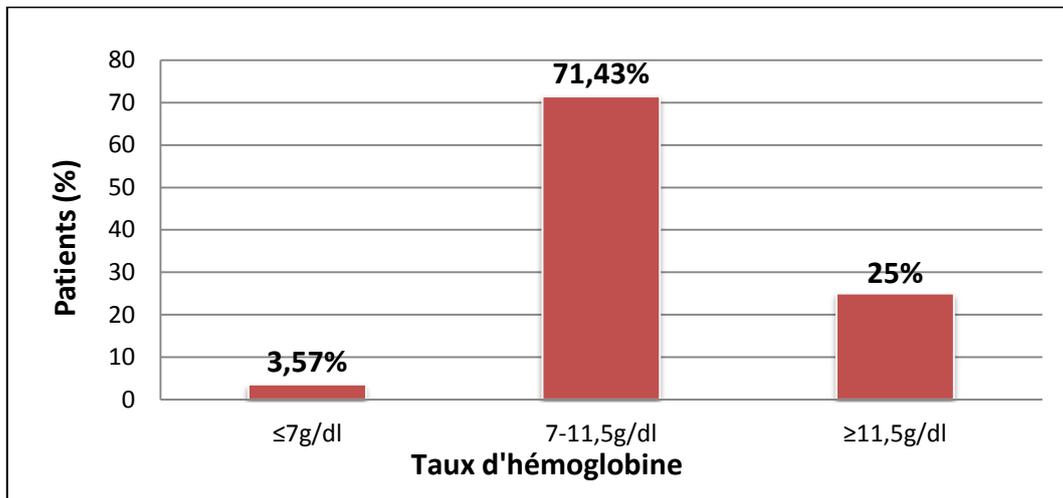


Figure 38: Histogramme représentant le taux d'hémoglobine chez les sujets atteints de LMC.

➤ **Les plaquettes :**

Le taux de plaquette était très variable allant de 91000 / mm³ à 974000 /mm³, avec un taux moyenne de 427571,43/ mm³. L'analyse de taux d'hémoglobine permet de constater que 11 de nos patients soit 39,29% avaient un taux de plaquette normal, 5 patients soit 17,86 % avaient une thrombopénie et 12 patients soit 42,86% avaient une thrombocytose.

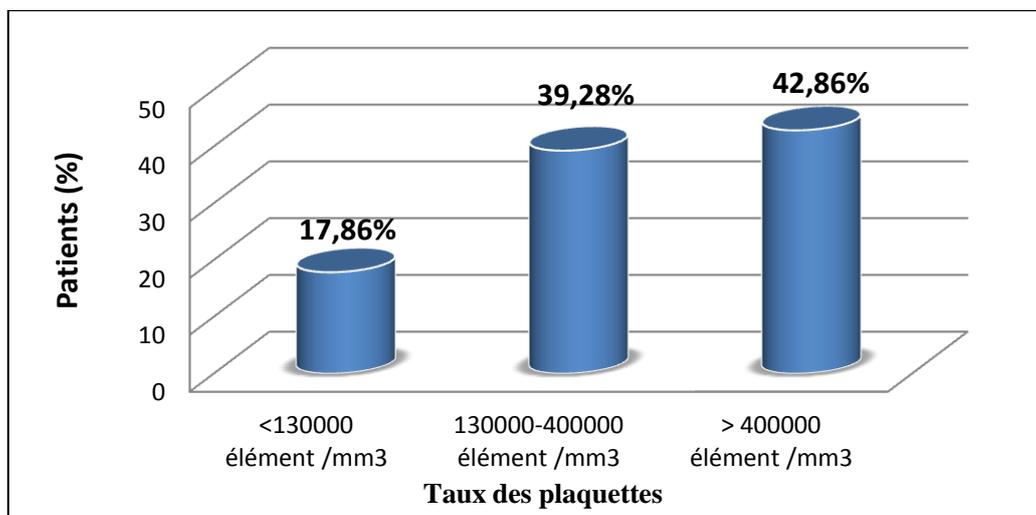


Figure 39: Histogramme montrant le taux des plaquettes chez les sujets atteints de LMC

B-Distribution des patients en fonction des données du frottis sanguin :

✓ les blastes :

Chez nos patients le taux de blastes est compris entre 0 et 11, la majorité des malades (92.86 %) avaient un taux inférieure à 10 %.

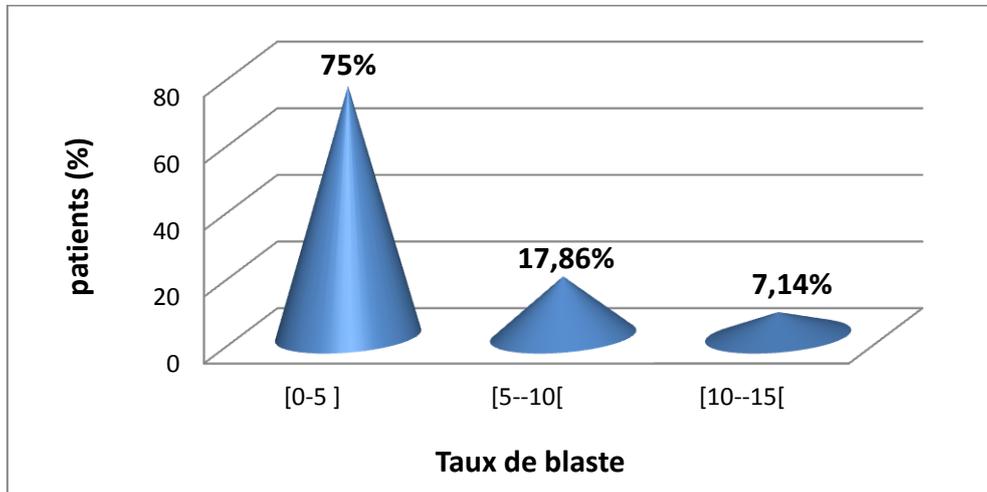


Figure40 : Histogramme représentant le taux des blastes chez les sujets atteints de LMC

✓ la myélémie :

L'examen de frottis sanguin montre un taux de myélémie compris entre 17 et 68 % avec une moyenne de 35,86 %. La majorité de nos patients avaient un taux supérieur à 20 %, la tranche la plus touchée est comprise entre 20 et 40 %.

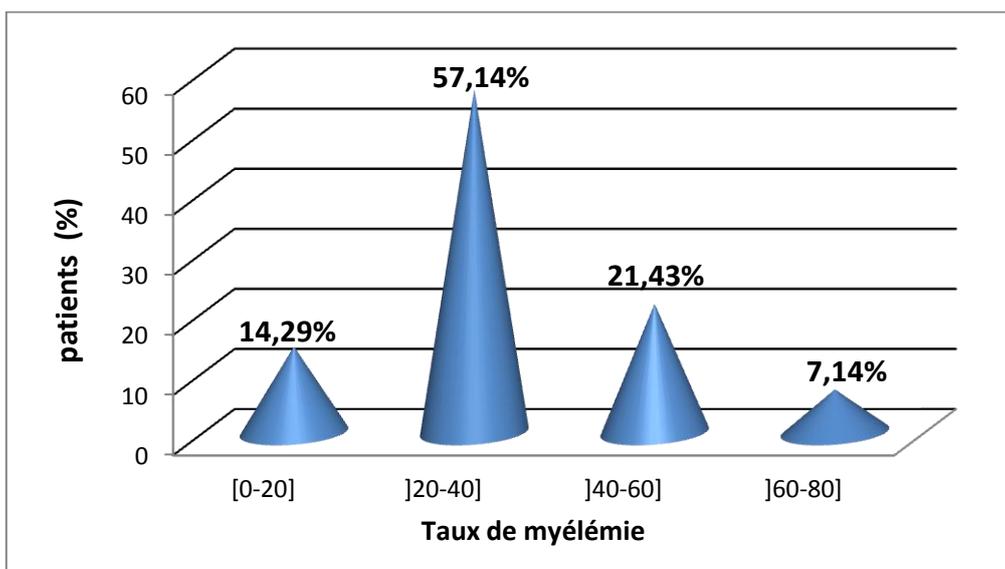


Figure 41: Histogramme montrant le taux de myélémie chez les sujets atteints de MC

5. Résultats de suivi :

Le suivi par la PCR en temps réel quantitative a permis de répartir les patients en trois groupes, selon le taux du ratio BCR-ABL :

✓ **Premier groupe : bonne réponse au traitement**

1^{er} cas :

- Initial: BY
- Sexe : féminin
- Age: 65 ans
- Signes clinico-biologiques : apyrexie, thrombocytose, hyperleucocytose.

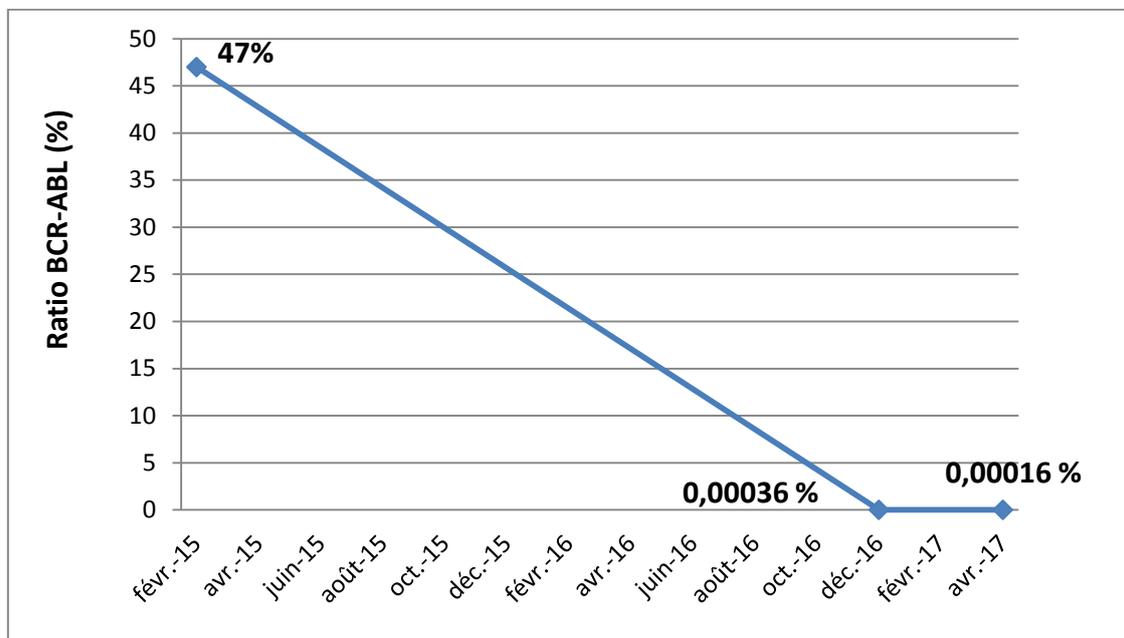


Figure 42 : Diagramme de suivi moléculaire du patient N°1

Au moment de diagnostic, les résultats de la recherche du transcrite BCR-ABL P 210 étaient positifs avec un taux de 47 %.

D'après la cinétique de la maladie, le traitement a permis de diminuer le taux du ratio BCR-ABL et d'obtenir une rémission moléculaire profonde (RM5) après chaque suivi.

2^{ème} cas :

- Initiale : MA
- Sexe : masculin
- Age : 19 ans
- Signes clinico-biologiques : splénomégalie, adénopathie, apyrexie, hyperleucocytose, anémie, thrombocytose.

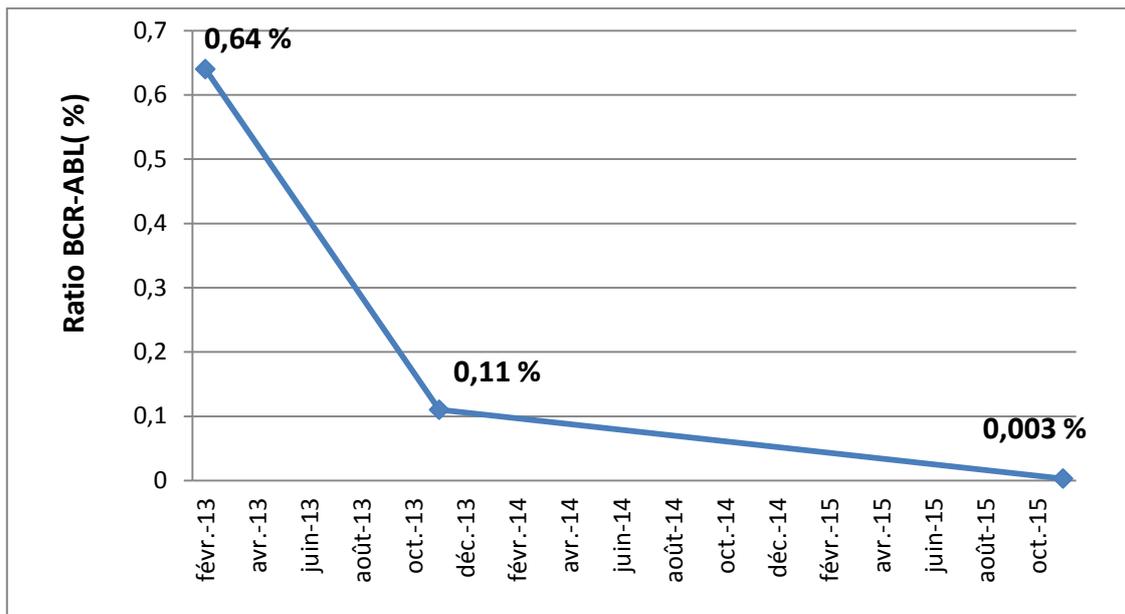


Figure 43 : Diagramme de suivi moléculaire du patient N°2

Le patient a été diagnostiqué en février 2013, dont le taux de transcrit BCR-ABL P210 était de 0.64 %. Après le traitement, le taux du ratio BCR-ABL passe de 0.64% à 0,11 % et continue à diminuer jusqu'à une réponse moléculaire profonde RM4,5 (0,003%).

✓ Deuxième Groupe : échec thérapeutique

1^{er} cas :

- Initial : MF
- Sexe : féminin
- Age : 28 ans
- Signes clinico-biologiques : splénomégalie, pâleur, hyperleucocytose, anémie, thrombocytose.

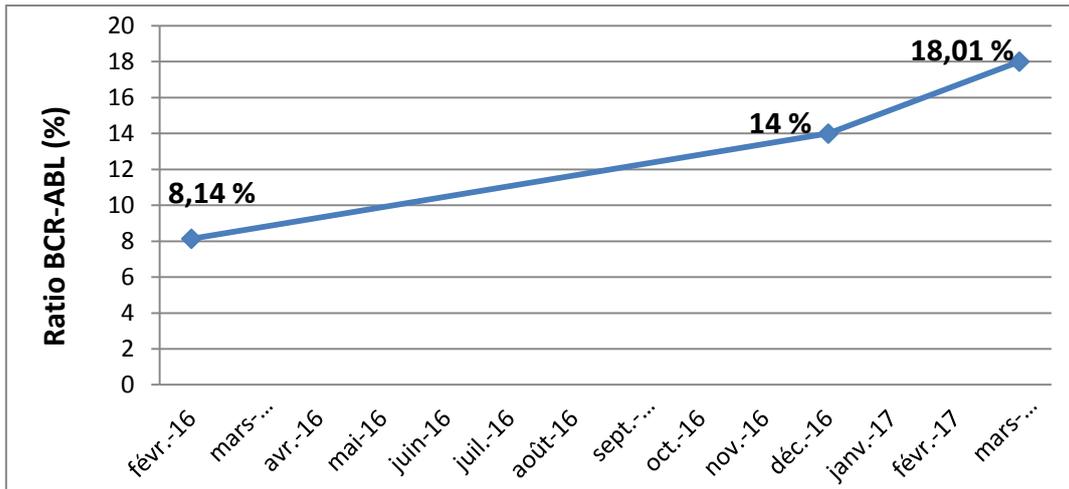


Figure 44 : Diagramme de suivi moléculaire du patient N°3

Le taux de transcrit BCR-ABL P210 au moment de diagnostic était de 8,14 %. D'après les points de suivi, le traitement n'a pas permis d'obtenir une rémission moléculaire, le taux de transcrit passe de 8,14 % à 18,01%, on parle d'un échec thérapeutique.

2^{eme} cas :

- Initial : CK
- Sexe : masculin
- Age : 14 ans
- Signes clinico-biologiques : splénomégalie, asthénie, hyperleucocytose, anémie, thrombocytose.

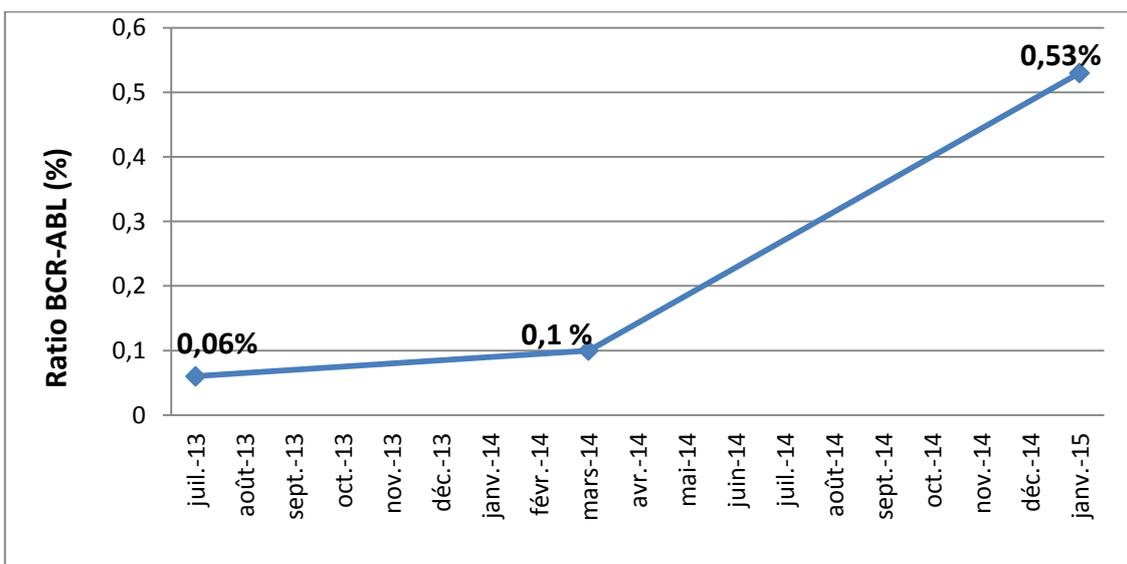


Figure 45 : Diagramme de suivi moléculaire du patient N°4

Le patient a été diagnostiqué en juillet 2013, les résultats de la recherche du transcrit BCR-ABL P 210 étaient positifs avec un taux de 0,06 %.

D'après le graphe, le taux de transcrit augmente après chaque contrôle, ce qui signifie que le patient n'a pas répondu au traitement et n'avait pas bénéficié de la thérapie dès le diagnostic.

✓ **Troisième groupe : Rechute**

1^{er} cas :

- Initial: CM
- Sexe : féminin
- Age: 44 ans
- Signes clinico-biologiques : splénomégalie, hyperleucocytose, anémie, thrombocytose.

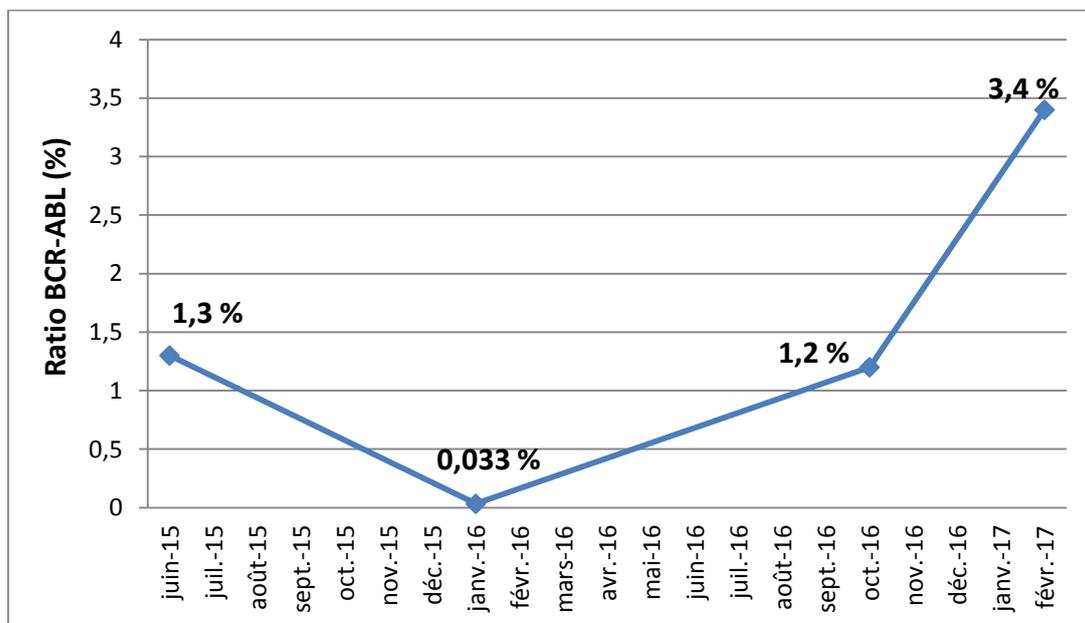


Figure 46 : Diagramme de suivi moléculaire du patient N°5

Le patient a été diagnostiqué en juin 2015, la PCR en temps réel mis en évidence la présence de transcrit BCR-ABL avec un taux de 1,3 %.

Selon les résultats de suivi, le patient a répondu au traitement au début, il était en réponse moléculaire majeure (RMM) dont le taux diminue de 1,3 % à 0,033%, mais au cours du temps on a constaté une rechute moléculaire, le taux du transcrit a augmenté pour atteindre une valeur de 1,2% puis 3,4%.

2^{ème} cas :

- Initial : DA
- Sexe : féminin
- Age : 58 ans
- Signes clinico-biologiques : splénomégalie, asthénie, hyperleucocytose, anémie, thrombopénie

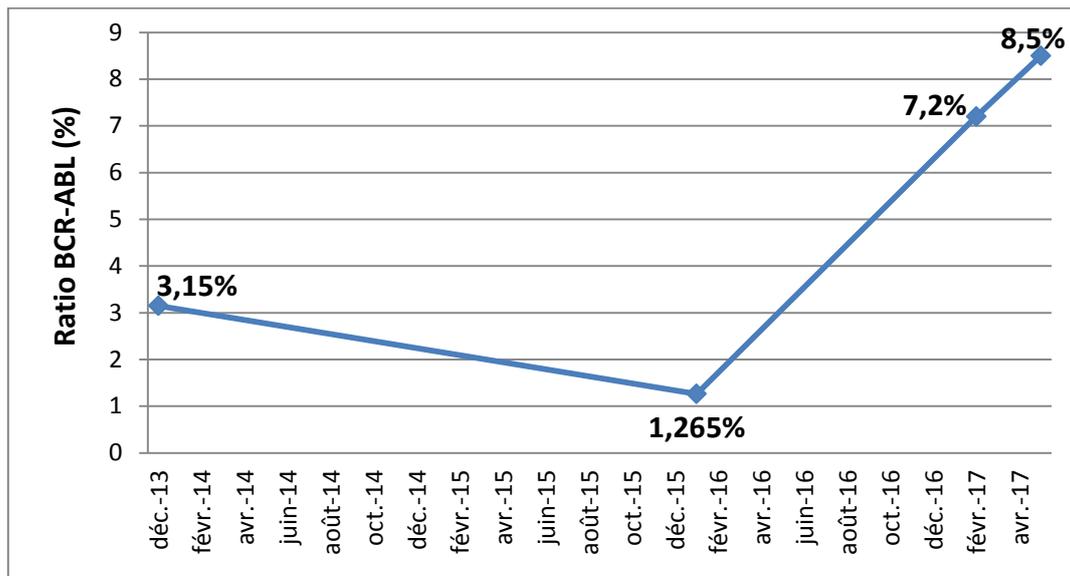


Figure 47: Diagramme de suivi moléculaire du patient N°6

Au moment de diagnostic, les résultats de la recherche du transcrite BCR-ABL P 210 étaient positifs avec un taux de 3,15 %.

Le suivi moléculaire a permis de marquer une rechute. Le patient a répondu au traitement au début dont le taux diminue de 3,15 % à 1,265 %, mais au cours du temps on a constaté une augmentation considérable dont la valeur passe de 1,265 % à 8,5 %

IV. Discussion :

La leucémie myéloïde chronique est un syndrome myéloprolifératif clonal à prédominance granuleuse, caractérisé par la présence d'une anomalie génétique unique et acquise : chromosome Philadelphie (Ph).

Le diagnostic moléculaire de la leucémie myéloïde chronique repose sur la PCR en temps réel qui permet de détecter avec une extrême sensibilité l'ARN de fusion BCR-ABL.

L'objectif de notre étude est le diagnostic de la leucémie myéloïde chronique et le suivi des patients, en utilisant des techniques de la biologie moléculaire pour déterminer l'efficacité du traitement ou pour prédire la rechute. Elle a porté sur 40 sujets adressés au service d'immunologie avec suspicion de LMC (une splénomégalie, hyperleucocytose, présence des blastes et la myélémie).

Au moment de diagnostic la PCR en temps réel qualitative a détecté le transcrite BCR-ABL p210 chez 28 patients, soit 70 % du groupe.

Les autres patients, bien qu'ils ont les signes de la maladie, la RT-PCR qualitative n'a pas détecté le transcrite P210, ce résultats peut être expliqué d'une part par la présence d'un autre type de transcrits BCR-ABL (e1a2 ou e19a2) résultant des points de cassures situés au niveau de la région μ BCR ou la région m-BCR, ou bien qu'il ne s'agit pas d'une leucémie myéloïde chronique, étant donné que la LMC peut être plus difficile à distinguer des autres syndrome myéloprolifératifs, il est probable que ces patients soient atteints d'un autre syndrome myéloprolifératifs comme la thrombocytémie essentielle (TE) ou la myélofibrose primitive (MFP), car ces derniers sont caractérisés par des signes cliniques et biologiques similaires à ceux d'une leucémie myéloïde chronique tel que la splénomégalie, l'hyperleucocytose, hyperplaquétose, la présence de blastes ...etc, qu'on a trouvé chez ces patients. Dans ce cas un examen de recherche d'autres mutations est nécessaire.

Sur les 28 patients atteints de LMC en phase chronique, nous avons 18 (64.3 %) hommes et 10 (35.7%) femmes, on note une prédominance masculine avec un sexe-ratio H/F= 1,8.

Ce résultat concorde avec celui de K.djouadi-Lahlou [23] qui trouve une prédominance masculine avec sex-ratio de 1.01 et avec celui de Fares et al [71] qui rapporte un sex-ratio de 1.04.

Le sex- ratio de notre série se rapproche des résultats de Bade et al [72] qui estime un sex-ratio= 1.67, et des résultats de Guyader-Peyrou et al [73] qui rapporte un sexe ratio de 1,7.

La prédominance masculine a également été observée par Chemegni et al [74] et par KUEVIAKOE M. I et al [75] avec une sex-ratio respective de 1,18 et 1,42.

Par contre, les résultats sont opposés à une étude malienne, qui rapporte une prédominance masculine pour toutes les hémopathies malignes sauf pour la LMC qui était apparue plus fréquente chez les femmes que chez les hommes [76].

Le **tableau 15** illustre une comparaison entre les sexe- ratio dans différents pays.

Pays	sex-ratio H/F
Notre série (Alger)	1.8
Algérie	1.01
Maroc	1,04
France	1.7
Niger	1.67
Cameroun	1,18
Togo	1,42

Tableau 12: Comparaison de sex-ratio des différentes séries rapportées

La réponse à la question de l'appartenance à un sexe comme facteur de risque pour la survenue de la LMC mérite d'être mieux explorée, car elle permettrait une meilleure compréhension de la maladie.

L'âge moyen de notre population d'étude était de 41,54 ans ce qui fait de la LMC une affection de l'adulte jeune, mais elle peut se voir dans toutes les tranches d'âge. Nous avons comparé nos résultats avec ceux d'autres séries (**Tableau 16**).

Les séries	Age moyen au diagnostic	Tranche d'âge la plus touchée
K.djouadi–Lahlou (Algérie) [23]	43.5	36 – 45
Fares (Maroc) [71]	43	36- 45
Guyader-Peyrou et al(France) [73]	63	Non signalé
Bade et al(Niger) [72]	49	Non signalé
Notre série	41,54	20– 40

Tableau 13 : Comparaison d'âge des différentes séries rapportées.

Nos résultats concordent avec ceux des séries Algérienne 2010 et Marocaine 2015 contrairement à la série Française et Nigérienne.

Cette différence peut être expliquée par le caractère jeune des populations Marocaine et Algérienne.

La répartition selon les tranches d'âge et le sexe retrouve une prédominance masculine dans la plus part des tranches d'âge, nos résultats concordent avec celui de K.djouadi–Lahlou [23] qui a trouvé une prédominance masculine dans les différentes tranches d'âge.

Sur le plan clinique, la splénomégalie est retrouvée dans la majorité des cas (75%) dans notre série, représentant ainsi un maître symptôme de la maladie.

Les résultats qu'on a trouvé sont proches de ceux obtenus par Chemegni et al [74] et Tea et al [77] qui avaient retrouvé respectivement 75,37 et 74% de cas de splénomégalie.

Cependant ils sont inférieurs à ceux retrouvés par KUEVIAKOE M. I et al [75] et MUKIIBI, J.M. et al [78] qui ont trouvé respectivement une proportion de 87,3 et % 86.7.

D'après Pr Sanhadji Kamel, les cellules leucémiques peuvent envahir d'autres organes comme les ganglions lymphatiques, la rate, le foie, les testicules ou le système nerveux central. [79].

Cette prolifération accrue de ces cellules leucémique au niveau de la rate explique l'augmentation de sa taille.

Sur le plant biologique, l'hémogramme a montré une hyperleucocytose chez tous les patients, le taux moyen de globules blanc est 202787,78 avec des extrêmes allant 24810 à 530650 élément /mm³, ceci concorde avec celui de KUEVIAKOE .M et al [75] qui trouvent une valeur moyenne de leucocytes' 204930 /mm³.

L'étude comparative de nos résultats aux données de la littérature de Burkina Faso [80], permet de noter que la leucocytose moyenne (243000/mm³) est légèrement supérieure à celle observée dans notre série, en outre on a observé que plus de 67,86% de cas ont un taux de GB entre 100.000/mm³ et 400.000/³ au moment du diagnostic, alors que ce taux de GB dépasse 400.000/mm³ dans 50% des cas dans la série Aghrbi [81].

Cette différence peut être expliquée par le diagnostic précoce de la maladie dans notre série.

Le nombre de plaquettes varie entre 91000 et 974000 élément /mm³ avec une moyenne de 427571,43 élément /mm³ chez nos patients, Sanogo en 2010[80], Mukiibi en 2008[81] et Segbena en 2012 [82] ont rapporté une moyenne respective de 360800, 443000 et 476760 élément /mm³.

Nous avons noté une thrombopénie dans 17.86 % des cas et une hyperplaquettose dans 42.86 % des cas, alors que 39.28% des cas avaient un taux de plaquettes normal, la thrombocytose est très fréquente dans notre série.

Nos résultats sont proches de ceux obtenus par Mukiibi et all [78] en 2008 qui ont observé une thrombocytose dans 44% des cas, un nombre de plaquette normal dans 42% des cas et une thrombopénie dans 14% des cas.

Selon nos résultats et les résultats de Mukiibi et all, nous partageons avec BROUSTET A. [84] l'idée selon laquelle le nombre de plaquettes est le plus souvent élevé ou normal, exceptionnellement diminué.

On peut expliquer la thrombocytose chez les patients par l'activation constitutive de la voie JAK/STAT qui est responsable de la production des mégacaryocytes, puisque cette voie JAK/STAT d'une part, elle est la voie responsable de la production des plaquettes et d'autre part, elle est l'une des trois voies déclenchées par le BCR-ABL.

Dans le cas normal le récepteur MPL exprimé par les mégacaryocytes et les plaquettes est présent à la membrane sous forme d'un homodimère inactif et c'est la liaison de la TPO (thrombopoïétine) qui entraîne une modification conformationnelle (démirisation du récepteur) permettant le rapprochement des deux protéines JAK et leur transphosphorylation. Le récepteur à l'tpo activé recrute également les protéines STAT en particulier 3 et 5, qui vont être phosphorylées par la protéine JAK2. Ces protéines STATs une fois phosphorylées vont s'hétérodimériser puis migrer dans le noyau où elles agissent en synergie avec GATA-1 pour augmenter la transcription des gènes de prolifération et la différenciation des plaquettes et les gènes anti-apoptotiques (Bcl-xl).

Dans le cas de LMC cette voie est activée même en absence du TPO, en effet, BCR-Abl peut activer via Grb-2, les protéines STAT sans passer par la phosphorylation des JAK kinases. Conduisant à une production excessive des plaquettes (**Figure 48**).

La moyenne de taux d'hémoglobine chez nos patients, étaient de 10,2 g/dl, nos résultats sont proches de ceux obtenus par Chemegni en 2014 [75], SEGBENA. AY en 2012 [82] et SANOGO.I en 2010 [83] qui trouvent respectivement une moyenne de 9.57, 10, 57 et 10,93 g/dl.

L'anémie a été retrouvé chez 75 % de nos malades ce qui explique la fatigue et la pâleur qui apparaissent généralement chez les patients, nos résultats sont proches à ceux obtenus par KUEVIAKOE M. I. et al en 2014 [78] qui ont observé une anémie chez 88,89% des patients.

Il est bien connu dans la littérature que la leucémie apparaissait comme une maladie progressive, caractérisée non seulement par une augmentation du nombre des globules blanc et des plaquettes, mais aussi par une diminution du nombre de globules rouges associée à des modifications cliniques, en particulier du foie et de la rate.

Mais d'après ce que nous savons sur le BCR-ABL, normalement on a un nombre élevé de globules rouges, puisque le BCR-ABL active de manière permanente plusieurs voies de signalisation, parmi ces dernières la voie de JAK /STAT qui est responsable de la production excessive des globules rouges.

Le BCR-ABL active cette voie même en absence du signal extracellulaire (EPO) conduisant à un nombre élevé du globule rouge (**Figure 48**).

On peut expliquer cette contradiction par la diminution de taux hémoglobine (75 % des patients avaient une diminution du taux d'hémoglobine), 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 sanguines.

En ce qui concerne la carence en hémoglobine chez les patients, on peut l'expliquer par certaines hypothèses :

- Un mauvais fonctionnement de la moelle osseuse, qui est le centre de la production d'hémoglobine. Une forte hyperleucocytose entraînant peut être une diminution du taux d'hémoglobine.
- Il peut alors y avoir un mauvais assemblage de la molécule de l'hémoglobine ou une instabilité de cette molécule.
- Une carence en fer ou mal fixation du fer sur la molécule d'hémoglobine.

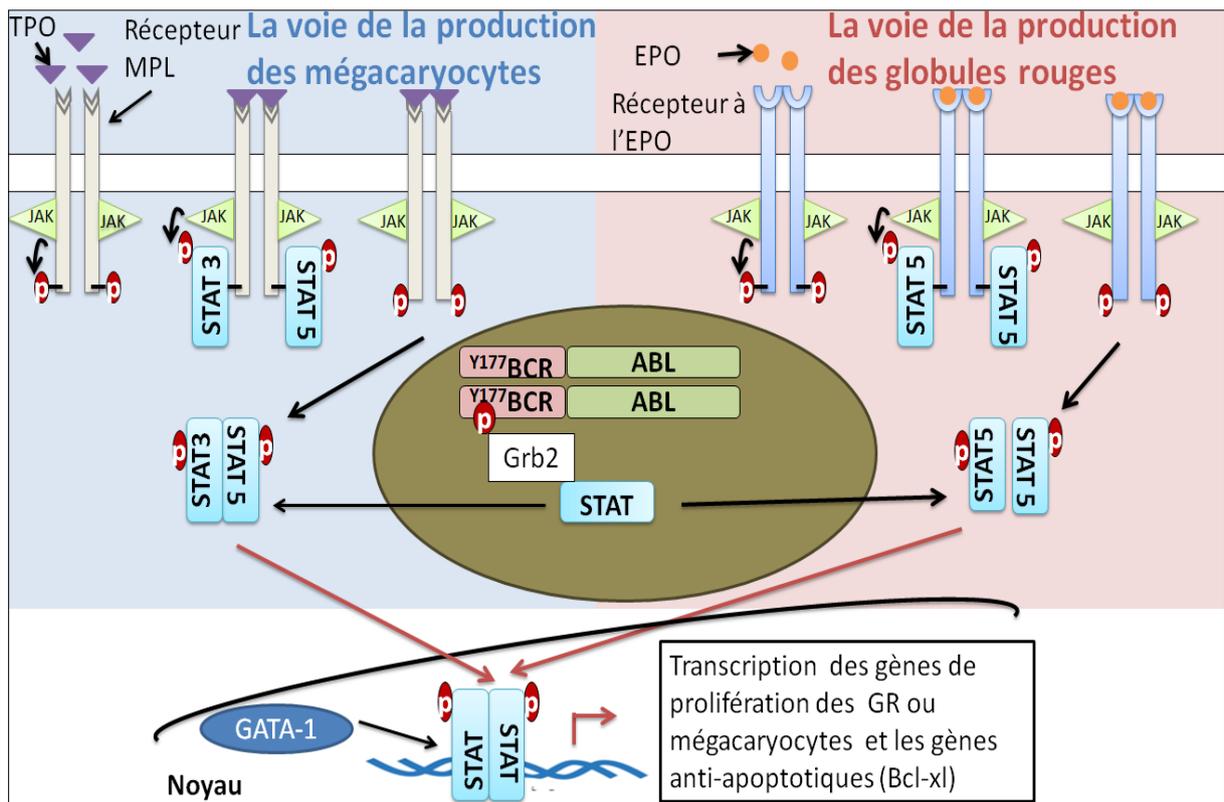


Figure 48 : voie principale de la production des globules rouges et les mégacaryocytes et leur cascade de signalisation dans le cas de LMC et le cas normal. Schéma original adapté des articles [85, 86]

L'examen de frottis sanguin permet de déterminer le taux de blaste et de myélémie dans le sang, dans notre série le taux de blastes sanguins est compris entre 0 et 11 %, 26 patients (92.86 %) avaient un taux inférieure à 10 %. Le résultat qu'on a trouvé concorde avec les données de la littérature [20] qui portent à la connaissance que le taux de Blastes sanguins dans le cas d'une leucémie myéloïde en phase chronique est inférieure à 10 %.

Le taux des cellules granuleuses immatures circulantes (myélémie) était compris entre 17 et 68 % avec une moyenne de 35,86 %.

La majorité de nos patients (85,71%) avait un taux supérieur à 20 %, nos résultats sont confirmés par les données de la littérature (Rose Marie Hamladji en 2010 [59]) qui informe que le taux de la myélémie en cas de LMC est supérieur à 20%.

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

Les patients du premier groupe avaient une diminution de taux du ratio BCR-ABL, le traitement permet d'obtenir une rémission moléculaire profonde RM5 chez le premier patient et 4.5 chez le deuxième patient, selon ces résultats on peut dire que le traitement est très efficace.

Les patients de deuxième groupe avaient une augmentation du taux de BCR-ABL après chaque contrôle, ce qui signifie que les patients n'ont pas répondu au traitement et n'avaient pas bénéficié de la thérapie dès le diagnostic.

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

Le suivi moléculaire a permis de marquer une rechute moléculaire chez les patients de troisième groupe, ces patients ont répondu au traitement au début mais au cours du temps on a constaté une augmentation de leur taux BCR-ABL, on peut expliquer cette rechute par la résistance des patients au traitement.

L'utilisation de la PCR en temps réel pour le diagnostic de LMC offre un diagnostic rapide, fiable, tant par sa sensibilité que par sa spécificité.

La RT-PCR a l'avantage de pouvoir se pratiquer sur sang total, contrairement à la cytogénétique conventionnelle qui nécessite une aspiration médullaire car les chances d'obtenir des cellules myéloïdes en mitose sont plus faibles dans le sang. Ce qui facilite la vie du patient.

La PCR en temps réel s'avère très intéressante pour des applications d'analyses à grande échelle étant donné que le processus complet est automatisé du début à la fin. Comme cette technique comprend généralement des systèmes en tubes fermés et que la quantification ne requiert aucune manipulation post-amplification, les problèmes de contamination post-PCR par les amplicons sont fortement réduits.

Sa sensibilité est impressionnante puisqu'elle permet de détecter, in vitro, une cellule leucémique parmi 100 000 cellules normales ($1/10^6$ cellules). Une grande sensibilité par rapport à la Cytogénétique conventionnelle (3% environ) et FISH (sensibilité comprise entre 10^{-2} et 10^{-3}).

Elle confirme le diagnostic de LMC, L'OMS définit la LMC comme un syndrome myéloprolifératif Ph1^{+/-} mais toujours BCR-ABL⁺, la RT-PCR confirme la présence du

transcrit de fusion BCR-ABL permettant le diagnostic de 95 % des cas de LMC qui sont Philadelphie positive, et de 5% des cas dépourvus du marqueur chromosomique.

Le suivi moléculaire de la LMC par la quantification des ARNm BCR-ABL a introduit le concept de la rémission moléculaire. Grâce à la RT-Q-PCR, leur simplification voire leur automatisation le monitoring des transcrits BCR/ABL est devenu une routine très simple par rapport aux autres examens, comme le caryotype pour le suivi des malades, 20 à 30 mitoses sont examinées, le résultat dépend de la qualité des mitoses obtenues, ce qui peut poser problème chez les patients sous traitement antiprolifératif.

La PCR en temps réel quantitative permet d'établir précisément et avec une grande sensibilité la cinétique de la maladie , avant tout traitement elle nous a permis d'évaluer la charge tumorale initiale du patient ,après la mise en place du traitement elle a permis également d'évaluer l'efficacité du traitement, et de déterminer la réponse moléculaire et son niveau (complète ou majeure).

La technologie de PCR en temps réel est aujourd'hui l'outil de choix qui a permis d'apporter un diagnostic de certitude dans la plupart des cas et un suivi efficace des patients.

Ses performances peuvent se résumer en trois mots : spécificité, sensibilité et bonne reproductibilité.

Enfin, il faut ajouter à ses nombreuses qualités, la rapidité de la technique, la méthode est automatisable, et par conséquent parfaitement adaptée à une analyse de routine.

VII. Conclusion :

La leucémie myéloïde chronique est une transformation maligne d'une cellule souche hématopoïétique, caractérisée par une anomalie génétique acquise : la translocation t (9;22) (q34;q11) ou le chromosome Philadelphie (Ph) et son équivalent moléculaire, l'oncogène BCR-ABL.

La protéine BCR-ABL est dotée d'une activité tyrosine kinase constitutive et responsable de l'activation de plusieurs voies de survie incluant PI3K/Akt/mTOR, JAK/STAT, ainsi que la voie Ras/Raf/ERK, et conduisant à une augmentation de la prolifération et à l'inhibition de l'apoptose des cellules leucémiques.

En absence de traitement la maladie progresse de la phase chronique vers une leucémie aigüe.

Avec les progrès accomplis en technologies moléculaires, leur simplification voire leur automatisation, le diagnostic et le monitoring des transcrits BCR/ABL est devenu une routine indispensable pour assurer la prise en charge des patients atteints de LMC.

A la lumière de ce travail, on voit comme perspectives :

- En ce qui concerne les Kit de détection des transcrits de fusion BCR-ABL il est préférable si possible d'utiliser un Kit qui détecte les transcrits e1a2 ou e19a2 pour un meilleur diagnostic.

- Sensibiliser les gens :
 - ✓ à faire un bilan périodique de santé comportant obligatoirement un hémogramme.
 - ✓ à consulter tôt un centre de santé dès l'apparition des premiers signes afin de stadifier la maladie et d'en déduire le pronostic.

- En fin, il faut recommander aux patients de :
 - ✓ respecter le calendrier des analyses biologiques et donc respecter les dates de rendez-vous de consultations pour surveiller leurs taux de BCR-ABL.
 - ✓ suivre correctement le traitement.

VIII. Bibliographie :

- [1]. Chomel, J. C., Sorel, N., Mayeur-Rousse, C., & Turhan, A. G. (2009). Les syndromes myéloprolifératifs. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 24(2), 69-85.
- [2]. Ugo, V., James, C., & Vainchenker, W. (2005). Une mutation unique de la protéine kinase JAK2 dans la polyglobulie de Vaquez et les syndromes myéloprolifératifs non-LMC. *médecine/sciences*, 21(6-7), 669-670.
- [3]. Campbell, P. J., & Green, A. R. (2006). The myeloproliferative disorders. *New England Journal of Medicine*, 355(23), 2452-2466.
- [4]. Constantinescu, S. N. (2008). JAK2 V617F: histoire et perspectives d'une nouvelle mutation. *Louvain médical*, 127(7), 243-246.
- [5]. Knoops, L. (2008). Reconnaître, classer et traiter les syndromes myéloprolifératifs BCR-ABL négatifs. *Louvain médical*, 127(7), 247-255.
- [6]. Campregher, P. V., Santos, F. P. D. S., Perini, G. F., & Hamerschlak, N. (2012). Molecular biology of Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, 34(2), 150-155.
- [7]. Lambert, J. F., & Duchosal, M. A. (2007). Hämatologie: Myeloproliferative Syndrome—Eine Kinase folgt der anderen. In *Schweiz Med Forum* (Vol. 7, pp. 11-13).
- [8]. Dameshek, W. (1951). Editorial: some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*, 6(4), 372-375.
- [9]. Bories, D., Devergie, A., Gardembas-Pain, M., Kuentz, M., Legros, L., Mahon, F. X., ... & Rousselot, P. (2003). Stratégies thérapeutiques et recommandations pour la prise en charge des patients atteints de leucémie myéloïde chronique. *Hématologie*, 9(6), 497-512.
- [10]. Roche-Lestienne, C., & Andrieux, J. (2007). Cytogénétique et génétique moléculaire dans la myélofibrose avec métaplasie myéloïde et dans la polyglobulie de Vaquez. *Pathologie Biologie*, 55(1), 49-55.
- [11]. Najman A. Maladie de Vaquez. *EMC, Hématologie*. 2010 : 10, 1–14. 11. Roche-Lestienne C., Andrieux J. Cytogénétique et génétique moléculaire dans la myélofibrose avec métaplasie myéloïde et dans la polyglobulie de Vaquez. *Pathologie Biologie*. 2007 : 55, 49–55.

- [12]. Naj man A; Verclly E; Potron G; Isnard F. (1994). Hématologie. Tome I. Ellipses, Paris.435-6.
- [13]. Papadakis, E., Hoffman, R., & Brenner, B. (2010). Thrombohemorrhagic complications of myeloproliferative disorders. *Blood reviews*, 24(6), 227-232.
- [14]. Ianotto, J. C., Boyer-Perrard, F., Gyan, E., Laribi, K., Cony-Makhoul, P., Demory, J. L., ... & Dupriez, B. (2013). Efficacy and safety of pegylated-interferon α -2a in myelofibrosis: a study by the FIM and GEM French cooperative groups. *British journal of haematology*, 162(6), 783-791.
- [15]. Dine, G., Rehn, Y., Brahim, S., Ammar, N. A., Gaillard, B., Bocq, Y., & Fumagalli, G. (2013). Maladie résiduelle et leucémie myéloïde chronique. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 28(4), 201-206.
- [16]. Nowell, P. C., & Hungerford, D. A. (1960). Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *Journal of the National Cancer Institute*, 25(1), 85-109.
- [17]. Sawyers, C. L. (1999). Chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, 340(17), 1330-1340.
- [18]. Leporrier, M. 1999. Hématologie. Dion initiatives santé, Vélizy-Villacoublay .
- [19]. Foussard Ch, Ifrah N Leucémie myéloïde chronique : Biologie Moléculaire, Cancérologie aujourd'hui, 1992 ; 1(1) :8-13.
- [20]. Leguay, T., & Mahon, F. X. (2005). Leucémie myéloïde chronique. *EMC-Hématologie*, 2(3), 187-205.
- [21]. Chronic Myelogenous Leukemia and Related Disorders :Overview Williams Haematology 2007>PartIX.Malignant Diseases>Chapter88
- [22]. Cortes J.E., Silver R.T., Khoury H.J., Kantarjian H. Chronic Myeloid Leukemia. *Cancer Network*. 2013 : 1–15.
- [23]. K.Djouadi-lahlou. (2010). Approche épidémiologique de la leucémie myéloïde chronique en Algérie. Travail coopératif et multicentrique *Revue Algérienne d'Hématologie* N° 3. p 6-10
- [24]. Mertelsmann, R., Engelhardt, M., Berger, D. P., & Moreau, P. (2011). Précis d'hématologie et d'oncologie. Springer Science & Business Media.

- [25]. Deininger, M. W., Bose, S., Gora-Tybor, J., Yan, X. H., Goldman, J. M., & Melo, J. V. (1998). Selective induction of leukemia-associated fusion genes by high-dose ionizing radiation. *Cancer research*, 58(3), 421-425.
- [26]. Cayuela, J. M., & Huguet, F. (2012). Le diagnostic de la leucémie myéloïde chronique (LMC) en 2012. *Oncologie*, 1-8.
- [27]. Turhan, A. (2002). Advances in the study of BCR-ABL fusion protein. *Hématologie*, 8(1), 35-45..
- [28]. Ren, R. (2005). Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nature Reviews Cancer*, 5(3), 172-183.
- [29]. Hantschel, O., & Superti-Furga, G. (2004). Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(1), 33-44.
- [30]. Sébahoun, G. (2005). *Hématologie clinique et biologique*. 2ème édition. Wolters Kluwer, France.
- [31]. CHOMEL, J. C., Guilhot, F., Tanzer, J., & Kitzis, A. (1995). Mécanismes de l'action oncogénique de Bcr-Abl dans la leucémie myéloïde chronique. *MS. Médecine sciences*, 11(12), 1669-1678.
- [32]. Sirvent A., Benistant C., Roche S. Cytoplasmic signalling by the c-Abl tyrosine kinase in normal and cancer cells. *Biol. Cell*. 2008 : 100, 617-631
- [33]. Panjarian, S., Iacob, R. E., Chen, S., Engen, J. R., & Smithgall, T. E. (2013). Structure and dynamic regulation of Abl kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 288(8), 5443-5450.
- [34]. Harrison, S. C. (2003). Variation on an Src-like theme. *Cell*, 112(6), 737-740..
- [35]. Hantschel, O., Nagar, B., Guettler, S., Kretzschmar, J., Dorey, K., Kuriyan, J., & Superti-Furga, G. (2003). A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl. *Cell*, 112(6), 845-857.
- [36]. Melo, J. V., & Goldman, J. M. (2007). *Hematologic Malignancies: Myeloproliferative Disorders*. Springer. : p16-19, 23-27.
- [37]. Pendergast, A. M. (2002). The Abl family kinases: mechanisms of regulation and signaling. *Advances in cancer research*, 85(85), 51-100.
- [38]. Wang, J. Y. (2000). Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase. *Oncogene*, 19(49), 5643.

- [39]. 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), 814-817.
- [40]. Soussi, T. (2000). Fiche n° 33: Gène: BCR (breakpoint cluster region)-Catégorie: Oncogène. *Bulletin du cancer*, 87(3), 229-30.
- [41]. Ron, D., Zannini, M., Lewis, M., Wickner, R. B., Hunt, L. T., Graziani, G. Tronick SR., Aaronson SA, & Eva, A. (1991). A region of proto-dbl essential for its transforming activity shows sequence similarity to a yeast cell cycle gene, CDC24, and the human breakpoint cluster gene, bcr. *The New biologist*, 3(4), 372-379.
- [42]. Deininger, M. W., Goldman, J. M., & Melo, J. V. (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 96(10), 3343-3356.
- [43]. Quintás-Cardama, A., & Cortes, J. (2009). Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*, 113(8), 1619-1630.
- [44]. Mayer, B. J. (2001). SH3 domains: complexity in moderation. *Journal of cell science*, 114(7), 1253-1263.
- [45]. 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.
- [46]. Pendergast, A. M., Gishizky, M. L., Havlik, M. H., & Witte, O. N. (1993). SH1 domain autophosphorylation of P210 BCR/ABL is required for transformation but not growth factor independence. *Molecular and Cellular Biology*, 13(3), 1728-1736.
- [47]. Smith, K. M., Yacobi, R., & Van Etten, R. A. (2003). Autoinhibition of Bcr-Abl through its SH3 domain. *Molecular cell*, 12(1), 27-37.
- [48]. Goga, A., McLaughlin, J., Afar, D. E., Saffran, D. C., & Witte, O. N. (1995). Alternative signals to RAS for hematopoietic transformation by the BCR-ABL oncogene. *Cell*, 82(6), 981-988.
- [49]. Cilloni, D., & Saglio, G. (2012). Molecular pathways: Bcr-abl. *Clinical Cancer Research*, 18(4), 930-937.
- [50]. LIEVRE, A., & LAURENT-PUIG, P. (2010). La voie de signalisation RAS/MAPK. *Cancéro digest*, 2(1), 38-42.

- [51]. Coutte, L., Dreyer, C., Sablin, M. P., Faivre, S., & Raymond, É. (2012). Rôle de la voie PI3K-AKT-mTOR dans le cancer et les thérapeutiques antitumorales. *Bulletin du Cancer*, 99(2), 173-180.
- [52]. Helgason, G. V., Karvela, M., & Holyoake, T. L. (2011). Kill one bird with two stones: potential efficacy of BCR-ABL and autophagy inhibition in CML. *Blood*, 118(8), 2035-2043.
- [53]. Vignais, M. L. (1997). Protéines JAK et STAT dans la signalisation cellulaire , 13 : 1277-84
- [54]. Jonuleit T, van der Kuip H, Miething C, et al. Bcr-Abl kinase down-regulates cyclindependent kinase inhibitor p27 in human and murine cell lines. *Blood*. 2000;96:1933-1939.
- [55]. Maigre, M., & HAROUSSEAU, J. (1990). Leucémie myéloïde chronique: acquisitions récentes. *Concours médical*, 112(19), 1760-1769.
- [56]. Howard, M. R., & Hamilton, P. J. (2004). *Hématologie*. Elsevier / Masson
- [57]. Hansen, J. A., Gooley, T. A., Martin, P. J., Appelbaum, F., Chauncey, T. R., Clift, R. A., ... & Sullivan, K. M. (1998). Bone marrow transplants from unrelated donors for patients with chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, 338(14), 962-968.
- [58]. Recommandations de l'European Leukemia Net pour la gestion de la leucémie myéloïde chronique, version de 2013. (Baccarani, M et al: *Blood*, 2013; Vol. 122: 872-84).
- [59]. Hamladji, R.M . (2010) Réflexions sur le diagnostic et la prise en charge thérapeutique de la LMC en Algérie. Travail coopératif et multicentrique *Revue Algérienne d'hématologie* N° 3. P: 4-5
- [60]. National Comprehensive Cancer Network Practice Guidelines in Oncology. Chronic myelogenous leukemia. Version 2. 2008.
- [61]. Jaffe, E. S., Harris, N. L., Stein, H., & Vardiman, J. W. (2001). Tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. *WHO Classification of Tumours*. WHO, Geneva.
- [62]. Chauffaille, M. D. L. L. F., Oliveira, J. S. R., Romeo, M., & Kerbauy, J. (2001). Fluorescent in-situ hybridization (FISH) for BCR/ABL in chronic myeloid leukemia after bone marrow transplantation. *Sao Paulo Medical Journal*, 119(1), 16-18.
- [63]. Chomel, J. C. (2015). Biologie moléculaire de la leucémie myéloïde chronique: dernières avancées. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2017(492), 33-40.

- [64]. Tulliez, M. (2011). Traitement de la leucémie myéloïde chronique (LMC) en 2011. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2011(433), 33-40.
- [65]. MAHON, F. (2012). Leucémie myéloïde chronique. Correspondance en onco-hématologie, 7(4), 208-211.
- [66]. Baccarani, M., Cortes, J., Pane, F., Niederwieser, D., Saglio, G., Apperley, J., ... & Hochhaus, A. (2009). Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *Journal of clinical oncology*, 27(35), 6041-6051.
- [67]. Ledoux, M. P., & Natarajan-Ame, S. (2013). Leucémie myéloïde chronique: des réponses et des questions. *Médecine thérapeutique*, 19(2), 128-138.
- [68]. Tse C and Capeau J. Real time PCR methodology for quantification of nucleic acids. *Ann Bio/ Clin* 2003, ;1, 279-293.
- [69]. Poitras, E., & Houde, A. (2002). La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in biology and biotechnology*, 2(2), 2-11.
- [70]. Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- [71]. Fares, S. Aniba, M. Qachouh, M. Quessar, A. Rachid, M Madani, A . Lamchahab, M. Cherquaoui, S. Khoubila , N.(2015).Profil épidémiologique de la leucémie myéloïde chronique au service d'hématologie et oncologie de Casablanca . *John Libbey Eurotext* ,21(1), 202-203.
- [72]. Bade, M. A., Andia, A., Djibrilla, A., Beydou, S. S., Brah, S., Daou, M., & Adehossi, E. (2015). Inhibiteurs de la Tyrosine Kinase dans le Traitement de la Leucémie Myéloïde Chronique: Expérience du Niger. *HEALTH SCIENCES AND DISEASES*, 16(3).
- [73]. Le Guyader-Peyrou, S., Belot, A., Maynadié, M., Binder-Foucard, F., Remontet, L., Troussard, X., ... & French network of cancer registries (Francim. (2016). Cancer incidence in France over the 1980–2012 period: Hematological malignancies. *Revue d'épidémiologie et de sante publique*, 64(2), 103-112.

- [74]. Chemegni, B. C., Nlend, M. N., Dime, P. N., & Ndom, P. (2016). Survie des Patients Atteints de Leucémie Myéloïde Chronique sous Traitement par Imatinib à Yaounde. *HEALTH SCIENCES AND DISEASES*, 17(3).
- [75]. 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.
- [76]. Diallo, D. A., Cissoko, L. S., Cissoko, Y., Diallo, Y., Baby, M., Mouhaha, J., ... & Salissou, G. M. (2005). Épidémiologie actuelle des hémopathies malignes dans les services d'hématologie oncologie médicale et de médecine interne de l'hôpital du Point G, Bamako, Mali. *Mali Médical*, 20(4), 1.
- [77]. TEA DAIGNEKPO, N., YAO, T., RAIN, J., ABISSE AGBA, S., DANHO BASSIMBIE, J., ANGLAW, M., & KONE, M. (1993). La leucémie myéloïde chronique (LMC) en Côte d'Ivoire. A propos de 69 observations. *Publications médicales africaines*, (125), 48-50.
- [78]. Mukiihi, J. M., Nyirenda, C. M., Paul, B., Aduwuyi, J. O., Mzula, E. I. B., & Malata, H. N. (2008). Chronic myeloid leukaemia in central Africans. *East African medical journal*, 80(9), 470-475.
- [79]. Sanhadji, K. (2015). Les maladies du sang, diagnostic et traitements. *Le soir d'Algérie*.
- [80]. NACOULMA E.W.C, SAWADOGO D, KAFANDO E, OUEDRAOGO O, NIGNAN M., (2007). La place du myélogramme dans le diagnostic des hémopathies au centre hospitalier universitaire Yalgado Ouédraogo de Ouagadougou. *J. Sci. Pharm. Biol.*, 8, 71-77.
- [81]. AGHARBI Fatima-Zahra. La leucémie myéloïde chronique : avancées diagnostiques et thérapeutiques. Faculté de médecine de Fès 2008 86-08
- [82]. 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.
- [83]. Sanogo I, Tolo-Diebkile A, Koffi Kg, Sawadogo Gd, Ndiaye Fsd, Nanho Dc, Sekongo Ym, Kouakou B, Meite N, Ayemou R., (2010). Impact thérapeutique de l'interféron alpha

dans la prise en charge des patients atteints de leucémie myéloïde chronique. MaliMédical, 25, 22-27.

[84]. BROUSTET A. (1994).La leucémie myéloïde chronique in NAJMAN Ed. Ellipse ; précis des maladies du sang tome II Paris, p23-41.

VI. Annexes :

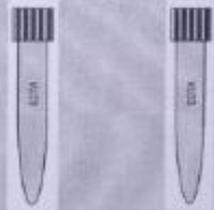
Annexe 1 : Fiche de renseignements

Service d'immunologie Pr CHAIBS ID : _____

Unité d'histocompatibilité et d'Immunologie Cellulaire
Dr Yanis MEDDOUR

Recherche du transcrit BCR-ABL1

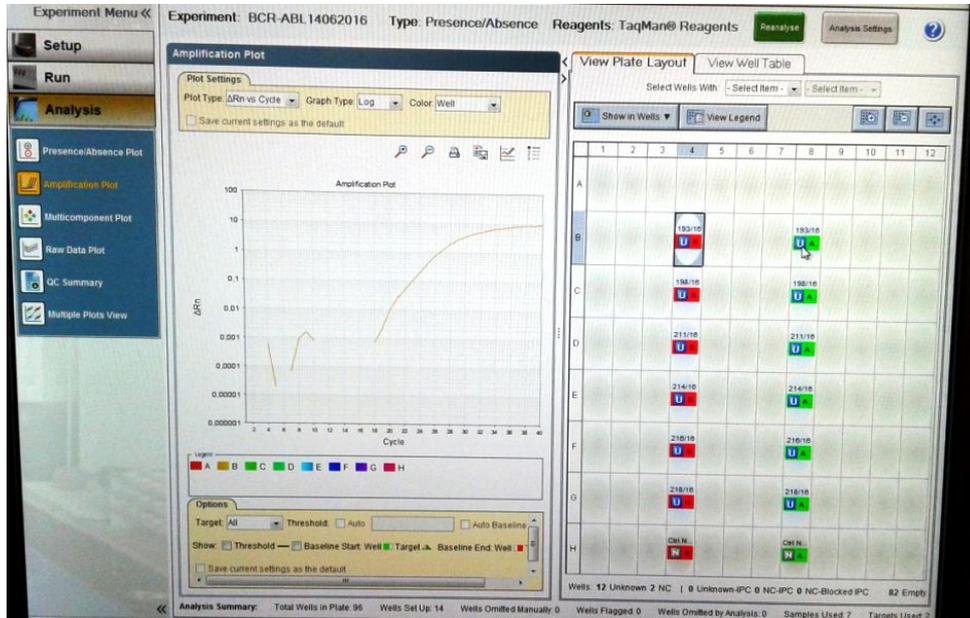
(2 tubes sang total sur EDTA bien remplie avant 11h, uniquement sur RDV)

<p>Nom : _____</p> <p>Prénom : _____</p> <p>Age : _____</p> <p>Adresse : _____</p> <p>Profession : _____</p>	<p>Date: _____</p> <p>Service : _____</p> <p>Médecin traitant</p> <p style="text-align: center;">.</p>
<p>Date du dgc _____</p> <p>Patient nouveau <input type="checkbox"/></p> <p>Patients ancien <input type="checkbox"/></p> <p>3 mois <input type="checkbox"/> 6 mois <input type="checkbox"/> 1 an <input type="checkbox"/></p>	<p>Traitement</p> <p>Hydroxyurie <input type="checkbox"/> Dose _____</p> <p>E. II^{ème} _____</p> <p>ITK 1^{ère} G <input type="checkbox"/> Dose _____</p> <p>E. II^{ème} _____</p> <p>ITK 2^{ème} G <input type="checkbox"/> Dose _____</p> <p>E. II^{ème} _____</p>
<p>Renseignements clinico-biologiques</p> <p>SPMG <input type="checkbox"/> DS _____ cm</p> <p>Autre : _____</p> <p>_____</p> <p>GB : _____ /ml Hb = _____ g/dL</p> <p>Pqt : _____ /ml Myélémie : _____ %</p> <p>Blastes : _____ %</p>	<p>Réponse au traitement :</p> <p>Hématologique : _____</p> <p>Cytogénétique : _____</p> <p>Type RC : _____</p>
<p>Score de Sokal :</p> <p>Elevé <input type="checkbox"/></p> <p>Intermédiaire <input type="checkbox"/></p> <p>Bas <input type="checkbox"/></p>	<p>Coller le prélèvement ici</p> 

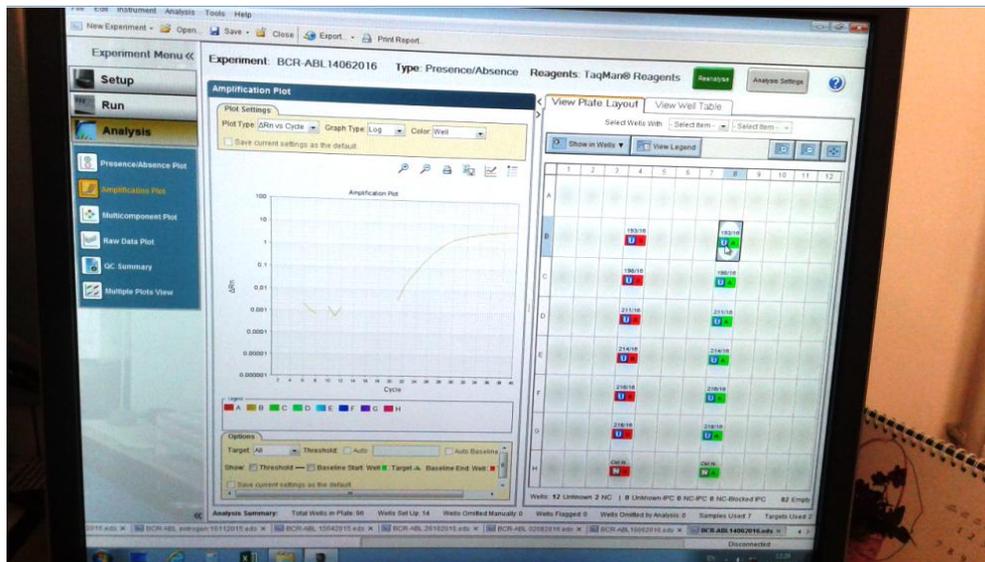
Poste : 19032
e-mail : laim_hca@mdn.dz

Annexe 2 : Résultats de la PCR en temps réel :

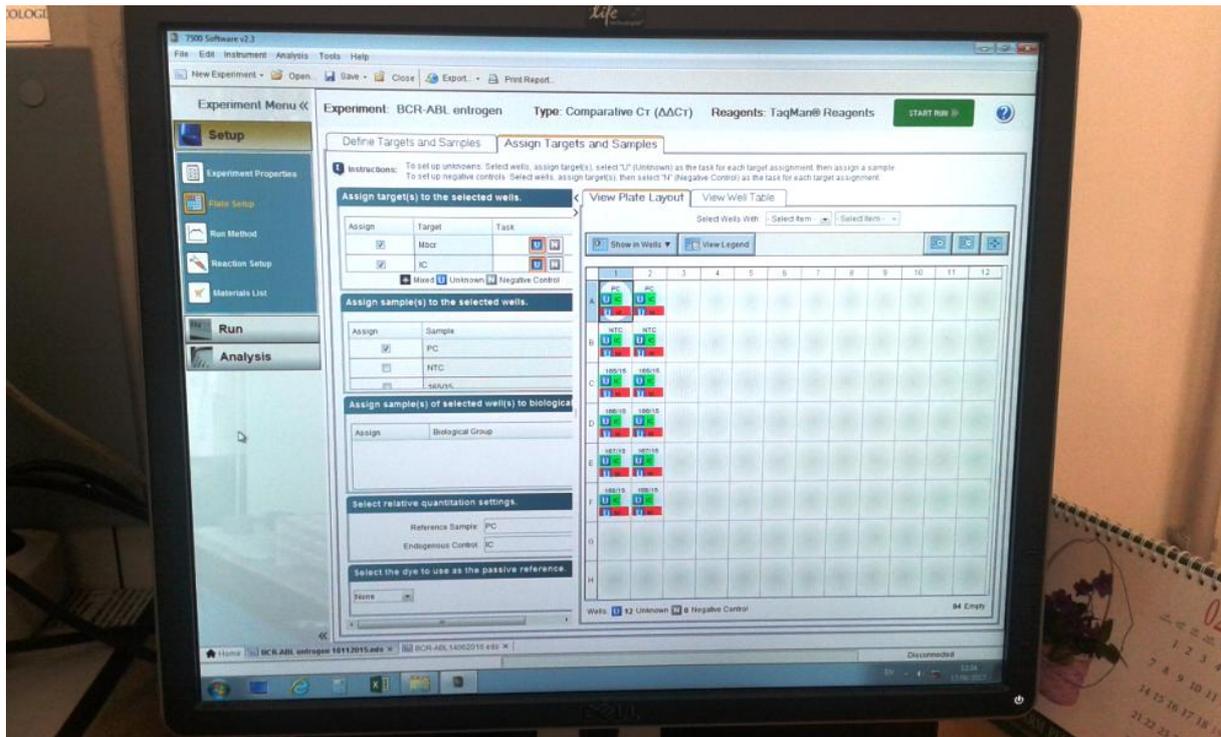
a) Résultats de la PCR en temps réel qualitative :



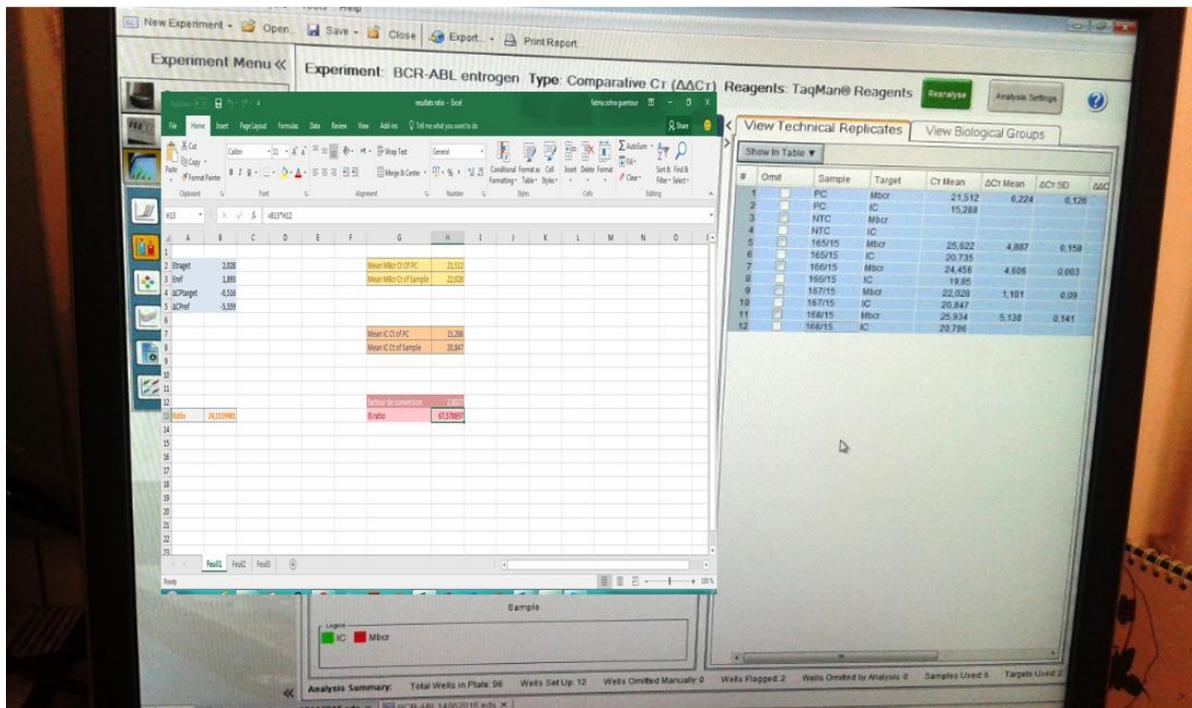
Résultats d'amplification de gène BCR-ABL



Résultats d'amplification de gène ABL



Plaque de 96-puits chargée en duplicata



Calcul de ratio BCR-ABL/ABL % par Microsoft Excel

Annexe 3: Matériels et équipement



Biometra TProfessional Thermocycler



Centrifugeuse pour micro-plaque



Applied biosystems 7500 réal time



Vortex



Centrifugeuse



Hotte

