



**République Algérienne Démocratique et Populaire**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Université Saad Dahleb Blida 1**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la vie**

**Département de Biologie et Physiologie Cellulaire**

**Option Génétique**

**Mémoire de projet de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master**

**Thème :**

**L'intérêt thérapeutique et pronostique de la Leucémie Aigue  
Myéloïde avec Inv(16)/ t(16 ; 16) (CBF $\beta$ -MYH11)**

**Présenté par :**

- **Chezief Imène**
- **Djemad Kenza**

Soutenu le : 10/07/2019 devant le jury composé de :

<b>Mme BEN AZZOUZ F.</b>	<b>MCB USDB1</b>	<b>Présidente</b>
<b>Mme CHALLAL N.</b>	<b>MCB USDB1</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>Mme TAOUSSI S.</b>	<b>MCA EHS ELCC</b>	<b>promotrice</b>
<b>Mme GUESSAIBIA N.</b>	<b>MCB USDB1</b>	<b>Co-Promotrice</b>

**Promotion 2018/2019**

## **Remerciements**

*En préambule à ce mémoire, nous tenons tout d'abord à remercier Dieu le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce Modeste travail.*

*En second lieu, nous souhaitons adresser nous remerciements les plus chaleureuses et les plus sincères au Professeur Taoussi notre encadreur de nous avoir accueilli dans son laboratoire de cytogénétique et nous lui sommes très reconnaissantes de nous avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail et de temps qu'elle nous a accordé, et pour qu'elle soit remerciée ici pour la grande liberté qu'elle nous a laissé, pour ses conseils précieux et pour sa sympathie.*

*Nous tenons à exprimer nos reconnaissances à la fameuse généticienne Mme Guessaibia de nous avoir accordé du temps pour juger ce travail pour son avis et ses remarques ont permis d'améliorer le contenu de ce travail, et pour avoir dirigé avec bienveillance le déroulement de nos recherches, également un grand MERCI pour sa gentillesse et son sourire marqué.*

*Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury à la présidente Mme BEN AZZOUZ et l'examinatrice Mme CHALLAL pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions*

*Nous tenons aussi à saisir cette occasion et adresser nos profonds remerciements et nos profondes reconnaissances à :*

*Toute l'équipe de laboratoire : Khadidja, Naouel, Naziha*

*A nos familles et nos amis qui par leurs prières et leurs encouragements, on a pu surmonter tous les obstacles.*

*Nous tenons à remercier toute personne qui a participé de près ou de loin à l'exécution de ce modeste travail.*

*Thank  
You*

## ***Dédicaces de Kenza***

*Plus particulièrement à ma mère la source de mon bonheur, ma raison d'être, ma raison de vivre, la lune qui éclaire mon chemin et m'illumine de douceur et d'amour, celle qui a fait de moi ce que je suis aujourd'hui avec ces encouragements et ses prières pour moi. Je te dédie ce travail en témoignage de l'amour éternel que je porte pour toi. Que dieu te garde pour moi en bonne santé accompagnée de ton merveilleux sourire.*

*A ma famille, que ce manuscrit soit le reflet de tout l'amour et la reconnaissance que je vous porte. Un merci sans limite pour votre soutien sans faille, vos encouragements, votre présence...Merci du fond du cœur. Puissiez-vous trouver en ces quelques pages tous les sacrifices, toute la passion et la volonté qui m'animent et que je pense, vous m'avez transmis...*

*A mes chers neveux d'amour, HIZIA SERINE et son petit frère MOURAD et mon petit ange ANES. Ils sont souvent la raison de mon sourire.*

*A ma chère binôme IMENE, que je la considère comme une sœur à moi et en raison de l'amour sincère que je porte pour elle, je te remercie énormément pour tous ces agréables moments ensembles, aussi pour ton accueil chez toi je serai très reconnaissante, je te remercie ainsi pour ton soutien de moral et ta gentillesse. Que dieu te garde pour moi et te préserve ta santé en te souhaitant tout le bonheur du monde.*

*A mes amies proches, celles qui m'ont toujours soutenu et m'ont encouragé et ont fait tout pour me remonter le morale. Je vous dédie ce modeste travail en témoignage de l'amour, l'attachement que je vous porte en vous souhaitant toute une vie parfumée de joie.*

*A mes enseignants qui ont été là toujours pour nous apporter toutes les informations.*

*A tous ceux qui ont participé de près ou de loin pour la réalisation de ce projet.*



## **Dédicace Imène**

*Premièrement je remercie ALLAH (mon dieu) de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force et la patience pour finaliser ce travail.*

*Je dédie ce travail : A ma très chère mère Baya...*

*Quoi que je fasse ou que je dise, je ne point te remercier comme il se doit, chère maman ta présence à mes cotés a toujours été ma source de force, tu n'as jamais dis non à mes exigences et tu n'as épargné aucun effort pour me rendre heureuse. Que dieu vous bénisse santé, bonheur et une longue vie afin que je puisse te combler à mon tour.*

*A mon frère Ibrahim...*

*A la place de mon père, ami fidèle et mon conseiller, qui m'a assisté dans les moments difficiles et m'a pris doucement par la main pour traverser des épreuves pénibles....et à tous mes frères et mes sœurs et mes belles sœurs. En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.*

*Imane... avec le grand amour et l'attachement que j'ai pour toi je te remercie pour ton accompagnement et ton support...*

*A mes chers neveux et nièces...*

*Aucune dédicace ne serait exprimer tout l'amour que j'ai pour vous, Votre joie et votre gaieté me comblent de bonheur. Puisse Dieu vous garder, éclairer votre route et vous aider à réaliser à votre tour vos vœux les plus chers*

*A ma moitié Sabrina...*

*Je ne trouve pas toujours les mots pour te remercier de l'amour que tu m'as témoigné au cours des années, les paroles d'encouragement que tu as su prononcer et du soutien extraordinaire que tu m'as offert. Mais peut-être je laisse parler mon cœur pour te dire que tu es un cadeau d'Allah*

*A mon binôme Kenza et mes chères amies...*

*Peut-être les mots ne sont pas justes ni sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des sœurs et des amies sur qui je peux compter. En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons vécus ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

*Une spéciale dédicace à cette personne qui compte déjà énormément pour moi, et pour qui je porte beaucoup de tendresse et de respect.*

*A toi Saad*



## Résumé

La leucémie aigue myéloïde (LAM) est une hémopathie maligne caractérisée par une prolifération anarchique des cellules de la lignée myéloïde. De nombreuses anomalies chromosomiques récurrentes ont été décrites dans cette pathologie.

L'inversion (16) (p13; q22) ou plus rarement la translocation (16; 16) (CBF $\beta$ -MYH11) sont parmi les anomalies cytogénétiques récurrentes les plus fréquemment rencontrées dans les leucémies aigues myéloïdes de l'adulte. La conséquence de ces anomalies est la formation d'un gène de fusion entre le gène CBF $\beta$  qui est localisé en 16q22 et qui régule l'expression de certains ADP-Ribosylation factors (ARFs) et autres gènes suppresseurs de tumeurs (TSGS) et le gène MYH11 localisé en 16p13 qui code pour une chaîne lourde de la myosine de muscle lisse.

Pour montrer dans la leucémie aigue myéloblastique la place et le pronostique et l'intérêt thérapeutique de l'inversion (16) (p13; q22)/translocation (16; 16)(CBF $\beta$ -MYH11) nous avons effectué une étude rétrospective (2009-2018) sur des patients atteints de LAM avec inversion (16) (p13; q22)/translocation (16; 16) (CBF $\beta$ -MYH11) au niveau du plateau de cytogénétique hématologique du laboratoire d'hématologie du CLCC Blida. La fréquence de l'inversion (16) (p13; q22)/translocation (16; 16) (CBF $\beta$ -MYH11) est évaluée à 9% de toutes les LAM (400) recrutées sur la période indiquée.

Sur le plan technique, nous avons réalisé une étude cytogénétique par caryotype et hybridation in situ en fluorescence (FISH) sur 6 cas de LAM4 avec Inv(16). Pour ce faire, le diagnostic de l'inv(16) ou de t(16; 16) a été établi après la mise en culture de cellules de la moelle osseuse des patients pendant 24h avec synchronisation, la colchicine pour stopper la division en métaphase, le choc hypotonique, la fixation du culot cellulaire et l'étalement pour établir le caryotype en bandes R et la FISH avec une sonde locus Inv(16)/t(16; 16)(p13; q22).

**Mots clés :** Leucémie Myéloïde Aigue, Inversion Chromosomique, Gène CBF $\beta$ , Gène MYH11, Caryotype, FISH

# Abstrat

Acute myeloid leukemia (AML) is a malignant hemopathy characterized by an anarchic proliferation of cells of the myeloid lineage. Many recurrent chromosomal abnormalities have been described in this pathology.

Inversion (16) (p13; q22) and rarely, translocation(16; 16) (CBF $\beta$ -MYH11) are among the cytogenetic abnormalities most frequently found in acute myeloid leukemia of the adult. The consequence of these abnormalities is the formation of a fusion gene between the CBF $\beta$  gene which is localized at 16q22 and which regulates the expression of some ADP-Ribosylation factors (ARFs) and other tumor suppressors genes (TSGS) and the gene Localized MYH11 in 16p13 which codes for a heavy chain of smooth muscle myosin.

To show in acute myeloblastic leukemia the place and prognostic and therapeutic interest of inversion (16) (p13; q22) / translocation (16; 16) (CBF $\beta$ -MYH11) We have performed a retrospective study (2009-2018) about patients who have AML with inv(16) (p13; q22) / translocation (16; 16) (CBF $\beta$ -MYH11) at the level of the cytogenetic plateau of the hematology laboratory of CLCC Blida. The frequency of iversion (16) (p13; q22) / translocation (16; 16) (CBF $\beta$ -MYH11) is evaluated at 9% of all the AML (400) recruited over the period indicated.

On the technical plan, we realized a cytogenetic study; the karyotype and fluorescence in situ hybridization (FISH). Out of 6 cases of LAM4 with recurrent cytogenetic type Inv (16). To do this, the diagnosis of inv (16) or t (16; 16) have been established established after culturing of bone marrow cells of patients during 24h with synchronization, colchicine to stop metaphase division, hypotonic shock, cell pellet fixation and spreading to establish the R-band karyotype and FISH with a locus probe Inv (16) / t (16; 16) (p13; q22).

**Keywords:** Acute Myeloid Leukemia, Chromosomal Inversion, CBF $\beta$  Gene, MYH11 Gene, Karyotype, FISH.

## ملخص

سرطان الدم النخاعي الحاد (AML) هو مرض دموي خبيث يتميز بانتشار غير خاضع للسيطرة على خلايا سلالة النخاعية. وقد تم وصف العديد من تشوهات الكروموسومات المتكررة في هذه الأمراض.

انقلاب الكروموسوم (16) (q22 ؛ p13) أو ، نادراً الإزاحة (16 ؛ 16) (CBFβ-MYH11) هي من بين أكثر حالات التشوه الوراثي الخلوي المتكررة شيوعاً في سرطان الدم النخاعي الحاد عند البالغين. نتيجة هذه الشذوذ هي تكوين جين الاندماج بين جين CBFβ الواقع في 16q22 والذي ينظم تعبير بعض العوامل (ARFs) ADP-Ribosylation factors وغيرها من الجينات نازع للورم (TSGs) والجين MYH11 الواقع في 16p13 الذي يرمز لسلسلة ثقيلة من الميوسين للعضلات الملساء.

لإظهار سرطان الدم النخاعي الحاد في المكان والتشخيص والفائدة العلاجية من الانقلاب (16) (q22 ؛ p13) / الإزاحة (16 ؛ 16) (CBFβ-MYH11) أجرينا دراسة استيعابية (2009-2018) في مرضى AML الذين لديهم انقلاب (16) (q22 ؛ p13) / الإزاحة (16 ؛ 16) (CBFβ-MYH11) في مصلحة علم الوراثة الخلوية الدموية في مخبر أمراض الدم في CLCC بالبلدية. وتيرة الانقلاب (16) (q22 ؛ p13) / إزاحة (16 ؛ 16) (CBFβ-MYH11) بنسبة 9 ٪ من جميع (400) AML المعينين خلال الفترة المشار إليها..

في الجانب التقني، أجرينا دراسة الوراثة الخلوية بواسطة النمط النووي والإشعاع في التهجين (FISH) على حالات من LAM4 مع الشذوذ الخلوي المتكررة للانقلاب (16). للقيام بذلك ، تم تشخيص انقلاب كروموسومي (16) أو (16 ؛ 16) t بعد زراعة خلايا نخاع العظم للمرضى لمدة 24 ساعة مع التزامن ، الكولشيسين لوقف طور الانقسام ، صدمة منخفضة التوتر ، تثبيت بيليه الخلية، وإنشاء النمط النووي R-band و FISH مع التحقيق الموضعي (16 ؛ 16) t / Inv (16) ؛ q22 ؛ (p13).

**الكلمات المفتاحية :** سرطان الدم النخاعي الحاد، انقلاب الكروموسومات، جين CBFβ، جين MYH11، النمط

النووي، FISH.

# Glossaire :

- **Anémie** : dont les conséquences cliniques sont une fatigue, essoufflement, palpitations, tachycardie et une pâleur.
- **Grefe autologue** : aussi appelée autogrefe, elle consiste à prélever des cellules souches chez un patient et à lui réinjecter après un traitement de chimiothérapie et/ou radiothérapie à forte intensité destiné à éliminer des cellules tumorales, résistantes aux traitements standards.
- **Hyperleucocytose** : l'augmentation du nombre de globules blancs en rapport avec le passage des blastes médullaire au niveau du sang périphérique. quand elle est importante, elle peut causer un syndrome d'hyperviscosité ou de leucostase avec des troubles de la microcirculation et de la perfusion tissulaire. Ceci est particulièrement redouté dans les LAM à composante monocyttaire
- **Hypertrophie** : augmentation du volume d'un organe comme les ganglions, la rate, le foie, la gencive.
- **Infections dues à la neutropénie** (diminution du nombre de neutrophiles circulants) dont la gravité est liée à la sévérité de cette neutropénie : infections bactériennes ou fongiques.
- **Syndrome de leucostase** : ou syndrome leucostatique, désigne l'accumulation anormale des globules blancs dans les vaisseaux cellulaires sanguins. Cet amas sous forme d'un caillot bloque la circulation sanguine, c'est en principe la conséquence d'une hyperleucocytose, elle-même le plus souvent causée par une leucémie hyperleucocytaire.
- **Thrombopénie** : (baisse de nombre de thrombocytes ou plaquettes sanguines) ce qui provoque des saignements ou Syndromes hémorragiques présents dans 90% des leucémies aiguës en particulier au niveau des muqueuses (nez, gencive) et de la peau (hématomes) voire viscérale



# ***sommaire***

Introduction

## **Chapitre I : Etude bibliographique**

I. La cytogénétique.....	3
I.1 Historique.....	3
I.2 Définition.....	3
I.3 Rappels sur le cycle cellulaire.....	4
I.3.1 Le cycle cellulaire.....	4
I.3.2 Les accidents du cycle cellulaire.....	4
I.4 Méthodes d'étude des chromosomes.....	4
I.4.1 La cytogénétique conventionnelle (le caryotype).....	4
I.4.1.a La morphologie du chromosome métaphasique.....	5
*les bandes chromosomiques.....	6
I.4.1.b Anomalies du caryotype.....	7
*Anomalies du nombre.....	7
*Anomalies de la structure.....	7
*Anomalies équilibrées.....	8
I.4.2 La cytogénétique moléculaire (FISH).....	9
I.4.2.a Un peu d'histoire.....	9
I.4.2.b Principe.....	9
I.4.3 Les cibles.....	10
*La FISH sur métaphase.....	10
*La FISH interphasique.....	10
I.4.4 Les sondes.....	10
a- Les sondes centromériques.....	10
b- Les sondes de peinture chromosomique.....	10
c- Les sondes spécifiques de locus.....	11
I.4.5 Les fluorochromes.....	11
II. La physiologie et la physiopathologie du sang.....	11
II.1 Hématopoïèse.....	11
II.2 La Leucémogénèse.....	12
III. Leucémie aigue (LA).....	13
III.1.Définition.....	13

III.2 Les facteurs de risque.....	13
IV. Leucémie Aigue Myéloïde.....	14
IV.1 Définition.....	14
IV.2 Classification.....	14
IV.3 Leucémie Aigue avec inversion (16)/ t (16 ;16).....	15
IV.3.1 Définition.....	15
IV.3.2 Epidémiologie.....	16
IV.3.3 Physiopathologie de LAM avec inv (16)/t(16 ;16).....	16
V. Les LAM du groupe Core Binding Factor (CBF).....	17
V.1.a Rôle de la protéine CBFβ.....	17
V.1.b Rôle de la protéine MYH11.....	17
V.2 Le gène de fusion CBFβ -MYH11.....	17
V.3 L'implication des mutations C-KIT et FLT3 dans LAM avec inv(16)/t(16 ;16).....	18
V.3.a La mutation C-KIT.....	18
V.3.b La mutation FLT3.....	19
VI. Signes cliniques.....	20
VII. Diagnostic de LAM4.....	20
*Hémogramme.....	20
*Myélogramme.....	21
*Immunophynotypage (CMF).....	21
VIII. Le pronostic selon la cytogénétique conventionnelle et moléculaire....	22
VII. Traitement de la leucémie aigue myéloïde avec Inv(16).....	23

## **Chapitre: Matériels et méthodes**

I. Le matériel.....	25
II. Méthodes.....	25
II.1 Echantillonnage.....	26
II.1.1 Prélèvement.....	26
II.1.2 Le comptage de cellules mononuclées.....	26
II.2 Mise en culture cellulaire (24h avec synchronisation).....	26
II.3 La sortie de culture.....	27
II.4 L'étalement.....	28
II.5 Le protocole de la cytogénétique conventionnelle (bandes R).....	28

II.6 Protocole FISH.....	29
--------------------------	----

### **Chapitre III: Résultats et discussions**

I. Résultats.....	34
I.1 Présentation de 6 cas de LAM avec Inv(16).....	34
II. Discussion.....	41
II.1 Selon l'hémogramme.....	41
II.2 Selon le myélogramme.....	41
II.3 Selon le caryotype.....	42
II.4 Selon la FISH.....	42
III. Etude rétrospective d'impacts thérapeutique et pronostique de l'inversion(16) (p13 ;q22)/translocation (16 ;16)( CBFβ-MYH11).....	45
III.1 Introduction.....	45
III.2 Patients.....	45
III.3 Méthodes.....	45
III.4 Résultats.....	46
III.5 Commentaires.....	46
IV. Conclusion générale.....	47
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>48</b>
<b>Annexe.....</b>	<b>60</b>

## Liste des figures :

<b>Figure</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
1	La morphologie du chromosome métaphasique	5
2	Caryotype de type homme normal (46, XY)	6
3	Les aberrations chromosomiques de structure	8
4	Principe de la cytogénétique moléculaire	10
5	Types de sondes utilisées en hybridation in situ	11
6	Les facteurs de transcription au cours de l'hématopoïèse	12
7	Comparaison entre l'hématopoïèse normal et leucémeugénèse	13
8	Localisation des gènes CBF $\beta$ et MYH11 dans le chromosome 16	16
9	Effets pathologiques de la protéine de fusion CBF $\beta$ -SMMHC	18
10	Voies de transduction du signal en aval de C-KIT	19
11	Schéma de la tyrosine kinase du récepteur FLT3	20
12	Frottis d'aspiration de la moelle osseuse présentant une LAM	21
13	Image du caryotype et de la FISH montrant une inv(16) et une t(16 ;16)	23
14	Caryotype du patient N°1 ; 47, XY, +22, Inv(16) (p13 ; q22)	35
15	FISH du patient N°1 ; Inv (16) sur 20 mitoses, 98% des noyaux.	35
16	Caryotype du patient N° 2 ; 46 XX, Inv(16) (p13 ; q22).	36
17	FISH du patient N° 2 ; Inv(16) sur 02 mitoses et 100% des noyaux.	36
18	Caryotype du patient N° 3; 47 XY, +8, Inv(16)(p13;q22)	37
19	FISH du patient N° 3 ; Inv(16), t(16q22;V) sur 6 mitoses et 97% es noyaux	37
20	Caryotype du patient N° 4 ; 46XX, Inv(16)(p13 ; q22).	38
21	FISH du patient N° 4 ; Inv(16) sur 8 mitoses et 96% des noyaux	38

22	Caryotype du patient N° 5 ; 46 XX, Inv(16)(p13 ; q22).	39
23	FISH du patient N° 5 ; Inv(16) sur 10 mitoses et 98% des noyaux	39
24	Caryotype du patient N° 6; 46 XY, Inv(16) (p13;q22)	40
25	FISH du patient N° 6 ; Inv (16) sur 10 mitoses et 100% des noyaux avec del (16p13).	40

## Liste des tableaux :

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
I	Classification de l'OMS des néoplasmes myéloïdes et des leucémies aigues	14
II	La présentation des cas ayant une inv(16)	34
III	L'hémogramme de six patients d'une LAM	34
IV	Caractéristiques des patients	46

## Liste des abréviations :

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléotide  
**ARFs** : ADP-Ribosylation Factors  
**ARN**: Acide Ribonucléique  
**CBF** : Core-Binding Factor  
**CSH** : Cellules Souches Hématopoïétiques  
**DAPI** : Di-Amidino-Phenyl-Indole  
**EDTA** : Acide Ethylène Diamine Tétracétique  
**FAB** : Franco-Americano-Britannique  
**FCH** : Facteurs de Croissance Hémato  
**FITC** : Fluorescein Isothiocyanate  
**FISH** : Fluorescence In Situ Hybridization  
**FL** : Ligand Flt3.  
**HDAC** : Histone Déacétylase  
**JAK** : Janus Kinase  
**LA** : Leucémie Aigue  
**LAM** : Leucémie Myéloïde Aigue  
**MO** : Moelle Osseuse  
**MYH** : Myosin Heavy Chain  
**M4Eo** : Myéloïde type 4 avec Eosinophilé  
**NaCl** : Chlorure de Sodium  
**NaOH** : Hydroxyde de Sodium  
**OMS** : Organisation Mondiale de Santé  
**PBS** : Phosphate-Buffered Saline  
**PCR**: Polymorphisme Chain Reaction  
**PI3K** : Phosphoinositide 3-Kinase  
**TSGS** : Gènes Suppresseurs de Tumeurs  
**RAS** : Retrovirus Associated Sequences  
**RPMI** :Roswell Park Memorial Institute Medium  
**RT-PCR**: Reverse Transcriptase-Polymérase Chain Reaction  
**RUNX** : Runt-related Protein  
**SCF** : Facteur de Cellules Souches  
**SCC** : Squamous Cell Carcinoma  
**SFK** : Kinase de Famille Src  
**SMMHC** : Smooth Muscle Myosin Heavy Chain  
**STAT** : Signal Transducers and Activators of Transcription

## Introduction

La leucémie est une prolifération maligne clonale de cellules sanguines immatures dites « leucoblastes » ou « blastes » se développant dans la moelle osseuse à partir d'une cellule souche hématopoïétique aboutissant à l'inhibition de la production de cellules sanguines normales à l'origine de cytopénies sanguines, avec passage de ces leucoblastes vers le sang périphérique et les autres organes hématopoïétiques réalisant de ce fait un syndrome tumoral. La leucémie est dite myéloïde ou lymphoïde, selon la lignée atteinte et est classée en deux catégories évolutives, chronique ou aigue (An Q et al, 2017).

La leucémie aiguë myéloïde (LAM) est une maladie génétiquement hétérogène, elle est subdivisée selon la classification FAB (Franco-Américano-Britannique) en 8 sous-types (de M0 à M7) pathogénétiquement différents en fonction de leur profil de mutation (Guilbert et al, 2015).

La leucémie myéloïde aigue est souvent liée à une inversion 16 : inv(16) (p13q22) qui est plus fréquemment corrélée au type FAB LAM4 associée à des éosinophiles atypiques dans la moelle osseuse. Elle génère un gène de fusion 5'CBFβ-3'MYH11 qui donne une protéine chimérique de fusion CBFβ-MYH11 qui bloque le processus de différenciation des cellules leucémiques par la séquestration d'un facteur de régulation principal CBFα2 (Liang et al, 2011).

Les analyses cytogénétiques détectent les anomalies chromosomiques de la leucémie aigue myéloïde grâce à plusieurs examens réalisées dans le laboratoire de cytogénétique en utilisant les techniques conventionnelles (Caryotype) et surtout moléculaires (FISH) dans le but d'établir un diagnostic cytogénétique.

Les leucémies myéloïdes aiguës associées à des anomalies chromosomiques inv(16) ou t(16,16) ont un bon pronostic (pronostic favorable) (Delaunay et al, 2003).

Les objectifs de notre étude sont :

- 1- de réaliser durant notre stage pratique différentes techniques de cytogénétique ; à savoir : le caryotype en bandes R et l'Hybridation In Situ Fluorescente (FISH) centrées sur le diagnostic de l'inversion (16)(p13;q22)/translocation (16;16)(CBFβ-MYH11) dans les leucémies aiguës myéloïdes.
- 2- de situer la place de l'inversion (16) (p13;q22)/translocation (16;16)(CBFβ-MYH11) dans les leucémies aiguës myéloïdes.

Pour ce faire, une étude rétrospective des cas index recrutés sur une période de 8 ans (2009-2017) sera présentée pour évaluer son impact sur le traitement et le pronostic de cette anomalie.



# **Chapitre I :**

## **Etude bibliographique**

## I. La cytogénétique

### I.1 Historique

La cytogénétique est née au début du vingtième siècle par la découverte microscopique des chromosomes (von Hanseman, 1891).

En 1956, Albert Levan et Joe Hin Tjio concluent à l'existence de 46 chromosomes humains ; cette découverte est à la base de l'étude de caryotype humain.

En 1970, la cytogénétique va connaître un nouvel essor grâce aux techniques de marquage chromosomique, qui permettront d'analyser la structure des chromosomes sous la forme de séquences de bandes par une dénaturation par la trypsine (bandes G) ou par la chaleur (bandes R). Ceci a permis la mise en évidence d'un éventail de pathologies chromosomiques de structures (monosomies et trisomies partielles, translocations, inversions déséquilibrées, etc.)

Dans les années 1990, la cytogénétique moléculaire fait son apparition par l'utilisation de sondes marquées par des fluorochromes (marquage non radioactif), et l'amélioration des microscopes. Le développement des méthodes d'hybridation in situ d'ADN ou d'ARN a permis la localisation génique et le début de la cartographie physique du génome.

Parallèlement, la mise en place de sondes correspondantes aux pathologies les plus connues va devenir un outil de diagnostic fin, permettant de détecter des micro-délétions et d'autres remaniements (Berger, 2009).

### I.2 Définition

La cytogénétique est un domaine d'études qui traite des chromosomes et des anomalies relatives. L'analyse cytogénétique joue un rôle critique dans le diagnostic, le typage, le pronostic et la thérapeutique de plusieurs pathologies en particulier la leucémie aigue myéloïde (LAM) (Caignec, 2010).

Elle est devenue une technique essentielle qui aide à :

- Caractériser des cellules cancéreuses.
- Etudier des anomalies chromosomiques qui peuvent être de nombre ou de structure.
- La compréhension des mécanismes de la leucémogénèse.
- Caractériser l'agressivité de la leucémie.

## I.3 Rappels sur le cycle cellulaire

### I.3.1 Le cycle cellulaire

La division cellulaire est le processus fondamental par lequel une cellule mère donne deux cellules-filles identiques entre elles et à la cellule dont elles dérivent. Le « cycle cellulaire » est constitué de deux temps :

\***L'interphase** : au cours de laquelle les chromosomes sont répliqués, sur 3 phases :

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

\***La mitose** : au cours de laquelle les chromosomes se répartissent entre les deux cellules filles : elle est constituée de quatre phases (la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase) (Meijer, 2003).

La métaphase est le stade pendant lequel un caryotype peut être réalisé grâce à la grande condensation des chromosomes.

### I.3.2 Les Accidents du cycle cellulaire :

La mitose est un processus physiologique au cours duquel la cellule subit des changements importants dans son ultra structure, aboutissant à la formation de deux cellules filles dont le support génétique est l'ADN des chromosomes. Ces chromosomes peuvent être accidentellement endommagés, à l'origine de différentes anomalies de nombre et ou de structure.

## I.4 Méthodes d'étude des chromosomes

### 1.4.1 La cytogénétique conventionnelle (le caryotype) :

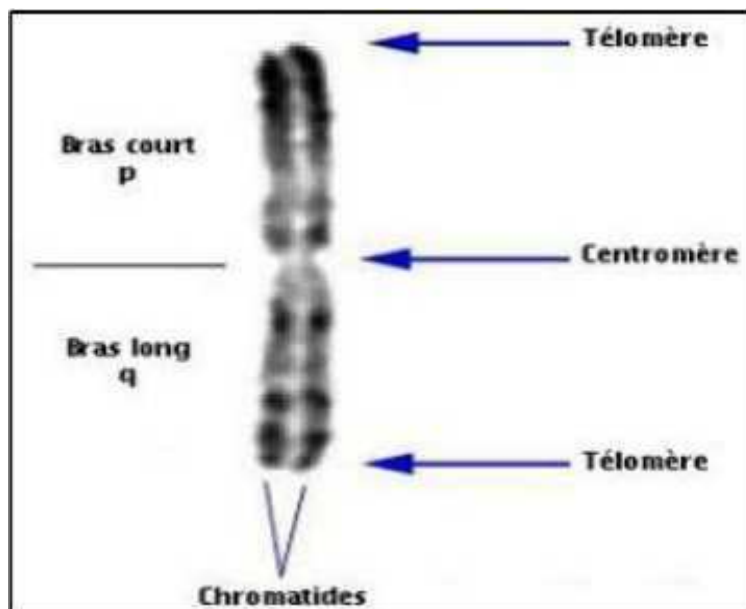
Le caryotype est une photographie de l'ensemble des chromosomes d'une cellule. Il est basé sur l'analyse de la constitution chromosomique de l'individu.

La réalisation d'un caryotype nécessite le prélèvement de cellules, leur mise en culture, la sortie de culture, les étalements cellulaires, la dénaturation chromosomique et la photographie des chromosomes qui les composent à l'aide d'un photo-microscope.

Le caryotype humain comporte 46 chromosomes, soit 22 paires d'autosomes et une paire de gonosomes: deux chromosomes X dans le sexe féminin ; un X et un Y dans le sexe masculin. Le caryotype normal s'écrit : 46, XX ou 46, XY (Caignec, 2011).

### I.4.1.a La morphologie du chromosome métaphasique

Chaque chromosome est constitué de deux chromatides, et chaque chromatide représentant une des deux molécules d'ADN identiques. Ces deux chromatides sont reliés par un centromère, qui représente un repère qui permet de séparer le chromosome en deux régions principales : un bras court (p) et un bras long q. (figure1)



**Figure 1** : La morphologie du chromosome métaphasique (Soukaina, 2015).

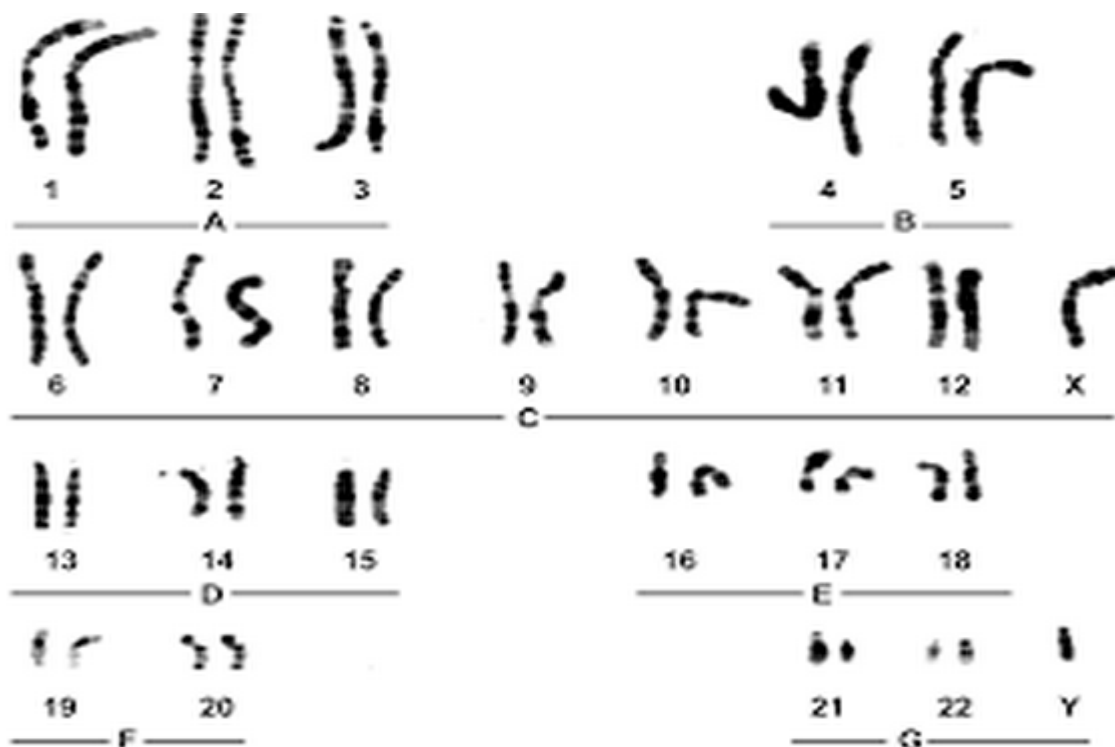
Les chromosomes sont classés en fonction de leur taille décroissante, leur indice centromérique et la distribution des bandes chromosomiques.

L'indice centromérique permet de distinguer les trois groupes de chromosomes :

- **Métacentrique** : le bras p est égale au bras q.
- **Submétacentrique** : le bras p est inférieur au bras q.
- **Acrocentrique** : le bras p est nettement inférieur au bras long (les bras courts sont très réduits et sont porteurs de satellites).

En fonction de la taille et de la position du centromère, les chromosomes sont classés en 7 groupes (**figure2**) :

- **Groupe A** : grands métacentriques (1-2-3).
- **Groupe B** : grands submétacentriques (4-5).
- **Groupe C** : moyens submétacentriques (6-7-8-9-10-11-12 et X).
- **Groupe D** : grands acrocentriques (13-14-15).
- **Groupe E** : petits submétacentriques (16-17-18).
- **Groupe F** : petits métacentriques (19-20).
- **Groupe G** : petits acrocentriques (21-22 et Y)



**Figure 2 :** Caryotype de type homme normal, (46, XY), préparé et classé selon la méthode Classique, basée sur la longueur des bras et la position du centromère (Rajaraman, 2014).

### Les bandes chromosomiques :

Sur chaque chromosome, on définit différentes parties (régions) ; les régions sont subdivisées en divers bandes ; les bandes sont subdivisées en plusieurs sous-bandes, et ceci permet de nommer chaque portion du chromosome (Rumpler, 2000).

Les bandes chromosomiques sont caractéristiques de chacune des paires. Le nombre de bandes visibles est variable d'une mitose à l'autre et dépend du niveau de condensation du chromosome. Plus les chromosomes sont condensés, moins on peut observer de bandes et moins l'analyse permet de dépister des anomalies de petite taille (Nassiri, 2004).

Les différents types de bandes chromosomiques :

- **Les bandes G :** obtenues par digestion trypsinique modérée des chromosomes. Elles sont les plus utilisées en raison de leur facilité d'obtention.
- **Les bandes R (Reverse) :** dénaturation thermique des chromosomes puis coloration par Giemsa.
- **Bandes C :** cette coloration par le Sulfate de Baryum permet de mettre en évidence l'hétérochromatine constitutive, qui correspond à des régions non codantes du génome comme les régions centromériques.

- **Bandes Q** : obtenues après coloration par la moutarde de Quinacrine. Sous UV les chromosomes présentent des bandes fluorescentes, de même que les bandes G.
- **Bandes T** : une dénaturation thermique poussée ne laisse persister le marquage qu'au niveau des télomères.

#### I.4.1.b Anomalies du caryotype

On appelle anomalie chromosomique tout remaniement du nombre ou de structure des chromosomes. Ces remaniements peuvent s'observer de manière :

- **Constitutionnelle** : les différents organes ont la même anomalie. L'accident chromosomique existait déjà chez l'embryon ; il s'est produit avant la fécondation.
- **Acquise** : un seul organe est touché, les autres organes sont normaux.

Ces anomalies (constitutionnelles ou acquises) peuvent être homogènes quand toutes les cellules examinées portent l'anomalie ou en mosaïques lorsqu'une fraction seulement des cellules est anormale sur plusieurs clones (Bott et al, 2006).

##### ➤ Anomalies du nombre :

- **La polyplôïdie** : Une cellule polyplôïde renferme un multiple de lots haploïdes de chromosomes. C'est l'accident survenant en général lors de la fécondation pour l'anomalie constitutionnelle ; elle peut aussi être acquise (Cancers):

Exemples :

- **Triploïdies** :  $3N = 69$  chromosomes : 69, XXX ou 69, XXY
- **Tétraploïdies** :  $4N = 92$  chromosomes
- **Les aneuploïdies**: Une cellule aneuploïde est une cellule qui possède un nombre anormal de chromosomes par perte d'un chromosome entier ou présence d'un ou plusieurs chromosomes surnuméraires.

Exemple : une trisomie correspond à la présence d'un chromosome supplémentaire. Le nombre de chromosomes est donc de 47 et non plus de 46.

##### ➤ Anomalies de structure :

##### Anomalies déséquilibrées :

1. **La délétion** : Les délétions résultent d'une cassure chromosomique avec perte du segment distal (délétion terminale), ou de deux cassures sur un même bras chromosomique avec perte du segment intercalaire (délétion intercalaire) (Nayazic, 2015).
2. **Duplication** : Une duplication se définit comme la répétition une ou deux fois d'un segment de chromosome. Le segment dupliqué peut être dans la même orientation ou inversé à  $180^\circ$  par rapport au segment d'origine.

3. **Isochromosome** : est un chromosome anormal formé de deux bras longs ou de deux bras courts d'un même chromosome avec perte de l'autre bras (Nayazic, 2015).

➤ **Anomalies équilibrées :**

1. **L'insertion** : Il s'agit d'un cas particulier de translocation, avec transfert d'un segment chromosomique intercalaire à l'intérieur d'un autre chromosome.

2. **L'inversion** : Une inversion résulte de deux cassures sur un même chromosome suivies de recollement après inversion du segment intermédiaire.

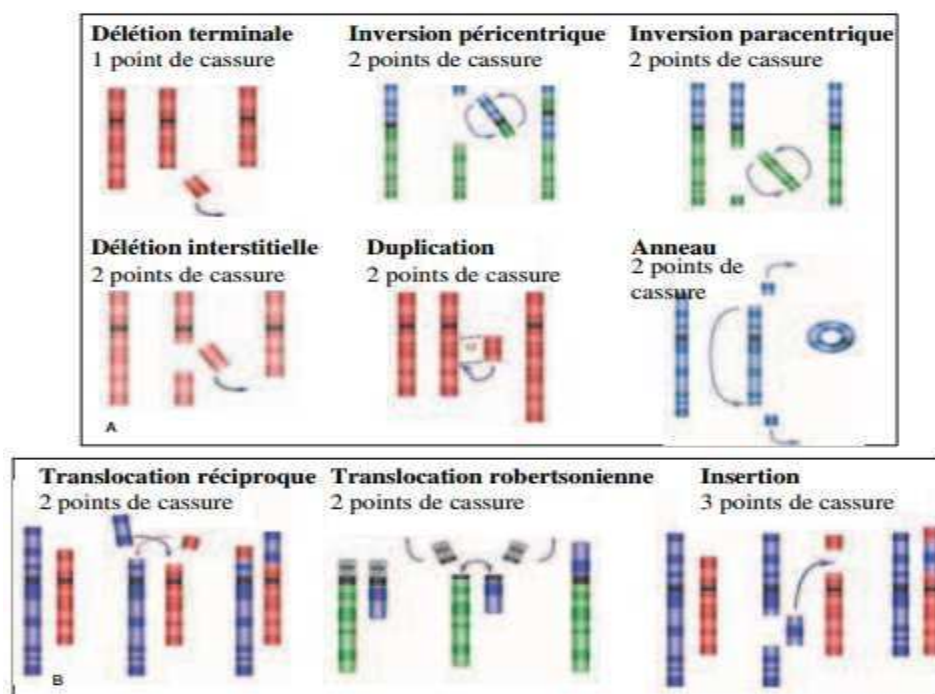
- **L'inversion paracentrique** : les points de cassure sont localisés sur un même bras.

- **L'inversion péricentrique** : les points de cassure sont localisés de part et d'autres du centromère.

3. **La translocation** : C'est la transposition d'un fragment chromosomique sur un autre chromosome suite à une cassure chromosomique.

- **Translocation réciproque** : Il s'agit d'un échange de matériel entre deux chromosomes non homologues après cassure sur chacun des chromosomes impliqués.

- **Translocation robertsonienne** : Translocation impliquant deux chromosomes acrocentriques dont le bras court de très petite taille ne code que pour des motifs répétés.



**Figure 3** : Les aberrations chromosomiques de structure. (A) impliquant un seul chromosome. (B) impliquant deux chromosomes (Mylène, 2009).

## **I.4.2 La cytogénétique moléculaire (L'Hybridation In Situ en Fluorescence FISH)**

La cytogénétique moléculaire faisant généralement référence à l'hybridation in situ (FISH) est un atout précieux complémentaire de la cytogénétique conventionnelle (caryotype). Elle a réussi à ouvrir une voie pour identifier plus précisément des anomalies génétiques que ne révèle pas le caryotype seul.

### **I.4.2.a Un peu d'histoire**

En 1981, l'équipe de David Ward intègre par voie chimique un nucléotide (du dUTP) couplé à la biotine (sonde) dans un fragment d'ADN dénaturé, puis hybridé sur des préparations chromosomiques, elles aussi préalablement dénaturées. La sonde est révélée par des anticorps anti-biotine couplés à un fluorochrome, le FITC. Grâce à un microscope qui émet un faisceau lumineux excitant le FITC, David Ward visualisa directement sur des chromosomes la localisation de la sonde.

### **I.4.2.b Principe**

L'hybridation in situ en fluorescence (FISH) est une technique régulièrement utilisée dans la recherche et le diagnostic des hémopathies malignes pour localiser la présence de séquences d'ADN dans les chromosomes et les noyaux de cellules cancéreuses (Kakoli et al, 2013).

Cette méthode repose sur l'utilisation d'une sonde (séquence d'ADN ou d'ARN) marquée chimiquement pour pouvoir être repérée par la suite. Cette dernière s'hybride c'est-à-dire elle se fixe d'une façon très spécifique à sa séquence complémentaire sur des chromosomes préparés avant et fixés sur des lames. La sonde est marquée à l'aide d'un fluorochrome et son signal sera visualisé par un microscope à fluorescence pour permettre la détection de la séquence nucléotidique recherchée (Wan, 2017).

Un objectif important de son développement est de permettre de trouver une résolution pour identifier les réarrangements chromosomiques à l'aide de ses éléments cruciaux qui sont: la sonde et la cible.

La résolution de la cible est de deux types, la capacité d'étudier des chromosomes entiers métaphasiques et des noyaux interphasiques (Speicher et al, 2005).



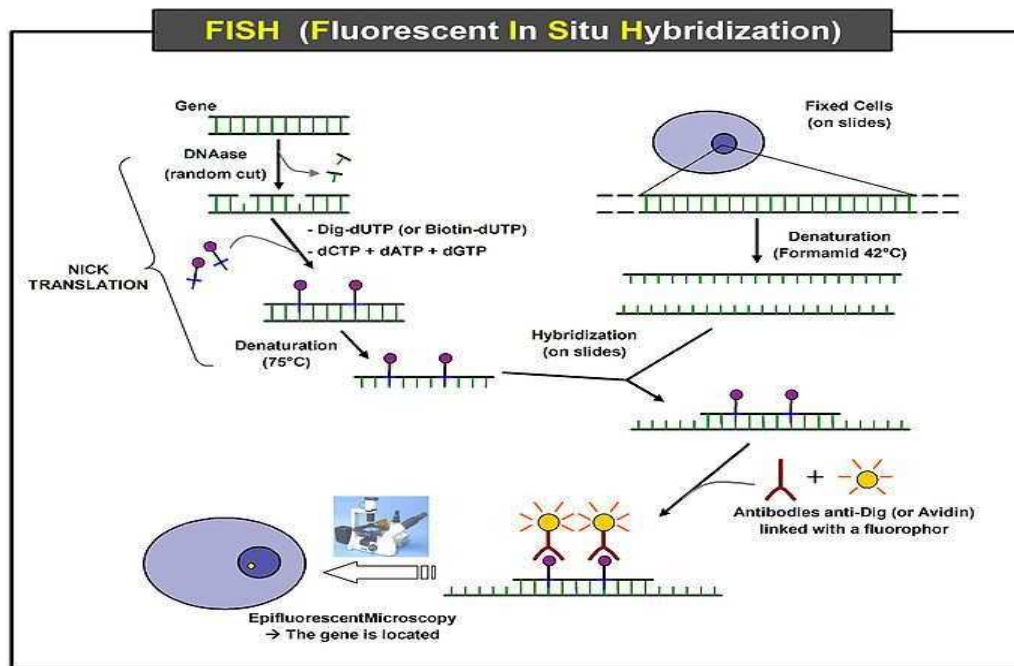


Figure 4: Principe de la cytogénétique moléculaire (Soukaina, 2015).

### I.4.3 Les cibles

#### ➤ La FISH sur métaphase (un complément du caryotype) :

Technique qui repose sur la préparation de noyaux et mitoses (résultat d'une culture cellulaire). Cette technique permet :

- Le diagnostic cytogénétique des syndromes micro-délétionels.
- La caractérisation d'anomalies chromosomiques non détectées par caryotype.
- Détection de translocations télémétriques cryptiques équilibrées.

#### ➤ La FISH interphasique

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

### I.4.4 Les sondes :

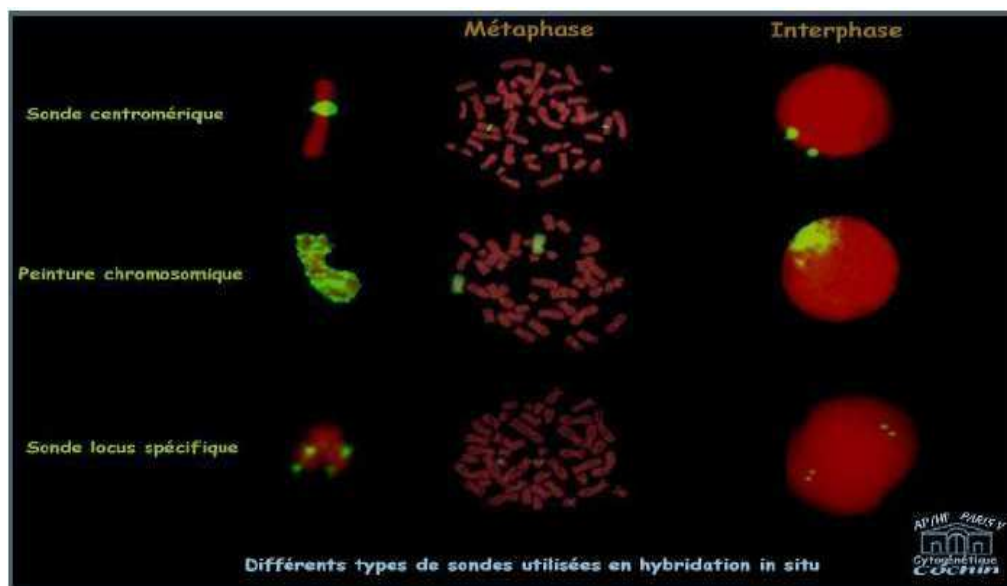
Avec les progrès des techniques, il est possible de générer aujourd'hui des fragments d'ADN de tailles variées correspondant à différentes parties d'un chromosome.

Il existe plusieurs types de sondes : spécifiques de régions chromosomiques ou capables de s'hybrider sur les bras d'une paire chromosomique donnée.

a) **Des sondes centromériques** : Elles sont conçues pour identifier les sondes répétitives ciblant la séquence de répétition en tandem de l'ADN satellite dans le centromère d'un chromosome donné.

b) **Les sondes de peinture chromosomique** : Spécifiques d'un chromosome entier ou d'une partie de ce chromosome c'est-à-dire de son bras court ou son bras long pour étudier la structure, identifier des translocations complexes.

c) **Les sondes spécifiques de locus** : sont de petites tailles, conçues pour identifier un gène ou une région chromosomique spécifique lors d'un réarrangement structural (micro-délétion, inversion, translocation) (Kakoli et al, 2013).



**Figure 5** : Types de sondes utilisées en hybridation in situ (Dupont, 2008).

#### I.4.5 Les fluorochromes

Les fluorochromes sont des molécules capables d'être excitées par une longueur d'onde donnée, appelée longueur d'onde d'excitation ( $\lambda_{exc}$ ) et de restituer une partie de cette énergie sous l'aspect d'une longueur d'onde de moindre énergie appelée longueur d'onde d'émission ( $\lambda_{em}$ ). Ils sont donc tous caractérisés par une longueur d'onde d'excitation et une longueur d'onde d'émission. Exemples: le DAPI, le FITC, Rhodamine, Texas Red, Acqua.

## II-La physiologie et la physiopathologie du sang

### II.1 Hématopoïèse

L'hématopoïèse est un processus physiologique hiérarchisé qui permet la production continue et régulée des éléments figurés du sang (hématies, polynucléaires, monocytes, lymphocytes et plaquettes) à travers différentes étapes de différenciation et d'expansion. La pérennité du système hématopoïétique est assurée par un pool rare et minoritaire de cellules multipotentes résidentes de la moelle osseuse (MO), les cellules souches hématopoïétiques CSH (Santos, 2008).

Les CSH sont des cellules indifférenciées et multipotentes avec une capacité accrue d'auto renouvellement, de prolifération et de différenciation. Elles peuvent s'engager vers l'une ou l'autre des lignées hématopoïétiques myéloïde ou lymphoïde.

La survie, la prolifération et la différenciation des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques multipotents sont stimulés par des facteurs de croissance hématopoïétiques (FCH) qui se fixent sur leurs récepteurs spécifiques et par certains facteurs de transcription qui sont indispensables à l'émergence de l'ensemble des lignées hématopoïétiques (Cortes et Labastie, 2000).

Lors de l'hématopoïèse, un équilibre s'établit entre la production de nouvelles cellules souches par division cellulaire (auto-renouvellement), et la production de cellules qui vont s'engager dans une voie de différenciation. Ceci est possible grâce à la capacité des cellules souches à se diviser de manière asymétrique. C'est-à-dire, les CSH peuvent générer deux cellules filles dont une seule restera en contact avec la niche de cellules souches et conservera ses capacités d'auto-renouvellement, tandis que l'autre cellule s'engagera spécifiquement vers une des voies de différenciation (Trecul, 2004).

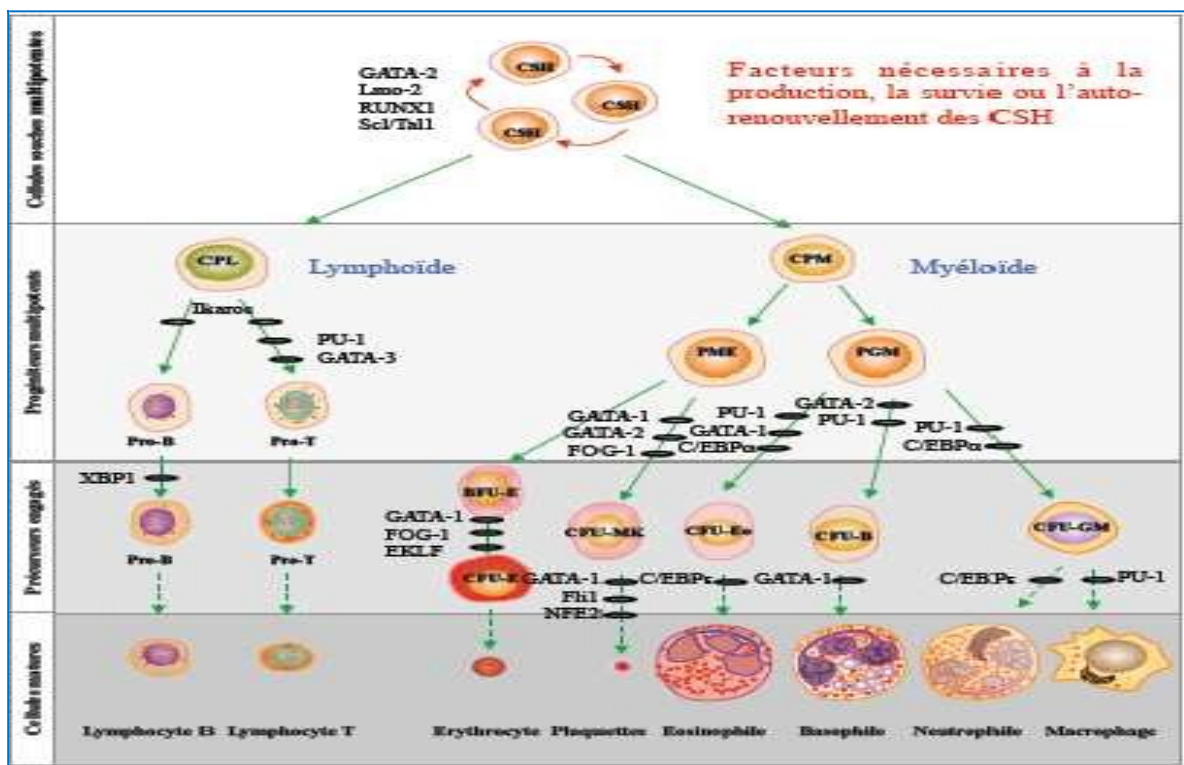
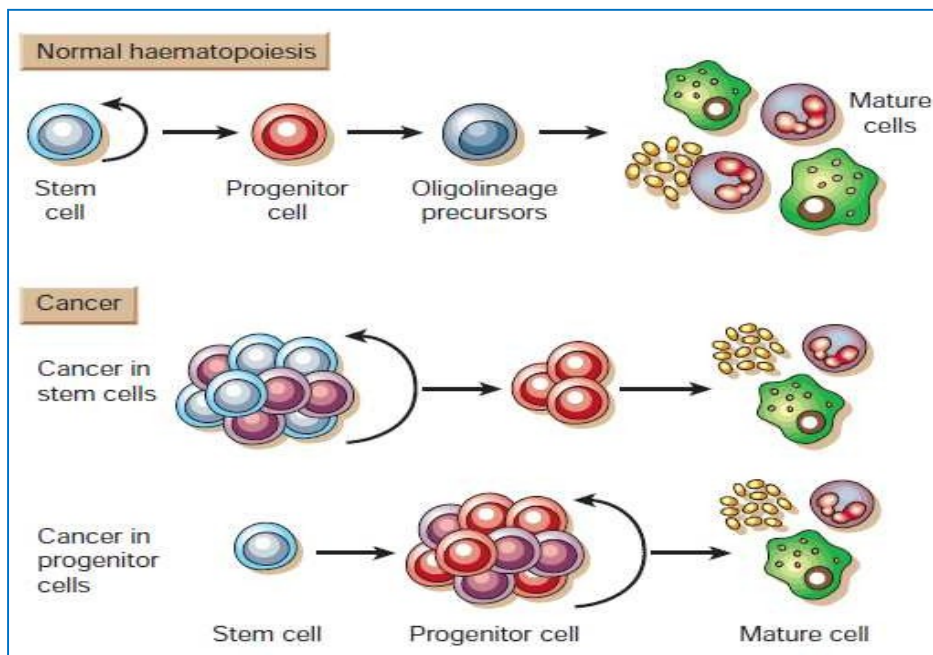


Figure 6 : Les facteurs de transcription au cours de l'hématopoïèse (Trecul, 2004)

## II.2 La Leucémogénèse

La leucémogénèse similaire à la plupart des autres cancers est un processus à plusieurs étapes impliquant des changements structuraux et fonctionnels impliquant une cascade de gènes conduisant à l'expansion clonale de cellules souches défectueuses. Ces altérations géniques comprennent souvent des mutations d'oncogènes et la perte de gènes suppresseurs de tumeurs.

Les leucémies sont des tumeurs qui proviennent de la transformation clonale d'un précurseur hématopoïétique dans la moelle osseuse.



**Figure 7 :** Comparaison entre hématopoïèse normale et la Leucémogénèse (Reya et al, 2001)

### III-leucémie aigue (LA)

#### III.1 Définition

Les leucémies aiguës constituent un ensemble d'hémopathies malignes qui résultent d'une série d'événements mutationnels qui se produisent pendant le processus complexe de l'hématopoïèse. Elles sont caractérisées par des proliférations clonales aiguës, développées à partir des précurseurs hématopoïétiques bloquées à un stade précoce de leur différenciation (les leucoblastes ou blastes) des lignées myéloblastiques ou lymphoblastiques.

Ces proliférations se développent dans la moelle osseuse avec un passage dans le sang et les autres organes hématopoïétiques (rate, ganglions..) et non hématopoïétiques (la peau, système nerveux central) (Hayley et al, 2017).

#### III.2 Les facteurs de risque :

Bien que l'origine exacte de la maladie reste encore inconnue, plusieurs facteurs sociaux et/ou environnementaux semblent influencer le processus de leucémogénèse.

- Les facteurs génétiques : Ce sont des désordres congénitaux prédisposant les individus à la survenue d'une LAM. On retiendra par exemple la trisomie 21, l'anémie de Fanconi ou le syndrome de Bloom.
- L'exposition chronique à des toxiques : tels que le benzène (dans la fumée de cigarette), les solvants organiques ou les radiations ionisantes (Kane et al, 1999).
- La chimiothérapie anticancéreuse : chez les patients initialement traités par chimiothérapie pour une tumeur solide développent une LAM secondaire dont on distingue deux types : celle survenant après exposition aux agents alkylants et celle survenant après traitement aux agents inhibant la Topoisomérase II (DOS SANTOS, 2008).

- Les maladies preleucémiques : Certains syndromes myéloprolifératifs peuvent évoluer en LAM (telle que la leucémie myéloïde chronique, maladie de vaquez, thrombocytémie) et certains syndromes myélodysplasiques (anémies réfractaires, leucémies myélomonocytaire chroniques) (DOS SANTOS, 2008).

#### IV-Leucémie aigue myéloïde

##### IV.1 Définition

La leucémie aiguë myéloïde (LAM) est une prolifération clonale maligne de cellules hématopoïétiques myéloïdes immatures; cette prolifération inhibe la différenciation des autres cellules sanguines. Les cellules malignes immatures (les myéloblastes) s'accumulent dans la moelle osseuse, et passent dans le sang et se propagent parfois à d'autres organes tels que les ganglions, la rate, système nerveux central... (Prada-Arismend, 2016 ; O'Donnell, 2017).

##### IV.2 Classification

Le but d'une classification n'est pas seulement de grouper des maladies avec les mêmes caractéristiques biologiques, mais aussi pour avoir un aperçu de la pathogenèse et de définir des sous-groupes avec différents pronostics et différentes approches thérapeutiques.

Dans les leucémies aiguës, la classification qui était la plus utilisée a été proposée en 1976 par une équipe franco-américano-britannique (FAB); elle est basée sur la morphologie et la cytochimie, elle identifie 8 sous-types de LAM de (M0 à M7) (Segeren et al, 1996).

Depuis 2001, la classification FAB est complétée par celle de l'OMS (Valensi, 2002).

En 2008 puis 2016, l'OMS a de nouveau modifié sa classification, l'objectif étant d'inclure de nouvelles données immunologiques, cytogénétiques et moléculaires, et d'harmoniser les critères définissant les pathologies myéloïdes (Leymarie V, 2004).

**Tableau I** : Classification de l'OMS des néoplasmes myéloïdes et des leucémies aiguës (Arber et al, 2016).

<b>Classification OMS des néoplasmes myéloïdes et de la leucémie aiguë</b>
<b>Leucémie myéloïde aiguë (LAM) et tumeurs associées</b>
<b>LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes :</b>
LAM avec t (8; 21) (q22; q22.1); RUNX1-RUNX1T1.
LAM avec inv (16) (p13.1q22) ou t (16; 16) (p13,1; q22); CBFβ-MYH11.
APL avec PML-RARA.
LAM avec t (9; 11) (p21,3; q23,3); MLLT3-KMT2A.
LAM avec t (6; 9) (p23; q34,1); DEK-NUP214.
LAM avec inv (3) (q21.3q26.2) ou t (3; 3) (q21.3; q26.2); GATA2, MECOM.

LAM (mégacaryoblastique) avec t (1; 22) (p13,3; q13,3); RBM15-MKL1.
Entité provisoire: AML avec BCR-ABL1.
LAM avec NPM1 muté.
LAM avec mutations bialléliques de CEBPA.
Entité provisoire: AML avec RUNX1 muté.
LAM avec modifications liées à la myélodysplasie.
Tumeurs myéloïdes liées au traitement AML, NOS.
LAM avec différenciation minimale.
LAM sans maturation.
LAM avec maturation.
Leucémie myélomonocytaire aiguë.
Leucémie aiguë monoblastique / monocytaire.
Leucémie érythroïde pure.
Leucémie mégacaryoblastique aiguë.
Leucémie basophile aiguë.
Pan myélose aiguë avec myelofibrose.
Sarcome myéloïde
Proliférations myéloïdes liées au syndrome de Down
Myélopoïèse anormale transitoire (TAM)
Leucémie myéloïde associée au syndrome de Down

### IV.3 Leucémie myéloïde aigue avec inversion (16)/t(16 ;16)

#### IV.3.1 Définition

Parmi les anomalies du chromosome 16 dans les néoplasmes myéloïdes, on reconnaît l'inversion (16) ou t(16 ;16) (p13.1 ;q22) . Cette inversion 16 est une anomalie cytogénétique déterminante de la leucémie aigue myéloïde (LAM) avec un pronostic favorable. Elle provoque la fusion de deux gènes, CBF $\beta$  (sous-unité de facteur de transcription CBF) situé en 16q22 avec MYH11 qui code pour une chaîne lourde de la myosine du muscle lisse situé en 16p13.1, qui forme une protéine de fusion CBF $\beta$ -SMMHC. Cette anomalie peut être associée à des anomalies cytogénétiques secondaires telles que les trisomies 21, 22, 8 et del(7q).

Classiquement l'Inv(16) elle est le plus souvent associée aux LAM4Eo de la classification FAB, c'est-à-dire des leucémies aiguës myélomonocytaire associées à une maturation éosinophile médullaire anormale, mais peut se voir dans les autres type FAB (M1, M2, M5) (Heesun et al, 2017).

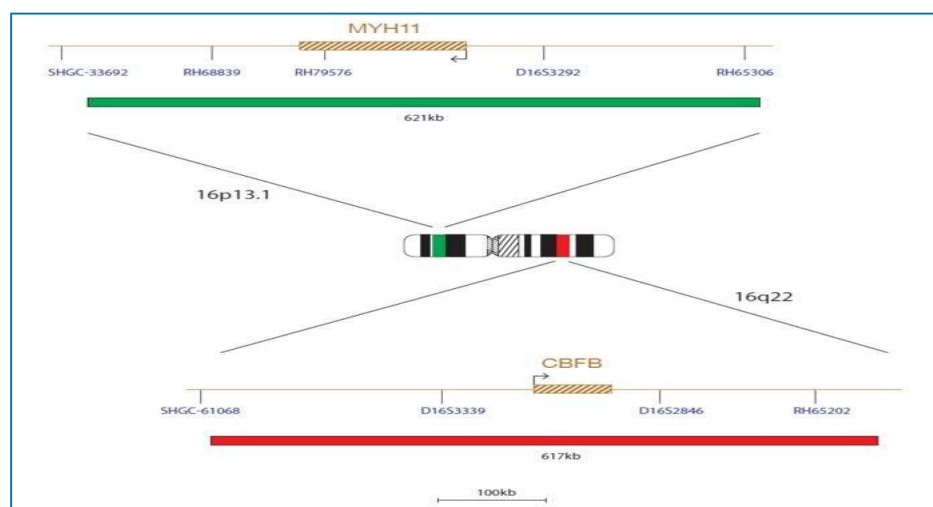
### IV.3.2 Epidémiologie

La leucémie myéloïde aiguë peut se déclarer à n'importe quel âge, mais on observe une augmentation de l'incidence avec l'âge. Elle est la plus courante des leucémies aiguës chez l'adulte (80%). Les personnes âgées sont plus susceptibles de développer une LAM que les adultes plus jeunes et les enfants qui développent surtout une leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) et ce partout dans le monde. Le risque de développer une LAM augmente d'environ 10 fois du début de la trentaine (30 à 34 ans) (environ 1 cas pour 100 000 habitants) à l'âge de 65 à 69 ans (environ 11 cas pour 100 000 habitants). Chez les personnes de plus de 70 ans, le taux d'incidence continue d'augmenter, atteignant un sommet entre 80 et 84 ans (un pic marqué chez les personnes âgées).

Cette augmentation d'incidence est expliquée par l'augmentation des LAM secondaires à une myélodysplasie alors que l'incidence des LAM de novo reste approximativement constante pour tous les groupes d'âge (Poleszczuk, 2015) (Appelbaum, 2015) (Ngamaï, 2010).

### IV.3.3. Physiopathologie de LAM avec *inv(16)/t(16 ;16)*

Dans l'*Inv(16)/t(16;16)*, il s'opère une fusion de la partie NH2-Terminale (contenant le domaine d'hétérodimérisation avec *AML1*) du gène *CBFβ* situé en 16q22 avec la majeure partie du gène *MYH11* (*Myosin Heavy Chain11*) situé en 16p13. Le gène de fusion produit une protéine chimérique *CBFβ-MYH11*. La protéine de fusion *CBFβ-MYH11* conduit à un blocage de la différenciation myéloïde en séquestrant la sous unité *CBFβ* dans le cytoplasme. D'autre part, l'hétérodimère *AML1/CBFβ-MYH11* se comporte également comme un répresseur de la transcription en recrutant d'autres répresseurs et en modifiant l'acétylation des histones. (Speck et al, 2002). Cette entité fait partie des LAM Core Binding Factors (CBF) qui incluent : *t(8 ;21)(q22 ;q22)(RUNX1 ;RUNX1T1)* et l'*Inv(16)/t(16 ;16)(CBFB ;MYH11)*



**Figure 8:** Localisation des gènes *CBFB* et *MYH11* dans le chromosome 16 (Cytocell, 2014).

## **V. Les Leucémies Aigues Myéloblastiques du groupe Core Binding Factor (CBF) :**

Les facteurs de transcription de liaison aux noyaux (CBF) jouent un rôle dans le renouvellement automatique des cellules souches, la différenciation tissulaire et le cancer. Ce sont des complexes hétérodimères composés de deux sous-unités, alpha et bêta, dans lesquels la sous-unité alpha se lie à l'ADN et est codée par l'un des gènes RUNX1 (AML1, CBF $\alpha$ 2), RUNX2 (CBF $\alpha$ 1) et RUNX3 (CBF $\alpha$ 3), alors que la sous-unité bêta (CBF $\beta$ ) ne se lie pas à l'ADN, mais stabilise la liaison de la sous-unité alpha à l'ADN.

CBF $\alpha$  est principalement exprimée au cours du développement hématopoïétique. CBF $\alpha$  et CBF $\beta$  sont fréquemment impliqués dans les altérations chromosomiques associées aux maladies hématopoïétiques, par exemple dans la leucémie myéloïde aiguë avec inv (16 ; 16) (Mandoli. A, 2014).

### **V.1.a Rôle de la protéine CBF $\beta$**

Le gène CBF $\beta$  fournit des instructions pour la fabrication d'une protéine appelée facteur de liaison bêta (CBF $\beta$ ) ; cette protéine aide le complexe à se lier à l'ADN et protège la protéine RUNX (CBF $\alpha$ ) contre la dégradation. La fonction de CBF dépend de la protéine RUNX incluse. Une fois liée à l'ADN, la protéine RUNX1 contrôle l'activité des gènes impliqués dans le développement des cellules sanguines (hématopoïèse) (Genetics home).

### **V.1.b Rôle de la protéine MYH11**

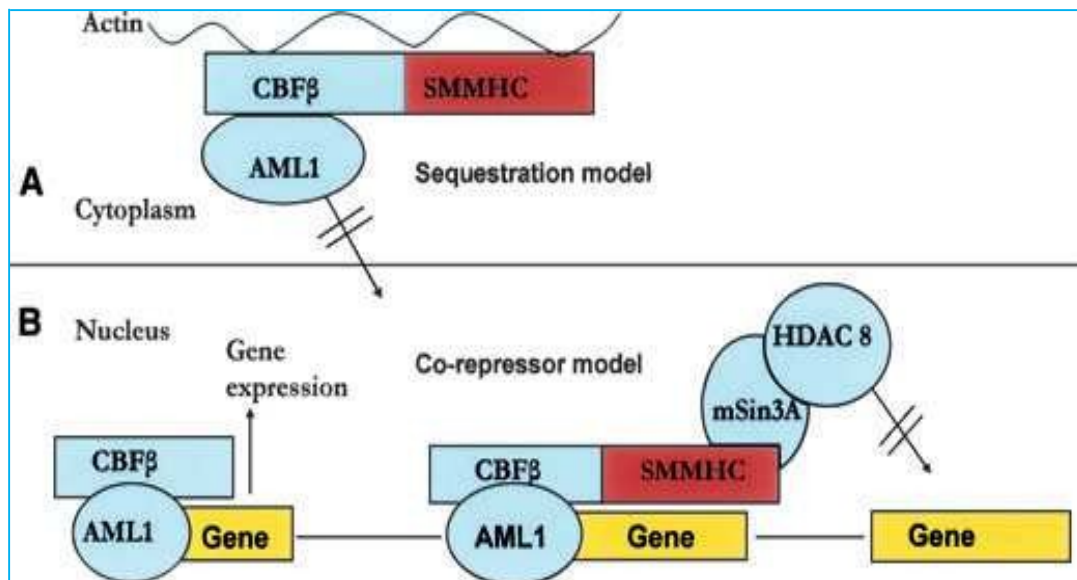
Le gène MYH11 fournit des instructions pour la fabrication d'une protéine appelée chaîne lourde 11 de la myosine du muscle lisse. Il appartient à un groupe de protéines appelées myosines, qui interviennent dans le mouvement cellulaire et le transport des matériaux à l'intérieur et entre les cellules. Des filaments épais constitués de myosine, ainsi que de minces filaments d'une autre protéine appelée actine (Genetics home).

## **V.2 Le gène de fusion CBF $\beta$ -MYH11**

Le gène CBF $\beta$ -MYH11 produit une protéine chimérique CBF $\beta$ -SMMHC qui supprime la fonction de CBF (hétéro dimérique facteur de transcription) composé de CBF $\alpha$ 2 et CBF $\beta$  par la séquestration du CBF $\alpha$ 2 dans le cytoplasme ce qui va inhiber le CBF $\alpha$ 2 médiateur de la transactivation et exprime CBF $\alpha$ 2 médiateur de la répression, donc l'expression de CBF $\beta$ -MYH11 bloque la différenciation hématopoïétique en inhibant la fonction normale de CBF.

La protéine chimérique CBF $\beta$ -SMMHC forme des filaments d'actines et comme CBF $\alpha$ 2 s'associe avec CBF $\beta$ , cette dernière joue un rôle dominant négatif par la séquestration de CBF $\alpha$ 2 dans les filaments du cytosquelette.





**Figure 9** : Effets pathogéniques de la protéine de fusion CBFβ– SMMHC (John T. Reilly, 2004).

### V.3 L'implication des mutations C-KIT et FLT3 dans LAM avec inv (16)/t(16;16)

La déficience fonctionnelle des récepteurs tyrosine kinase est impliquée dans divers types de tumeurs telles que les récepteurs de facteurs de croissance hématopoïétiques C-KIT et FLT3 et leur signalisation dans les cellules normales et malignes.

Les deux récepteurs sont des membres de la même famille de tyrosine kinase et des médiateurs essentiels de la prolifération et de la survie des cellules souches et progénitrices en réponse à des stimuli de ligand provenant du microenvironnement.

Les mutations de gain de fonction rendent les récepteurs activés de manière constitutive et indépendante du ligand, ce qui entraîne une signalisation aberrante qui est une force motrice cruciale dans la tumorigénèse (Masson et Rönnstrand, 2009).

#### V.3.a La mutation C-KIT

Il existe une gamme de différents types de mutations de gain de fonction de c-Kit, notamment des mutations ponctuelles, des délétions et des duplications. Dans CBF/AML, des mutations de C-KIT surviennent dans 30% des cas, et se produisent fréquemment dans l'exon 17 qui code pour la boucle d'activation dans le domaine de la kinase, ce qui entraîne une perturbation des mécanismes auto-inhibiteurs et dans l'exon 8 qui code pour la partie extracellulaire du récepteur de c-kit (Edling et Hallberg, 2007; Riera et al, 2013).

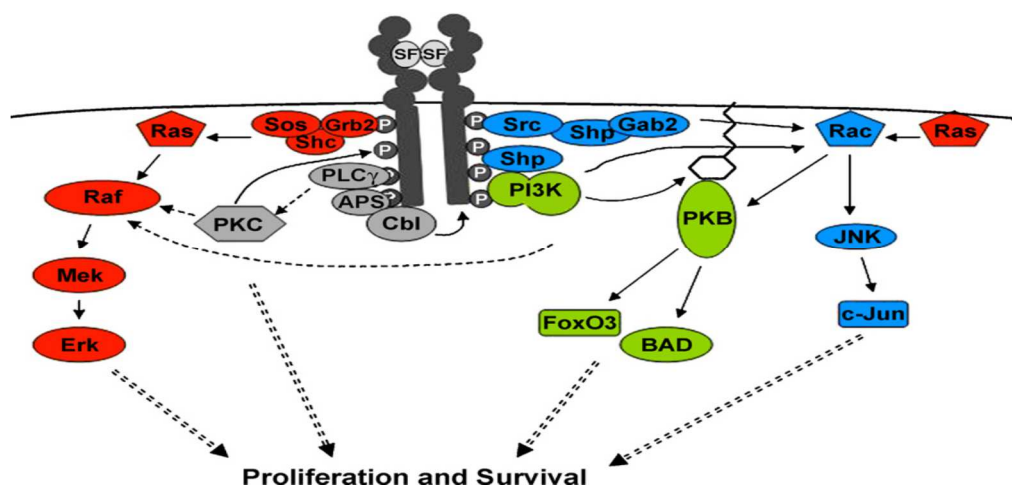
##### ➤ La signalisation de C-KIT

Lors de la liaison de SCF, c-Kit forme un homodimère, à l'origine d'une autophosphorylation des résidus de tyrosine et active diverses cascades de transduction de signal. La tyrosine phosphorylée sert de site d'accueil pour les protéines adaptatrices, les tyrosines phosphatases SHP-1 et SHP-2 et les kinases de la famille Src.

Le résidu tyrosine dans le domaine KI interagit avec la sous-unité régulatrice p85 de la

phosphoinositide-3 kinase (PI3K). Le c-Kit activé induit la phosphorylation de la tyrosine des STAT, soit via des membres de la famille JAK, soit directement par des kinases de la famille Src. L'expression et l'activité de c-Kit sont régulées par l'internalisation, l'ubiquitination et le clivage du domaine extracellulaire via la protéinase C, ainsi que par les phosphatases SHP-1 et SHP-2.

Grâce à diverses voies de transduction du signal, c-Kit affecte le développement et la maintenance de plusieurs systèmes cellulaires. Les mutations de perte de fonction de c-Kit conduisent à des défauts d'hématopoïèse, et de développement de cellules germinales (Malaise, 2009).

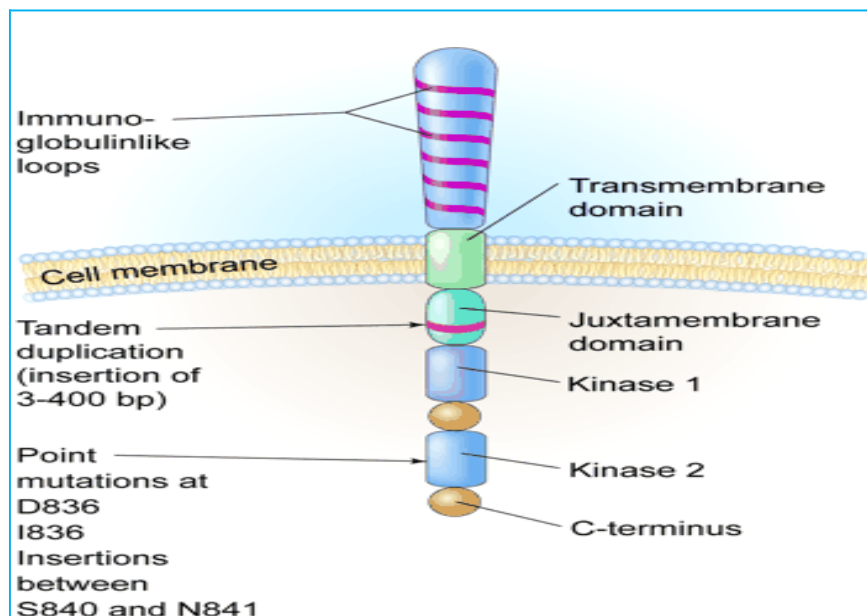


**Figure 10 :** Voies de transduction du signal en aval de c-Kit (Edling, 2007).

### V.3.b La mutation FLT3

FLT3 est une tyrosine kinase transmembranaire activée par un ligand qui est normalement exprimée par les cellules souches ou progénitrices hématopoïétiques et joue un rôle important dans les premiers stades du développement de la lignée tant myéloïde que lymphoïde. Un ligand extracellulaire (ligand FLT3) se lie et active le FLT3, favorisant la survie, la prolifération et la différenciation cellulaires par le biais de diverses voies de signalisation, notamment PI3K, RAS et STAT5.

Des mutations de FLT3 sont retrouvées dans environ 30% des cas de LAM nouvellement diagnostiquées et se manifestent soit par des ITD dans 3% des LAM Inv (16 ; 16), soit par des mutations ponctuelles du TKD dans 22% des cas. Les mutations FLT3-ITD et FLT3-TKD activent de manière constitutive l'activité de la kinase FLT3, entraînant la prolifération et la survie des LAM (Daver et al, 2019 ; duployez, 2016).



**Figure 11** : Schéma de la tyrosine kinase du récepteur FLT3 montrant l'emplacement de la duplication en tandem interne de gènes dans le domaine juxta membranaire et de mutations ponctuelles et d'insertions de gènes dans le deuxième domaine de kinase. Illustration de Kenneth Probst (Litzow, 2005).

## VI. Signes cliniques

- Manifestations tumorales : Hypertrophie gengivale, Lésions cutanée, Syndrome de leucostase (Forme très hyperleucocytaires) (DOS SANTOS, 2008).
- Insuffisance médullaire : Syndrome anémique, infectieux et hémorragique (Poleszczuk, 2015).

## VII. Diagnostic de la LAM4

Le diagnostic est basé sur des éléments biologiques :

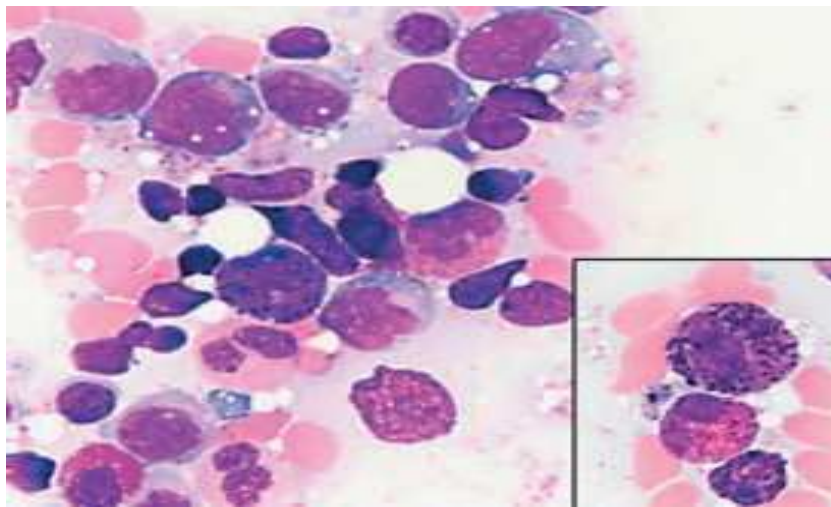
### Hémogramme (numération de la formule sanguine FNS) :

L'hémogramme est un examen simple, peu coûteux, standardisé et automatique ; permet de quantifier (numération) et de qualifier les éléments figurés du sang (frottis sanguin : globules rouges, globules blancs, plaquettes). L'hémogramme est de plus en plus réalisé par des automates (Koita, 2015).

L'hémogramme est anormal dans la majorité des cas et permet à lui seul d'évoquer le diagnostic. Cet examen permet de rechercher les troubles dus à une insuffisance médullaire telle qu'une anémie, une Thrombopénie et une Hyperleucocytose (Poleszczuk, 2015)...

### Myélogramme

C'est un examen cytologique, systématiquement demandé pour confirmer le diagnostic évoqué devant l'hémogramme et permet de préciser le type cytologique (FAB). C'est un frottis médullaire coloré au May-Grünwald-Giemsa. Il montre habituellement une moelle très cellulaire avec quasi disparition des lignées hématopoïétiques normales, envahissement médullaire de 20% à <90% de blastes (Poleszczuk, 2015).



**Figure 12 :** Frottis d'aspiration de la moelle osseuse présentant une leucémie myéломonocytaire aiguë avec une augmentation légère du nombre d'éosinophiles et de granules basophiles grossiers anormaux dans un sous-ensemble d'éosinophiles (Heesun et al, 2017).

### Immunophénotypage (Cytométrie en flux) :

La cytométrie en flux est une étape majeure de la stratégie diagnostic des LAM, permet en effet de déterminer l'appartenance à la lignée myéloïde, et de préciser le niveau de différenciation pour identifier et/ou préciser le diagnostic des diverses formes de LAM. L'immunophénotypage des blastes dans les LAM avec inv(16) retrouve une expression forte des antigènes myéloïde CD34 et/ou CD117, CD33, CD13, CD65 et CD15 et peut également être positive pour des marqueurs monocytaires (CD14, CD4, CD11c, CD64, CD36, CD163 et lysozymes) (Poleszczuk, 2015).

### VIII. Le pronostic selon la cytogénétique conventionnelle et moléculaire

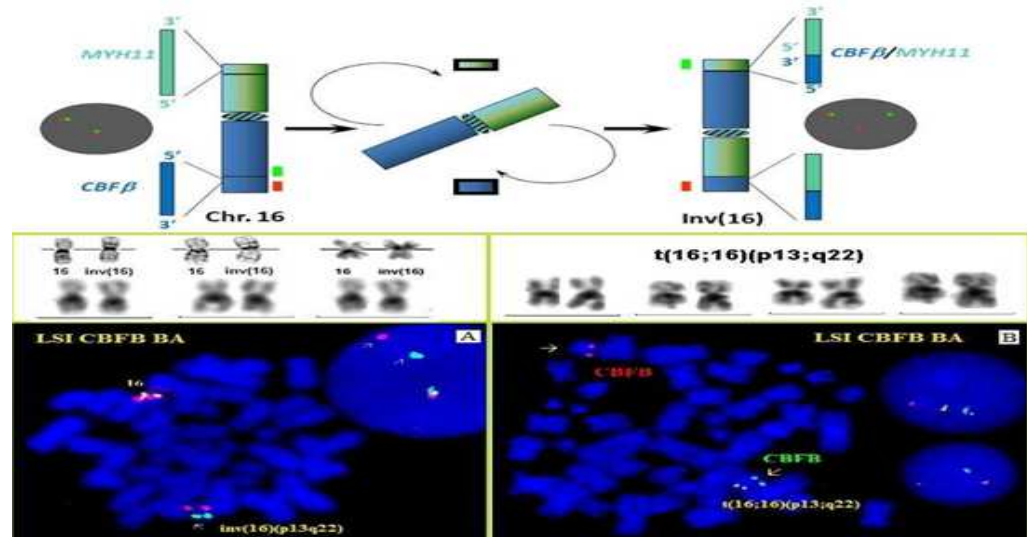
Le caryotype est un examen indispensable lors de l'évaluation d'une leucémie aiguë myéloïde (LAM) au diagnostic car les anomalies cytogénétiques détectées constituent l'un des plus puissants facteurs pronostiques indépendants de cette pathologie. Par ailleurs, les anomalies cytogénétiques peuvent être uniques ou multiples dans un clone avec pronostic variable. Les anomalies dites de bon pronostic qu'elles soient seules ou associées à des anomalies considérées comme de pronostic intermédiaire ou de mauvais pronostic restent prédictives d'un taux de survie supérieur (plus de 60%) à celui des anomalies de mauvais ou de pronostic intermédiaire que ces dernières soient seules ou associées (KERBOUT, 2009).

Dans les LAM, le caryotype est normal dans environ 40 % des cas et le bilan diagnostique doit alors être complété par des études en biologie moléculaire qui permettent d'affiner le pronostic de ces patients. L'Inv(16) (p13q22), ou son variant cytogénétique t(16;16)(p13;q22) avec le gène de fusion CBF $\beta$ -MYH11 sont classiquement détectées par caryotype, mais sa détection nécessite une bonne qualité de préparation chromosomique et une bonne dénaturation. Les résultats du caryotype sont éventuellement complétés par de la FISH.

Dans la FISH, plusieurs sondes sont disponibles détectant l'anomalie à la fois sur cellules interphasiques et métaphasiques. Il peut s'agir de sondes de séparation des parties 3' et 5' soit du gène CBF, soit du gène MYH11 ou de sondes de fusion des gènes CBF et MYH11. La distinction entre Inv(16) et t(16;16) ne peut se faire que sur métaphases car les images sur cellules interphasiques sont identiques pour les 2 types de remaniement. Toutes les inv(16) sont ainsi aisément détectables par FISH (Luquet, 2016).

**Le pronostic favorable de LAM avec Inv(16)/t(16 ;16) :** Les LAM de pronostic favorable comptent le taux le plus élevé de rémission complète et les survies les plus longues. Elles incluent la t(15 ;17), t(8 ;21) et l'inversion du chromosome 16 Inv(16)/ t(16 ;16).

Les LAM avec Inv(16) (p13q22) ou t(16;16)(p13;q22);CBFB-MYH11 sont de pronostic favorable. Elles surviennent à tout âge mais elles sont observées de façon prédominante chez les sujets jeunes. L'inv(16)/t(16 ;16) peut être isolée ou associée à des anomalies secondaires en particulier la trisomie 22, anomalie secondaire caractéristique de l'Inv(16) et dont la présence améliore encore le bon pronostic de ces LAM ; une délétion 7q ou une trisomie 8 toutes sont toutes les deux sans valeur pronostique dans ce contexte (Kerbout, 2009 ; Luquet et al, 2016).



**Figure 13** : Image de caryotype et de FISH montrant une  $inv(16)(p13q22)$  et une  $t(16;16)(p13;q22)$  (Atlas of genetics and Cytogenetics in oncology and haematology)

## VII. Traitement de la leucémie aigüe myéloïde avec $Inv(16)$ Traitement en première ligne :

Pour les patients aptes à recevoir de la chimiothérapie intensive, le traitement va comprendre un traitement d'induction avec une combinaison de cytarabine et d'anthracycline, suivie d'un traitement de consolidation, qui consiste en un à quatre cycles de chimiothérapie (post rémission), avec ou sans greffe autologue ou allogénique de cellules souches.

**a) Traitement d'induction** : est le terme qui désigne la phase initiale de la chimiothérapie. Dans la plupart du temps, il consiste en l'administration de l'anthracycline combinée avec la cytarabine (stoppent la croissance des cellules de LAM et mènent à leur destruction) en perfusion continue, cela permet d'obtenir des taux de RC dans 60 à 80% chez les patients les plus jeunes et 40 à 60% de RC chez les patients plus âgés. L'anthracycline est administrée durant les trois premiers jours du traitement. On commence la cytarabine au même moment du traitement mais on l'administre pendant sept à dix jours (le protocole 3+7). Le traitement vise à éliminer du sang et de la moelle osseuse les blastes leucémiques (Appelbaum et al, 2015) (Gay-Guerinet, 2012).

**b) Traitement post rémission** : ou traitement de consolidation, qui permet d'éliminer les blastes résiduelles dans la moelle osseuse. Ce traitement consiste en une chimiothérapie intensive (c'est-à-dire de fortes doses d'anthracycline et cytarabine)

La greffe autologue ou allogénique de cellules souches, dépendra d'un ensemble de facteurs comme l'âge, la présence de facteurs moléculaires qui confère à cette entité un pronostic moins bon du fait de la précocité des rechutes et de la disponibilité d'un donneur HLA compatible dans la fratrie pour la greffe allogénique (Appelbaum et al, 2015 ; Gay-Guerinet, 2012).

**Chapitre:**  
**Matériels et méthodes**

Notre étude a été réalisée au niveau du plateau de cytogénétique de laboratoire hématologie (CLCC) Blida sur une période de 5 mois de Janvier 2019 à Mai 2019.

Les objectifs de notre étude sont :

1- De réaliser différentes techniques de cytogénétique : Caryotype en bandes R et Hybridation In Situ Fluorescente (FISH) centrées sur le diagnostic de l'inversion (16)(p13; q22)/translocation (16; 16)(CBF $\beta$ - MYH11) dans les leucémies aiguës myéloïdes.

2- De situer la place de l'inversion (16)(p13; q22)/translocation (16;16)(CBF $\beta$ -MYH11) dans les leucémies aiguës myéloïdes.

Pour ce faire, une étude rétrospective des cas index recrutés sur une période de 8 ans (2009-2017) sera présentée pour évaluer son impact sur le traitement et le pronostic de cette anomalie.

Cette étude a porté sur 06 patients atteints de leucémie aiguë myéloïde avec inv(16) dont 02 recrutés de janvier 2019 à Juin 2019 et 04 recrutés en 2018.

Pour les deux patients recrutés durant notre période de stage, les techniques de cytogénétique ont été réalisées en temps réel depuis le prélèvement jusqu'à la lecture assistée de ces cas.

Pour les quatre patients recrutés en 2018, les techniques de cytogénétiques ont été réalisées sur des culots cellulaires congelés de ces patients en partant de l'étape « étalement des culots cellulaires jusqu'à la lecture assistée des 4 cas.

Pendant la période de stage, nous avons aussi réalisé avec assistance ces techniques de cytogénétique chez d'autres patients atteints d'hémopathies malignes en dehors de l'inv(16), ce qui nous a permis de maîtriser toutes les étapes de ces techniques.

## **I. Matériels**

**Matériels biologiques :** La moelle osseuse

**Matériel non biologique : (Annexes)**

## **II. Méthodes :**

Deux techniques ont été réalisées au cours de ce travail : le caryotype en bandes R et la FISH ; elles nécessitent toutes les deux une culture cellulaire.



---

## II.1 Echantillonnage :

### II.1.1 prélèvement :

Pour la ponction de la moelle osseuse, le médecin nettoie la peau qui entoure la région (sternum ou crête iliaque) de ponction par une solution antiseptique (Bétadine) ; insère l'aiguille du trocart dans la peau et dans l'os jusqu'à la moelle osseuse. Il fixe ensuite une seringue et il retire une goutte du suc médullaire (qui ressemble à du sang) qui sera déposée sur une lame pour un étalement cellulaire ; après coloration, l'étude cytologique sera faite sous microscope optique.

Le deuxième prélèvement qui sera fait avec une seringue héparinée, 1 à 2 ml de suc médullaire est transféré dans un tube conique contenant du RPMI et sera acheminé au laboratoire d'hématologie pour des examens cytogénétiques.

Le médecin pose un bandage sur la région piquée et applique une pression pendant quelques minutes pour éviter un saignement.

### II.1.2 le comptage de cellules mononuclées :

La quantité de moelle osseuse dédiée pour le comptage doit être filtrée ensuite passée dans un automate de numération sanguine pour faire une numération de cellules mononuclées afin de prendre une quantité précise de cellules qui seront par la suite mises en culture. Le nombre de cellules à cultiver est de 2 millions de cellules par ml de milieu culture.

## II.2 Mise en culture cellulaire (24h avec synchronisation)

La mise en culture de cellules sanguines issues d'un prélèvement de suc médullaire :

- Inscrire tous les renseignements sur le flasque (nom, prénom du patient, type et date du prélèvement et le type de culture).
- Mettre la quantité calculée dans 10ml RPMI complet ; homogénéiser.
- Mettre le flasque en position horizontale bouchon dévissé à  $\frac{1}{4}$  de tour dans une étuve à CO<sub>2</sub> (5 %) + humidité + 37°C de température pendant 24 heures.

### ➤ La synchronisation

**Synchro A à 16 h :** verser 100µl du synchro A dans chaque flasque sous hotte.

**Synchro B à 8h du lendemain obligatoirement :** rajouter 100µl du synchro B dans chaque flasque sous hotte.

**Après 5 h 40 min:** Rajouter la colchicine 60µl laisser agir une demi-heure pour bloquer les cellules en métaphase afin de pouvoir observer les chromosomes en caryotype.

**II.3 la sortie de culture :** le temps de la colchicine écoulé, le travail peut se faire hors hotte:

- Sortir les flasques de l'étuve à CO<sub>2</sub>.
- Verser le contenu du flasque dans un tube conique dûmes renseigner.
- Centrifuger pendant 8 minutes à 1300 tours.
- Jeter le surnageant (laisser 2/3 au contact du culot).
- Ajouter 1cc de KCL à 37°C; homogénéiser puis compléter avec du KCL jusqu'à 12cc et faire un choc mécanique dans une solution hypotonique.
- Laisser reposer dans une étuve sèche à 37°C pendant 25 minutes.
- Préparer le fixateur qui contient 1/3 d'acide acétique et 2/3 de méthanol.

➤ **Préfixation**

- Faire sortir les tubes coniques de l'étuve.
- Ajouter 1cc de fixateur, surnageant en place, mélanger doucement.
- Centrifuger à 1300 tours pendant 8 minutes.
- Se débarrasser du surnageant (garder 1/3 de culot et 2/3 de surnageant).

➤ **Première fixation**

- Rajouter 1cc de fixateur et mélanger doucement.
- Compléter jusqu'à 8cc avec le fixateur.
- Mélanger délicatement.
- Centrifuger 1300 tours pendant 8 minutes.
- Eliminer le surnageant (garder 1/3 et 2/3).

➤ **Deuxième fixation :**

Idem première fixation. La finalité est d'avoir un culot blanc.

- **Conservation :** Conserver les tubes à +4°C.

---

## II.4 L'étalement

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

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

### ➤ Conditions de l'étalement

- Température entre 20 et 25°.
- Humidification entre 45 et 55%.

### ➤ Procédure de l'étalement

- Eliminer le surnageant, rajouter 2/3 de fixateur pour un 1/3 de culot et mélanger délicatement.
- Humidifier les lames en les plaçant face à la vapeur du bain marie.
- Retirer à l'aide d'une pipette de transfert (en plastique) le prélèvement puis étaler.
- Verser une goutte du culot sur la lame au centre pour la FISH et deux gouttes pour le caryotype.
- Laisser sécher à l'air libre 45 minutes pour le caryotype ou mettre à l'étuve sèche à 37° pendant une nuit pour la FISH.

## II.5 Le protocole de cytogénétique conventionnelle : Caryotype (Bandes R)

La technique des bandes R correspond à un marquage de l'euchromatine c'est-à-dire les segments non variables représentant chez la plupart des espèces la quasi-totalité de longueur des chromatides. Ces derniers colorent environ 50% de l'euchromatine et les bandes G colorent le reste.

La technique des bandes R consiste à faire un traitement thermique en milieu salin suivie d'une coloration au Giemsa.

### ➤ Le protocole des bandes R

Chauffer le bain marie avec une solution tampon  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  jusqu'à 87°C mais bain marie réglé à 90°. Dès que cette température est atteinte, commencer la manipulation :

- **Réhydratation** : après l'étalement de deux gouttes, laisser sécher les lames à l'air libre

---

pendant 45 min. Plonger les lames dans de l'eau distillée stérile pendant 05 minutes (objectif : réhydratation) à température ambiante.

- **La dénaturation** : Retirer les lames et les plonger dans un tampon Phosphate  $\text{NH}_2\text{PO}_4$  à  $87^\circ\text{C}$  pendant 12min 10 secondes pour la première série et 12 mn 15s pour la deuxième série (peut varier en fonction du climat).
- **Arrêt de la dénaturation** : Par refroidissement en mettant les lames dénaturées dans un bac d'eau distillée à  $18^\circ\text{C}$  pendant 5 min et dans un autre pendant 1 min.
- **Coloration** : On procède à la préparation de colorant dans un bac avec 4cc de Giemsa , 4 cc de tampon de coloration ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  , 12  $\text{H}_2\text{O}$ ), complété avec de l'eau distillée jusqu'à 100ml , on met les lames dans le bac de colorant pendant 5 min, elles sont ensuite rincées avec de l'eau du robinet et séchées à température ambiante.
- **Observation et Lecture du caryotype** : Après avoir séché les lames, rajouter de l'huile d'immersion avant la lecture sous microscope à lumière blanche couplé à un logiciel de traitement d'image et d'archivage de dossier. Il est nécessaire d'obtenir au minimum 20 mitoses pour permettre le comptage et l'identification des chromosomes. Enfin, les chromosomes sont classés en fonction de leur taille décroissante, leur indice centromérique, et les bandes.

## II.6 Protocole FISH : valable pour les sondes Cytocell

### ➤ Préparation des échantillons

Délimiter la région d'intérêt après un étalement cellulaire sur lame par un crayon diamant ; face controlatérale à l'étalement.

### ➤ Préparation des solutions (voir Annexes)

### ➤ Prétraitement des lames

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

---

dans chaque bain à température ambiante.

- Les lames sont ensuite séchées.

➤ **La pré dénaturation : (des sondes à l'abri de la lumière)**

- Retirer la sonde du congélateur à  $-20^{\circ}\text{C}$  et la laisser préchauffer à une température ambiante.
- Bien homogénéiser la sonde en pipetant plusieurs fois.
- Prélever 10 $\mu\text{L}$  de la sonde par test et placer dans un tube Eppendorf puis remettre la sonde à  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Mettre la sonde et la lame échantillon à préchauffer sur une plaque chauffante à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 5 minutes.
- Déposer 10 $\mu\text{L}$  de sonde sur l'échantillon et couvrir avec une lamelle puis sceller avec du rubber ciment ou fixo-gum et laisser sécher à une température ambiante.

➤ **Dénaturation**

La sonde et l'échantillon sont simultanément dénaturés en plaçant la lame sur une plaque chauffante à  $75^{\circ}\text{C}$  pendant 2 minutes.

➤ **Hybridation**

La lame est placée dans un ThermoBrite incubée pendant une nuit à  $37^{\circ}\text{C}$  à l'abri de la lumière et dans une chambre humide.

**Lavage post-hybridation (à l'abri de la lumière) :**

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

- La lame est placée dans la solution de lavage 2SCC/0,1% Igépal à température ambiante pour faciliter le décollement de la lamelle (quelques secondes).
- Les lamelles sont ensuite retirées délicatement.
- Les lames sont transférées dans la solution 0,4SCC/0,3% Igépal à  $73^{\circ}\text{C}$ . Sans agitation, le chronomètre réglé à 2 minutes est lancé.
- Les lames sont retirées de la solution à  $73^{\circ}\text{C}$  et transférées dans la solution Tween pendant 30 secondes.
- Les lames sont retirées de la solution Tween et transférées dans des bains d'éthanol successifs (70%, 85%, 100 %), 1 min dans chaque bain à température ambiante.
- Laisser les lames sécher à température à l'abri de la lumière.

➤ **Contre coloration DAPI**

Une fois les lames séchées, 10ul de DAPI est déposé sur la lame au niveau de la préparation cellulaire pour qu'elle soit recouverte d'une lamelle, déposée de façon inclinée afin d'éviter les bulles d'air. Les lames ainsi préparées sont conservées à 4°C jusqu'à la lecture au microscope à épi fluorescence.

➤ **La lecture au microscope à fluorescence**

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

➤ **Recommandation**

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

➤ **Avertissement et précautions**

- le DAPI est un carcinogène potentiel. Manipuler avec précaution. Porter des gants, des lunettes, une blouse, une sur-blouse et manipuler sous hotte. Après élimination, rincer abondamment à l'eau.
- la sonde contient du formamide qui est un tératogène. Ne pas respirer les vapeurs. Ne pas mettre en contact avec la peau. Porter des gants, une blouse de laboratoire et manipuler sous une hotte. Après élimination, rincer abondamment avec l'eau.
- toute matière dangereuse doit être éliminée selon la réglementation mise en vigueur dans notre institution pour l'élimination des déchets dangereux
- veuillez toujours s'assurer de limiter l'exposition de la sonde à l'éclairage du laboratoire.

**Chapitre:**  
**Résultat et discussions**

## I. Résultats

### I.1 présentation des 6 cas de LAM avec Inv(16)

Pour chaque cas nous présentons des données épidémiologiques, l'hémogramme, le myélogramme et les résultats du caryotype et de la FISH.

**Tableau II :** la présentation des cas ayant une inversion 16.

Patient	Nom Prénom	Age années	Sexe	Date Diagnostic
Cas N° : 1	B.M	57	Homme	03/02/2019
Cas N° : 2	K.S	28	Femme	25/04/2019
Cas N° : 3	M.D	16	Homme	10/06/2018
Cas N° : 4	N.M	49	Femme	20/06/2018
Cas N° : 5	H.M	28	Femme	15/08/2018
Cas N° : 6	B.T	44	Homme	18/11/2018

### Résultats de l'hémogramme :

**Tableau III :** l'hémogramme de six patients atteints de LAM4.

Patients	GB / $\mu$ l	GR x $10^6$ / $\mu$ l	HB : g / dl	Plaquettes / $\mu$ l
Cas N° : 1	14090	2.8	8.4	13000
Cas N° : 2	97500	1.60	5.4	77000
Cas N° : 3	237310	2.32	7.6	39000
Cas N° : 4	26600	2.56	7.9	14000
Cas N° : 5	142700	1.67	5.9	76000
Cas N° : 6	185000	1.8	5.5	43000
Normes	4000 – 10000	H : 4,2 à 5,2 F : 4,0 à 4,8	H : 13 à 18 F : 12 à 16	150 000 - 450 000



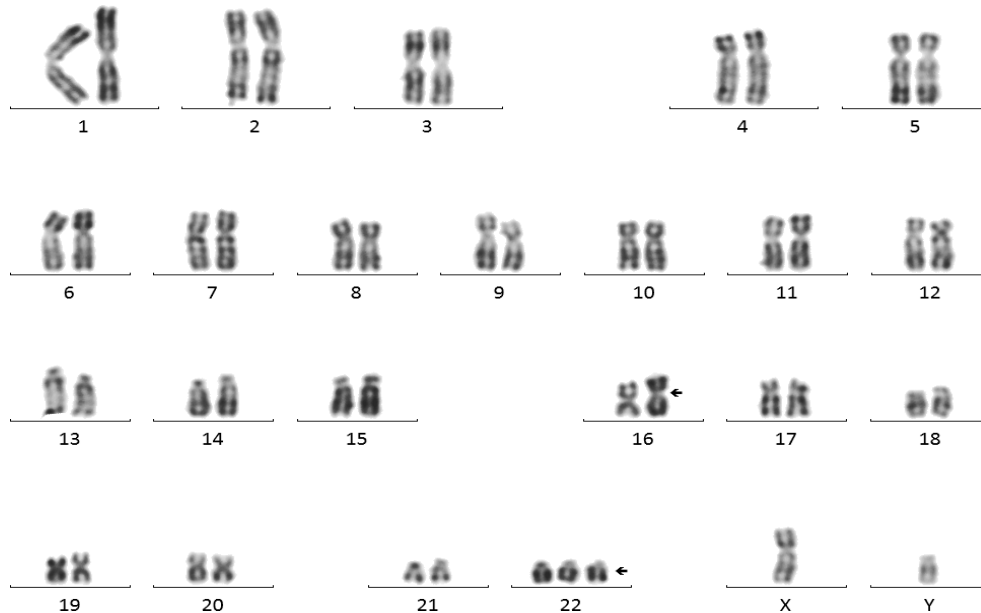
## Cas N°1

B.M, 57 ans, originaire d'Ain Defla, fonctionnaire, pas d'hémopathie maligne familiale.

**Hémogramme** : Anémie et thrombopénie sévère + hyperleucocytose modérée

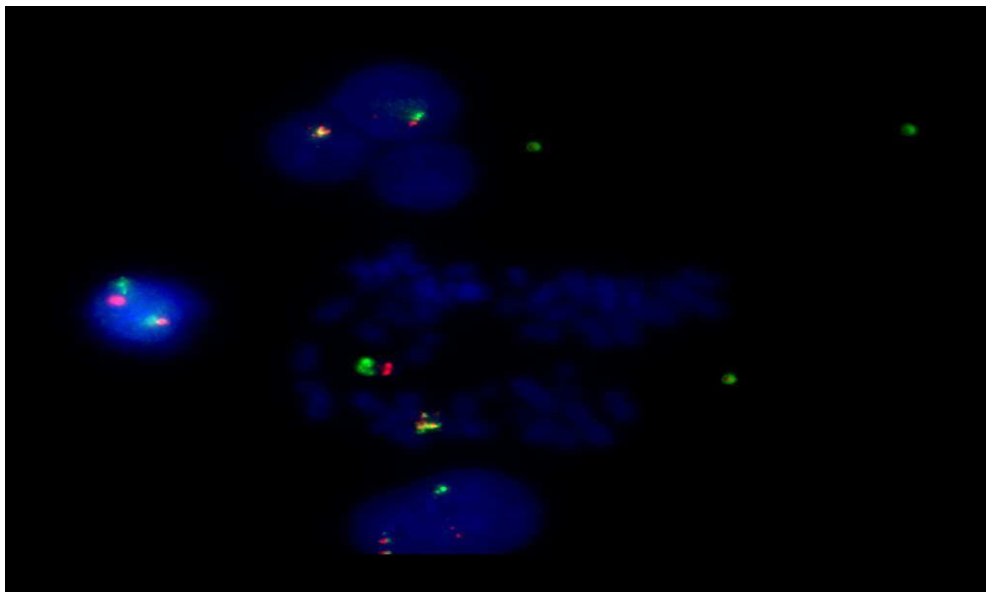
**Medullogramme**: Aspect d'une LAM4 avec composante éosinophile atypique

➤ **Les résultats de la cytogénétique conventionnelle (caryotype)**



**Figure 14:** Caryotype du patient N°1 ; 47, XY, +22, Inv(16) (p13 ; q22)

➤ **Les résultats de la cytogénétique moléculaire (FISH)**

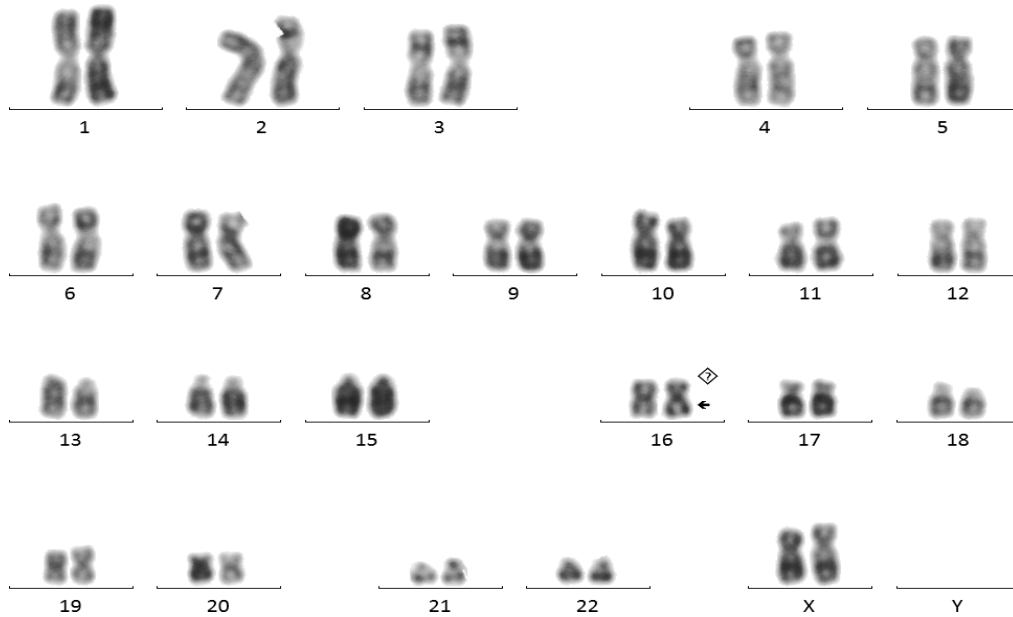


**Figure 15:** FISH du patient N°1 ; Inv (16) sur 20 mitoses, 98% des noyaux.

### Cas N° 2

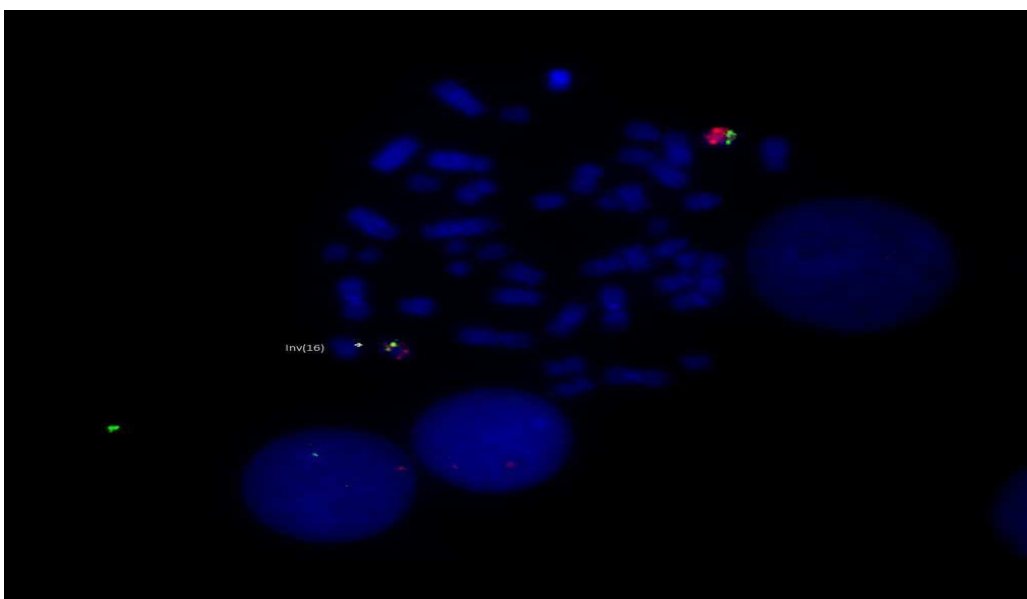
K.S, 28ans, originaire de Djelfa, sans profession, traitée en 2007 pour lymphome de Hodgkin. **Hémogramme:** Anémie et thrombopénie sévère +hyperleuco cytose majeure  
**Myélogramme:** Aspect de LAM4.

#### Les résultats de la cytogénétique conventionnelle (caryotype)



**Figure 16:** Caryotype du patient N° 2 ; 46 XX, Inv(16) (p13 ; q22).

#### ➤ Les résultats de la cytogénétique moléculaire (FISH)



**Figure 17:** FISH du patient N° 2 ; Inv(16) sur 02 mitoses et 100% des noyaux.

## Cas N° 3

M.D, 16 ans, originaire de Chlef, absence d'hémopathies malignes familiales  
**Hémogramme:** Anémie et thrombopénie sévère + hyperleucocytose majeure **Myélogramme :**  
 Aspect de LAM4

➤ Les résultats de la cytogénétique conventionnelle (caryotype)

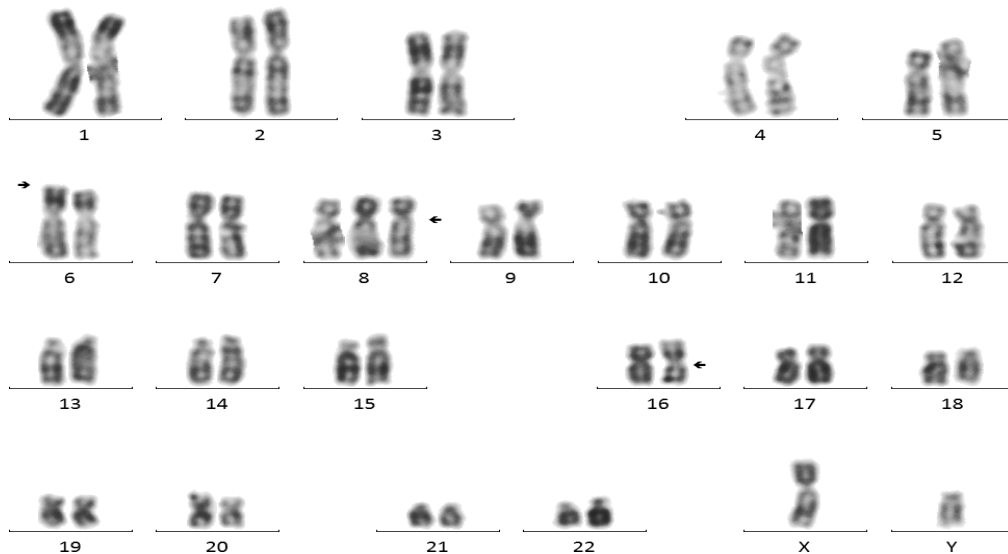


Figure 18: Caryotype du patient N° 3; 47 XY, +8, Inv(16)(p13;q22)

➤ Les résultats de la cytogénétique moléculaire (FISH)

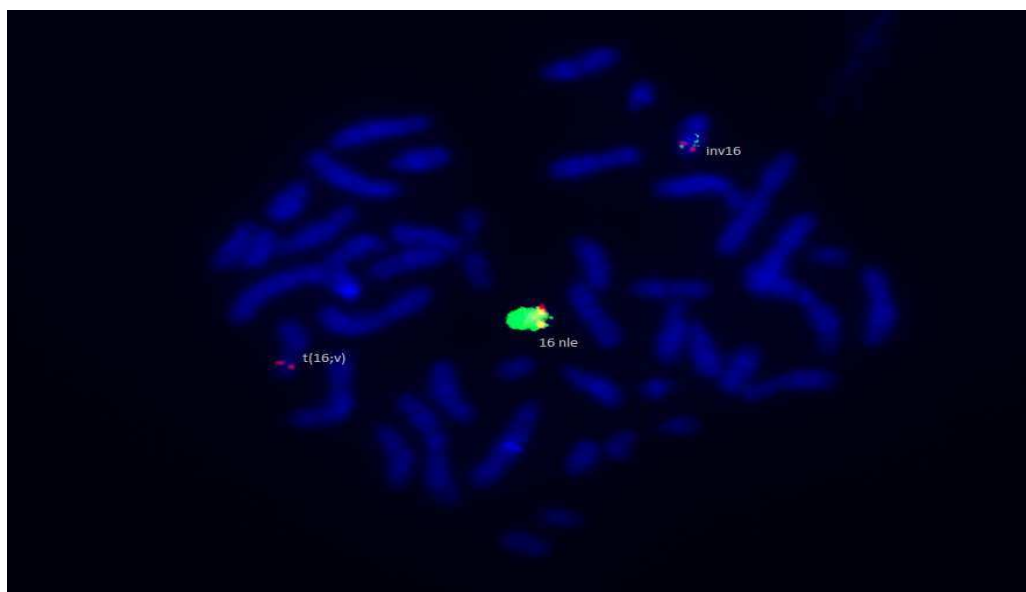
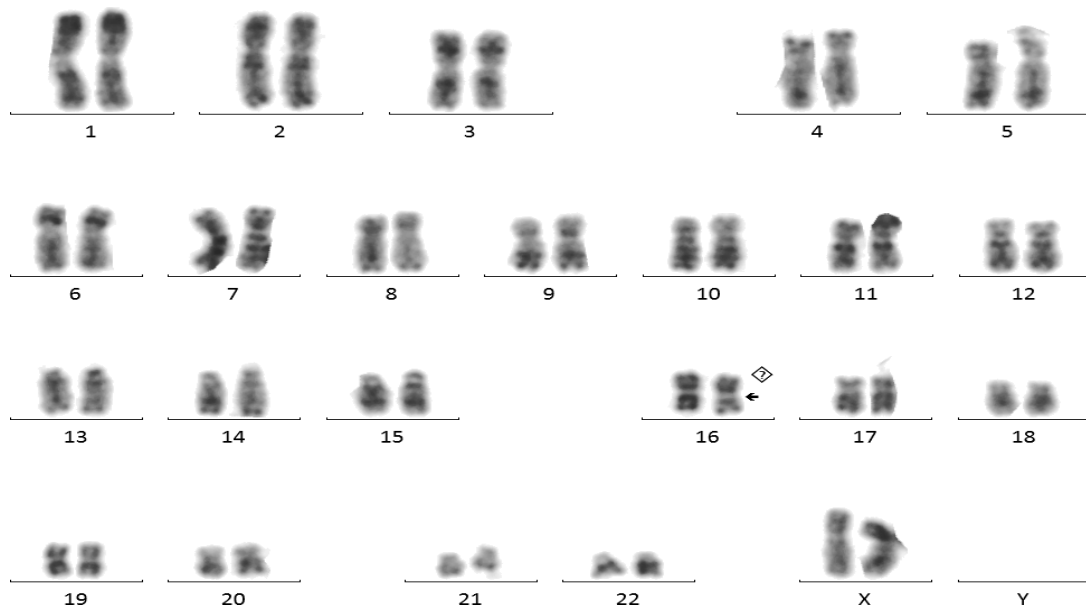


Figure 19: FISH du patient N° 3 ; Inv(16), t(16q22;V) sur 6 mitoses et 97% des noyaux.

### Cas N° 4

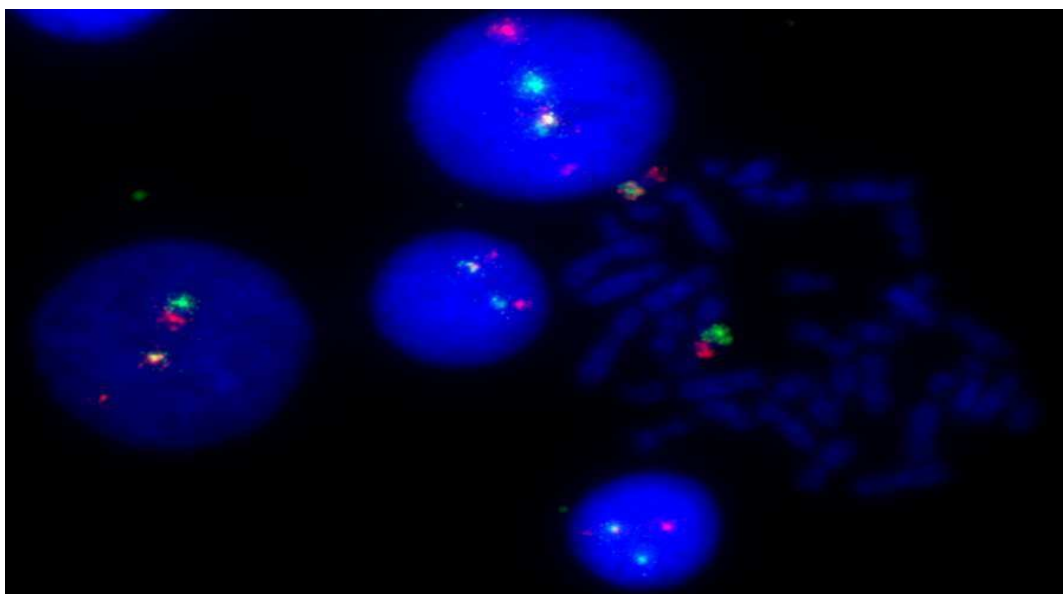
N.M, 49 ans, originaire de Tipaza, néphrectomie totale pour angio-myo-lipome  
**Hémogramme:** Anémie et thrombopénie sévère + hyperleucocytose modérée **Myélogramme:**  
 Aspect d'une LAM4 avec composante éosinophile atypique.

#### Les résultats de la cytogénétique conventionnelle (caryotype)



**Figure 20:** Caryotype du patient N° 4 ; 46XX, Inv(16)(p13 ; q22).

#### ➤ Les résultats de la cytogénétique moléculaire (FISH)

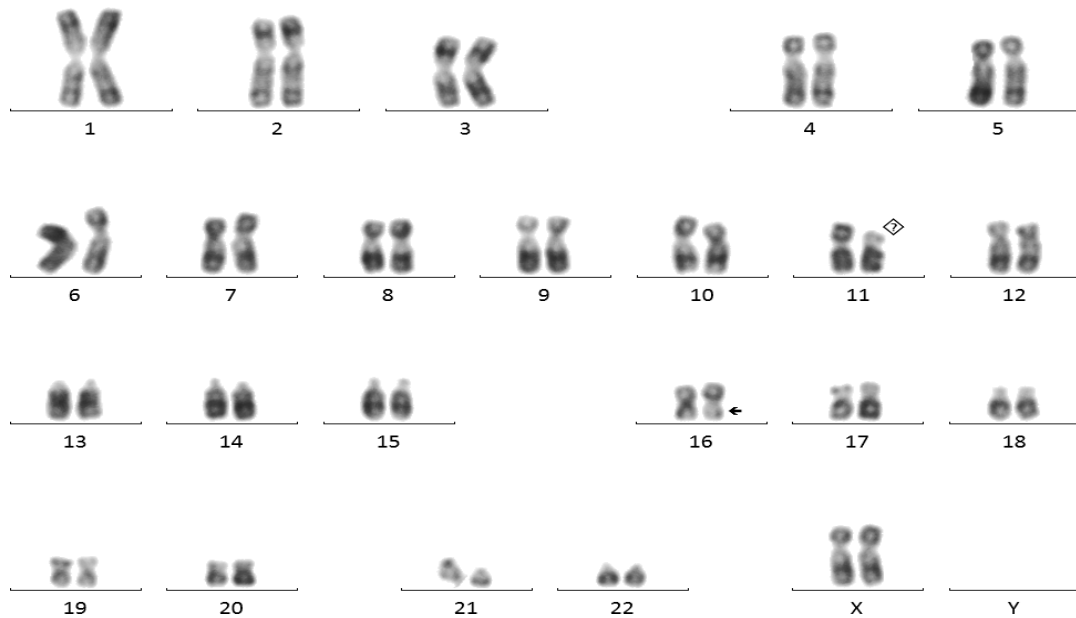


**Figure 21:** FISH du patient N° 4 ; Inv(16) sur 8 mitoses et 96% des noyaux

## Cas N° 5

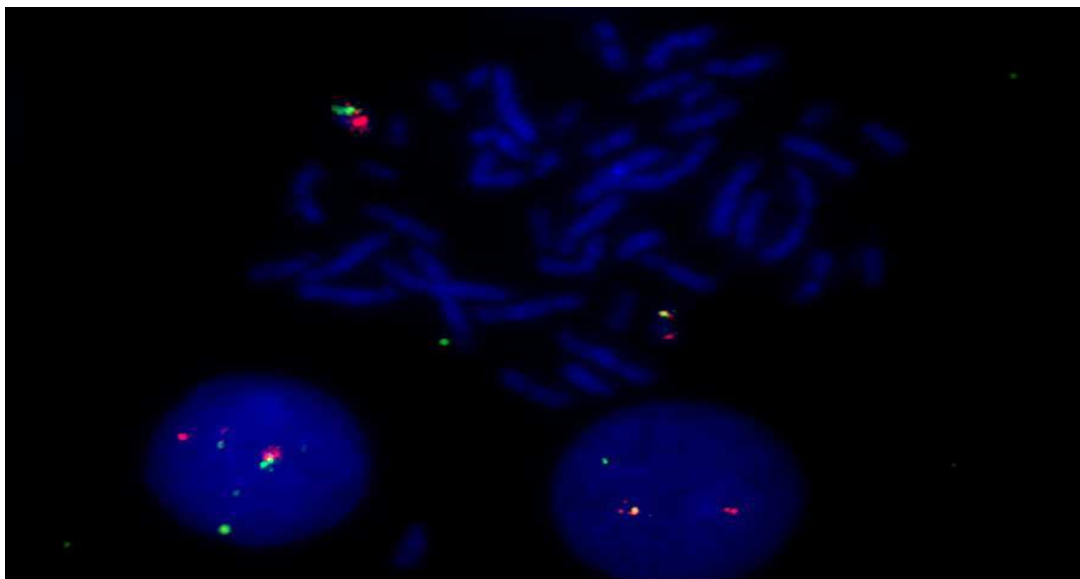
H.N, 28 ans, originaire d'Alger, absence d'hémopathies malignes familiales  
**Hémogramme** : Anémie et thrombopénie sévère + hyperleucocytose majeure **Myélogramme** :  
 Aspect d'une LAM4 avec composante éosinophile atypique

➤ **Les résultats de la cytogénétique conventionnelle (caryotype)**



**Figure 22:** Caryotype du patient N° 5 ; 46 XX, Inv(16)(p13 ; q22).

➤ **Les résultats de la cytogénétique moléculaire (FISH)**

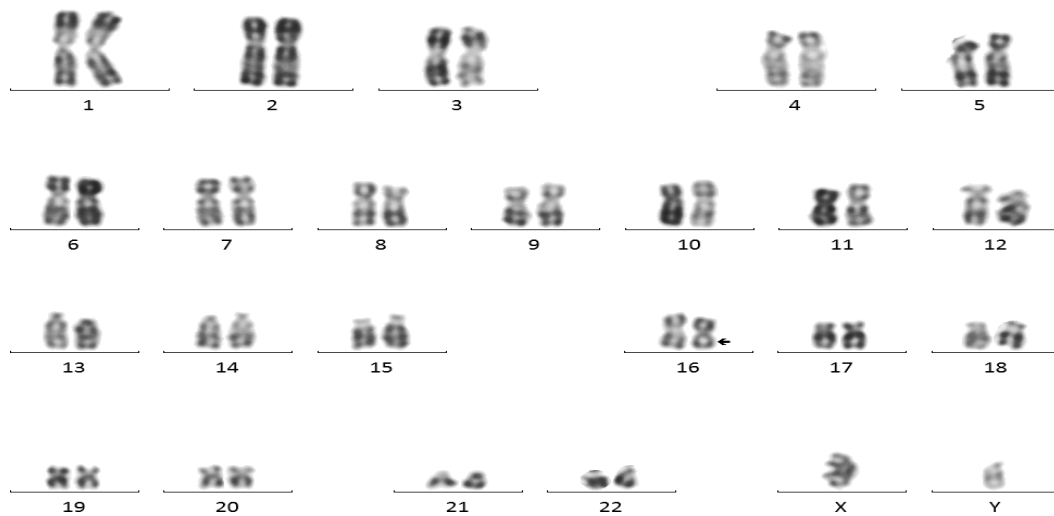


**Figure 23:** FISH du patient N° 5 ; Inv(16) sur 10 mitoses et 98% des noyaux.

## Cas N° 6

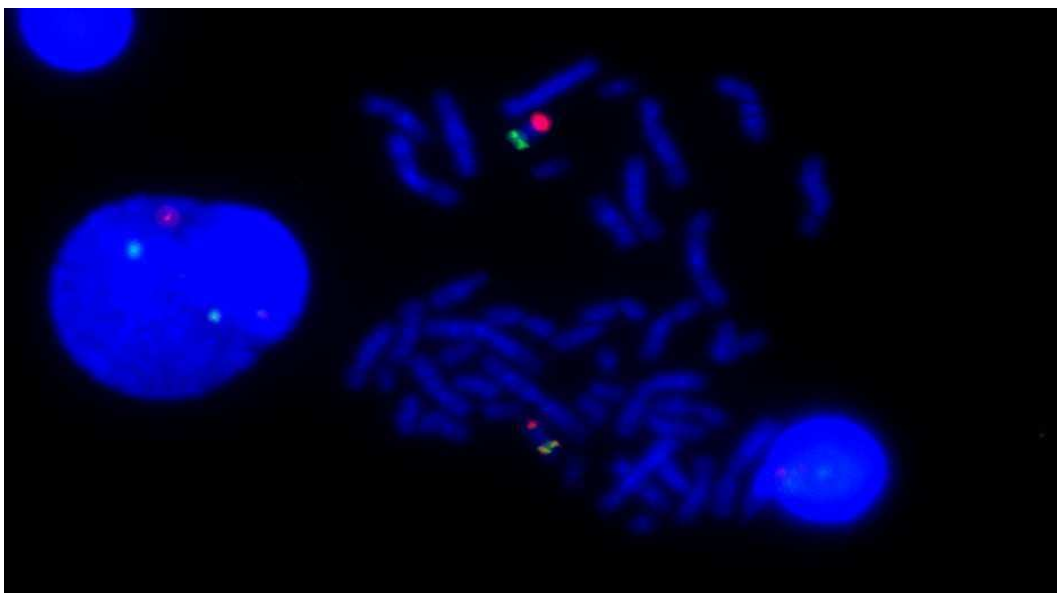
B.T, 44 ans, originaire de Chlef, mère décédée par néoplasie du sein. **Hémogramme:** Anémie et thrombopénie sévère + hyperleucocytose majeure **Myélogramme :** Aspect d'une LAM4

➤ **Les résultats de la cytogénétique conventionnelle (caryotype)**



**Figure 24 :** Caryotype du patient N° 6; 46 XY, Inv(16) (p13;q22).

➤ **Les résultats de la cytogénétique moléculaire (FISH)**



**Figure 25:** FISH du patient N° 6 ; Inv (16) sur 10 mitoses et 100% des noyaux avec del (16p13).

## II. Discussion

### II.1 Selon l'hémogramme

D'après les résultats de l'hémogramme, nous avons observé :

- **hyperleucocytose**

Selon (Beck, 2009) l'hyperleucocytose est l'augmentation des leucocytes sanguins par rapport à des valeurs normales qui varient avec l'âge du patient. Elle peut être réactionnelle, bénigne ou au contraire maligne (hyperleucocytose avec blastes circulants dans le cadre d'une leucémie aiguë).

- **Anémie**

D'après Imber (2002), l'anémie est expliquée par l'insuffisance médullaire et peut être aggravée par des hémorragies thrombopéniques. Il est connu que les anémies peuvent varier, allant de l'anémie discrète à l'anémie sévère et passant par l'anémie modérée. Dans notre cas les 6 patients présentent une anémie sévère.

- **Thrombopénie**

Selon Provan et al (2010), la thrombopénie est classiquement définie comme un chiffre de plaquettes inférieur à 150 000/ $\mu$ .

Les résultats de taux des plaquettes des 6 patients montrent une thrombopénie; sévère dans 2 cas (plaquettes < 5000/ $\mu$ l) et très sévère dans 2 cas (plaquettes < 20000/ $\mu$ l) avec risque hémorragique spontané dans les 6 cas.

Selon Ebbo et al (2015), la cause d'une thrombopénie est due probablement à une aplasie médullaire d'origine néoplasique, après avoir éliminé l'origine auto immune et iatrogène (post-thérapeutique).

### II.2 Selon le myélogramme :

Selon (Émile, 2009) La LAM4 éosinophile est caractérisée par des blastes myéloïdes et des polynucléaires éosinophiles comportant de grosses granulations basophiles.

La présence au myélogramme de granuleux éosinophiles immatures atypiques et d'une population cellulaire blastique constatée chez 3 patients de notre série, fait évoquer une inv(16) ; néanmoins l'absence d'une composante éosinophile atypique n'élimine pas la présence d'une inv(16).

### II.3 Selon le caryotype :

Le caryotype est un examen indispensable lors de l'évaluation d'une leucémie aiguë myéloïde (LAM4) au diagnostic car les anomalies cytogénétiques détectées constituent l'un des plus puissants facteurs pronostiques indépendants de cette pathologie. Ces anomalies sont indispensables pour déterminer le sous-type de LAM en fonction de la classification OMS (Vardiman, 2008 ;Arber et al., 2016).

Nous avons établi un caryotype en bande R en observant au minimum 20 mitoses au grossissement 100 sur un microscope optique avec un logiciel (IKAROS) qui nous a permis d'identifier la présence de l'inversion 16 chez les patients sur un nombre de mitoses faible (2 à 10 sur 20) ce qui témoigne de la difficulté de voir cette anomalie sur le caryotype seul. En effet, les inversions 16 sont habituellement cryptiques et nécessitent une bonne qualité de cet examen, voire la réalisation d'une FISH qui retrouve cette anomalie dans tous les cas avec précision des mécanismes moléculaires.

Chez certains patients, des anomalies additionnelles ou secondaires telles que la présence de la trisomie +8 chez le patient N°3 et la trisomie +22 chez le patient N°1 ; ces anomalies secondaires caractéristiques de l'inv(16) améliorent encore le bon pronostic de ces LAM (Luquet et al, 2016).

### II.4 Selon la FISH

L'inversion du chromosome 16 (p13 ; q22) ou son variant cytogénétique t(16 ;16) (p13 ;q22) sont détectés par la cytogénétique conventionnelle mais parfois ces derniers peuvent être masqués dans des remaniements complexes, donc le caryotype doit être nécessairement et utilement complété par la FISH à l'aide des sondes spécifiques des gènes *CBFβ* et *MYH11* pour précisément détecter cette anomalie sur des préparations métaphasiques et interphasiques.

Selon (Luquet et al, 2016) la FISH peut utilement compléter le caryotype. Plusieurs types de sondes sont disponibles détectant l'anomalie à la fois sur cellules interphasiques et métaphasiques. Il peut s'agir de sondes de séparation des parties 3' et 5' soit du gène *CBFβ*, soit du gène *MYH11* ou de sondes de fusion des gènes *CBFβ* et *MYH11*.



La sonde CBF $\beta$ , marquée en rouge, couvre une région de 606Kb de 16q22.1 et inclut le gène CBF $\beta$  ; la sonde MYH11, marquée en vert, couvre une région de 610Kb de 16p13.11 et inclut le gène MYH11, qui sous un microscope optique révèlent des signaux rouges et verts concernant les deux gènes sur chaque chromosome 16 normal. En cas d'inv(16) on observe deux signaux jaunes conséquence de la fusion des deux gènes CBF $\beta$  et MYH11 de part et d'autre du centromère du chromosome inversé ; cet aspect peut changer selon le type de sonde utilisée.

La FISH chez les 6 patients avec les sondes CBF $\beta$ /MYH11 (cytocell) a montré la présence du signal CBF $\beta$ /MYH11 de l'Inv (16) sur près de 100% des noyaux et des mitoses.

La distinction entre inv(16) et t(16;16) ne peut se faire que sur métaphases car les images sur cellules interphasiques sont identiques pour les 2 types de remaniement (Luquet et al, 2016).

Chez le patient n°3, l'existence supplémentaire d'une insertion ou t(16q22;V) visible uniquement en FISH appuie la place de la FISH dans l'exploration cytogénétique de l'inv(16) ; toutefois , jusqu'à l'heure actuelle , cette anomalie additionnelle n'est pas péjorative puisqu'elle ne modifie pas le pronostic favorable de l'inv(16).

**Impacts thérapeutique et pronostique de l'inversion(16)  
(p13 ;q22)/translocation (16 ;16)(CBF $\beta$ -MYH11)**

---

### III. Etude rétrospective :

#### III.1 Introduction :

Nous rapportons une étude rétrospective réalisée sur une période de 8ans (10/2009-12/2017) portant sur les patients atteints de LAM de novo pour faire ressortir l'impact thérapeutique et pronostique des anomalies cytogénétiques récurrentes dont celui de l'inversion 16.

#### III.2 Patients :

Cette étude a concerné 400 patients : Il s'agit de 205 femmes et 195 hommes (sex ratio = 0,95). Age moyen : F = 44,5 ans (16-87) ; H = 41 ans (16-84).

Selon la classification morphologique FAB :

- LAM0 = 14 cas
- LAM1 = 49 cas
- LAM2 = 78 cas
- LAM3 = 71 cas
- LAM4 = 121 cas
- LAM5 = 25 cas
- LAM6 = 13 cas
- LAM7 = 1 cas
- LAM = 28 cas (7%) type non précisé.

#### III.3 Méthodes :

Ce travail a été réalisé à partir des dossiers de patients diagnostiqués pour une LAM sur :

- une étude cytologique des frottis sanguins et médullaires.
- une étude immunophénotypique par cytométrie en flux sur des prélèvements de suc médullaire.
- une étude cytogénétique conventionnelle (caryotype) et moléculaire (FISH) à la recherche d'anomalies récurrentes : t(8;21)(RUNX1/RUNX1T1), Inv(16)/t(16;16), t(15;17)(PML/RARA), réarrangement MLL (R.MLL), anomalies du 5 du 7 et la t(9;22) dans certains cas.

Au plan thérapeutique les patients avec Inv16/t(16;16) et t(8;21) ont été traités par chimiothérapie (3+7) en induction + 2 à 4 consolidations par Aracytine haute dose.

La greffe en première rémission complète a été rarement proposée.

**III.4 Résultats :**

Les anomalies cytogénétiques ont été retrouvées dans 42% des cas.

L'inv16 a été notée dans 33 cas (8,25 %) et la t(16;16) dans 3 cas (0,75 %) soit au total 36 cas (09%).

**Tableau IV : Caractéristiques des patients**

Anomalie	Nombre	Homme	Femme	Sexe ratio	Age moyen	Type FAB
						<b>M4: 33 (92 %)</b>
<b>inv16 / t(16;16)</b>	<b>36</b>	<b>13</b>	<b>23</b>	<b>0,56</b>	<b>43</b>	<b>[M4eo: 14 (42 %)]</b>
						<b>M2: 02 (5,5 %)</b>
						<b>M5: 01 (2,5 %)</b>

**Sous traitement**

Taux de rémission complète : 79% Taux de survie globale à 2 ans : 51,7%

**III.5 Discussion :**

Ces résultats rejoignent ceux des grandes séries de la littérature pour la majorité des anomalies étudiées; l'intérêt de la cytogénétique pour le diagnostic est ainsi prépondérant dans les LAM.

Au plan thérapeutique, pour les LAM avec inv(16), en accord avec les recommandations OMS, une allogreffe en RC1 n'a été proposée que rarement aux patients, alors qu'elle est la règle pour les patients en deuxième RC.

Le taux de rémission complète (79%) des LAM avec inv(16) se rapproche de celui de la littérature (85%) ; le taux de survie globale à 2 ans (51,7%) bien qu'inférieur à ce qui est relevé dans la littérature (75%) (Réanimation 2002; 11 : 306-16), est prometteur eu égard à nos conditions de travail avec peu de moyens. Il est bien meilleur que celui qui est obtenu dans les LAM à Haut risque cytogénétique (moins de 20% de survie à 3 ans) ( Lowenberg; N Engl J Med; 1999 ).

En définitive, l'inv(16) confère un bon pronostic aux patients porteurs de LAM de novo, surtout dans la tranche d'âge 18-60 ans.

---

**Conclusion générale :**

La LAM avec inv(16) (p13; q22) ou t(16; 16) ; CBF $\beta$ -MYH11 est un sous groupe de leucémies aiguës myéloblastiques, elle représente 5 à 10% des LAM. Elle est observée de façon prédominante chez les sujets jeunes et féminins. La LAM4 est souvent caractérisée par une inv(16) qui entraîne la formation des gènes CBF $\beta$  localisés en 16q22 et MYH11 en 16p13 qui code pour une chaîne lourde de la myosine du muscle lisse.

Nous avons étudié les cas de 6 patients par l'application de différents tests hématologiques (hémogramme/myélogramme) et cytogénétiques (caryotype et FISH) :

Concernant l'hémogramme ; les six patients ont présenté une hyperleucocytose, une anémie et une thrombopénie comme cela est quasi constamment relevé dans cette pathologie; l'hyperleucocytose est expliquée par la prolifération tumorale, et les cytopénies par l'insuffisance médullaire observées dans cette pathologie.

Le caryotype nous a permis d'identifier l'inversion (16) chez les six patients sur un nombre limité de mitoses appuyant la difficulté de détecter cette anomalie par caryotype seul ainsi que d'autres anomalies additionnelles comme la trisomie 8 et la trisomie 22 chez 2 patients.

Pour la FISH, on a effectivement détecté des signaux jaunes générés de la fusion des deux gènes CBF $\beta$ /MYH11 marqués par des sondes spécifiques sur près de 100% des noyaux dans tous les cas; soulignant l'intérêt crucial de cette méthode diagnostique pour cette anomalie.

Le bon pronostic des LAM4 avec inv(16) sous chimiothérapie d'induction avec des taux de RC élevés laisse la place à une amélioration de nouvelles approches thérapeutiques prenant en compte l'âge des patients, les anomalies cytogénétiques et moléculaires associées et une meilleure indication de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.

Il serait intéressant d'étudier un nombre plus important de malades, pour mieux préciser l'impact pronostique de cette anomalie cytogénétique dans notre contexte.

**Références Bibliographiques :**

- **An Q., Fan CH., Xu SM., (2017)** - Recent perspectives of pediatric leukemia, - an update, *Med. Pharmacol*, 31-36.
- **Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM et al**, 2016, The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.*;127(20):2391– 2405.
- **BALDE KOITA F.**, 2014-2015, Valeur de référence de l'hémogramme chez les femmes enceintes et les enfants de moins de 5ans à Ouelessebougou, MALI, UNIVERSITE DES SCIENCES TECHNIQUES ET TECHNOLOGIQUES DE BAMAKO, Faculté de Pharmacie.
- **Bott L., Thumerelle C., Cuvellier J.C., Deschildre A., Vallée L., Sardet A.,**, 2006, Ataxie-télangiectasie : de la clinique à la physiopathologie, *ELSEVIER*, volume 13, 293-298.
- **Caignec C.**, Collège National des Enseignants et Praticiens de Génétique Médicale. « Caryotype humain : Technique –Indications » in : Support de Cours 2010-2011. Service de génétique médicale, CHU Nantes, France.
- **Christine M., Segeren, Mars B., Veer**, 1996, The FAB classification for acute myeloid leukaemia-is it outdated ? *J.Medicine*, 49, 126- 131.
- **Edling C.E., Hallberg B.**, 2007, Molecule in focus: c-Kit—A hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase, Department of Medical Biosciences/Pathology, *Int J Biochem Cell Biol*, DOI:10.1016/j.biocel.2006.12.005.
- **Émile**, 2009, L'hématologie maligne, au carrefour de la cytologie et de la biologie moléculaire. *Option/Bio*, 20(418-419), 21–23.doi:10.1016/s0992-5945(09)70129-1
- **Damien Jonas Wilson**, 2019, Analyse cytogénétique – cytogénétique, in: *News medical life sciences*.
- **Daniel A., Arber, Attilio Orazi, Robert Hasserjian, J. urgen Thiele, Michael J. Borowitz, Michelle M. Le Beau, Clara D. Bloomfield, Mario Cazzola, and James W. Vardiman**, 2016. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *BLOOD* , Page: 2391-2392.
- **DOS SANTOS Cédric**, Soutenu en 2008, Activation anormale de la tyrosine kinase Lyn et de la voie PI3K/Akt dans les Leucémies Aiguës Myéloïdes (LAM) et ciblage pharmacologique, Toulouse, cancérologie.
- **Nicolas Duployez, Alice Marceau,Renaut, Nicolas Boissel, Arnaud Petit, Maxime Bucci, Sandrine Geffroy, Hélène Lapillonne, Aline Renneville et al** , 2016, Comprehensive mutational profiling of core binding factor acute myeloid leukemia, *j.blood*, 127:2451-2459.

- **Dupont JM.**, In : « Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology» June, 2008, volume14, gene section .
- **Ebbo M, Grados A, Bernit E, Harlé JR, Schleinitz N.** Comment j'explore une thrombopénie de l'adulte ? mt 2015 ; 21 (2) : 124-9 doi:10.1684/met.2015.0494
- **Fernando Cortes et Marie-Claude Labastie**, 2000, Contrôle moléculaire du développement du système hématopoïétique chez les vertébrés, médecine/sciences, 16 :198-204.
- **Frederick Appelbaum, M.D.**, 2015. Leucémie myéloïde aigue, in: Cecil Medicine Cancérologie, 24<sup>e</sup> édition, Lee Goldman, MD, 223:chapitre 189, page73.
- **Hayley Rose-Inman, MD, Damon Kuehl, MD.**, 2017, Acute Leukemia. Hematol Oncol Clin N Am 31 1011–1028.
- **Heesun J. Rogers, MD, PhD,1 Eric D. , Eric D. Hsi, MD Guilin Tang, MD, PhD Sa A. Wang, MDCarlos E. Bueso-Ramos.** 2017. Most Myeloid Neoplasms With Deletion of Chromosome 16q Are Distinct From Acute Myeloid Leukemia With Inv(16)(p13.1q22). Am J Clin Pathol ;147:411-419.
- **Imbert M.**, juin 2002, Place du biologiste dans le diagnostic et le suivi des leucémies aiguës.Revue Française des Laboratoires, , N ° 344
- **Isabelle Luquet. Audrey Bidet. Wendy Cuccuini. Marina Lafage-Pochitaloff. Marie-Joëlle Mozziconacci. Christine Terré**, 2016, Place de la cytogénétique dans la prise en charge des leucémies aiguës myéloïdes : actualisation par le Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH). Ann Biol Clin ; 74 (5) : 535-46.
- **Jacques Delaunay, Norbert Vey, Thierry Leblanc, Pierre Fenaux, Françoise Rigal-Huguet, Francis Witz, Thierry Lamy, Anne Auvrignon,** 2003, Prognosis of inv(16)/t(16;16) acute myeloid leukemia (AML): a survey of 110 cases from the French AML Intergroup. J BLOOD Page : 462-469.
- **Jeanette Prada-Arismendy, Johanna Arroyave Ospina, Sarah R ˆothlisberge**, 2016, Molecular Biomarkers in Acute Myeloid Leukemia, J blood. DOI: 10.1016/j.blre.2016.08.005.
- **John J. Yang , Tae Sung Park , and Thomas S. K. Wan**, 2017, Recurrent Cytogenetic Abnormalities in Acute Myeloid Leukemia. Thomas S.K. Wan (ed.), Cancer Cytogenetics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.
- **John T. Reilly**, 2004, Pathogenesis of acute myeloid leukaemia and inv(16)(p13;q22): a paradigm for understanding leukaemogenesis?, Molecular Haematology Unit, Division of Molecular and Genetic Medicine, Royal Hallamshire Hospital, Sheffield.

- **Julie GAY-GUERINET**, 22/10/2012, Facteurs de réponse dans les leucémies aiguës myéloblastiques traitées par azacytidine, université de Lille, médecine hématologie.
- **Kakoli Das, Patrick Tan**, 2013, Molecular Cytogenetics: recent developments and applications in cancer, clinical genetics, 84(4).
- **Kerbout Malika**, 2009, Apport de la cytogénétique dans le pronostic des leucémies aiguës myéloïdes de l'enfant. Labastie. Maroc
- **Laurent Meijer**, 2003, Le cycle de division cellulaire et sa régulation, Oncology, V5, page 1-16.
- **LAURIE POLESZCZUK**, 25 Novembre 2015, Apport de l'immunophénotypage par cytométrie en flux dans la classification morphologique des leucémies aiguës myéloïdes, UNIVERSITÉ TOULOUSE III, FACULTÉ DE MÉDECINE.
- **Leonie K Ashman, Renate Griffith**, 2013, Therapeutic targeting of c-KIT in cancer, J Expert Opinion on Investigational Drugs, 22(1), 103-115.
- **Liang Liua, Lin Yanga, Yingchang Mi b, Jianxiang Wang a,b, Jianyong Li c, Yue Zhang d, Xiaotang Maa, Tiejun Qind, Zefeng Xud, Zhijian Xiao**, 2011, RAD51 and XRCC3 polymorphisms: Impact on the risk and treatment outcomes of de novo inv(16) or t(16;16)/CBF<sup>-</sup>-MYH11(+) acute myeloid leukemia. Leukemia research 3, 1020-1026.
- **Löwenberg B, Downing JR, Burnett A**, 1999, Acute myeloid leukemia, J Med, 30;341(14):1051-62.
- **Ludovica Riera, Filippo Marmont, Daniela Toppino, Chiara Frairia, Francesca Sismondi, Ernesta Audisio, Cristiana Di Bello**, 2013, Core binding factor acute myeloid leukaemia and c-KIT mutations, University of Turin, Section of Pathology, 1867-1872.
- **Mandoli, A A Singh, P W T C Jansen, A T J Wierenga, H Riahi, G Franci, K Prange, S Saeed**, 2014, CBF<sup>-</sup>-MYH11/RUNX1 together with a compendium of hematopoietic regulators, chromatin modifiers and basal transcription factors occupies self-renewal genes in inv(16) acute myeloid leukemia, J Leukemia, volume 28, pages 770–778 .
- **Mark R. Litzow**, 2005, An elegant analysis of FLT3 mutational status in a large cohort of acute myeloid leukemia patients assesses the role of transplantation for these poor-prognosis patients, J blood, VOLUME 106, 3331-3332.
- **Margaret R. O'Donnell, Martin S. Tallman, Camille N. Abboud, Jessica K and al**, 2017, Acute Myeloid Leukemia, Version 3.2017. J Natl Compr Canc Netw 2017;15(7):926–957.



- **Michael R. Speicher et Nigel P. Carter**, 2005, The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. Page: 782-783.
- **Mondira Kundu, Chen A, Anderson S, Kirby M, Xu L, Castilla LH, Bodine D, Liu PP**, 2019, Role of Cbfb in hematopoiesis and perturbations resulting from expression of the leukemogenic fusion gene Cbfb-MYH1, *J blood*, 100(7):2449-56.
- **Muriel Malaise, Muriel Malaise, Daniel Steinbach, Selim Corbacioglu**, 2009, Clinical Implications of c-Kit Mutations in Acute Myelogenous Leukemia, *Current Hematologic Malignancy Reports*, Volume 4, Issue 2, pp 77–82.
- **Mylène BÉRI-DEXHEIMER**, 2009, Recherche de gènes candidats responsables d'anomalies du développement grâce à la caractérisation moléculaire de microremaniements chromosomiques. Sciences agricoles. Université Henri Poincaré - Nancy 1, Français.
- **Nassiri Aicha**, 2014, cytogénétique classique et moléculaire à propos de 568 observatio.
- **Nathalie D, Aurelie Chauveau, Nadia Gueganic, Gaëlle Guillerm, Corine Tous, Marie-Josée Le Bris, Audrey Basinko, Frederic Morel et all**, 2015, Acute myeloid leukemia (FAB AML-M4Eo) with cryptic insertion of cbfb resulting in cbfb-Myh11 fusion. *Hematol Oncol*, V35, pg 385-389.
- **Ngamaï Bele oli Carine**, 2010, Aspects épidémiologiques, diagnostics et thérapeutiques des leucémies aiguës chez l'enfant dans les trois centres hospitaliers universitaires (CHU) du BURKINA FASO HOSPITALIERS, université de Bamako, Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie.
- **Naval Daver, Richard F. Schlenk, Nigel H. Russell & Mark J. Levis**, 2019, Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence, *Leukemiavolume 33*, pages299–312.
- **Nayazic Halim**, 2015, Cytogénétique des hémopathies malignes. Projet de fin d'étude Licence en Sciences Biologiques appliquées et Santé. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah Faculté Des Sciences et Techniques – FES au Maroc.
- **Neeraj Adya, Nancy A. Speck, Pu Paul Liu**, 1998, The Leukemic Protein Core Binding Factor b (CBFb) Smooth-Muscle Myosin Heavy Chain Sequesters CBFa2 into Cytoskeletal Filaments and Aggregates, *Mol Cell Biol*, 18(12): 7432–7443.
- **Provan D, Stasi R, Newland A**, et al. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood* 2010 ; 115 : 168-86.
- **R. Berger**, Cytogénétique humaine. De 1956 à 2006 *Pathologie Biologie*, Volume 55, Issue 1, February 2007, Pages 1-12.

- 
- **Rumpler, Marcel Hauwy, Jean-Luc Fausser, Christian Roos, Alphonse Zaramody, Nicole Andriaholinirina, Dietmar Zinner** , 2011, Comparing chromosomal and mitochondrial phylogenies of sportive lemurs (Genus *Lepilemur*, Primates), *Chromosome Res*, 19(2): 209–224.
  - **SOUKAINA NAAMA**, 2015, *Téchnique de cytogénétique conventionnelles et modernes*, université de médecine et de pharmacie Rabat.
  - **Speck, Nancy A. et D. Gary Gilliland**, 2002, core-binding factors in Hematopoiesis and leukaemia, *Nature Reviews Cancer* volume2, pages502–513.
  - **Speicher MR, Carter NP.**, 2005, The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology, *Nat Rev Genet.* 6(10):782-92.
  - **Tannishtha Reya, Morrison SJ., Clarke MF., Weissman IL.**, 2001, Stem cells, cancer, and cancer stem cells, *Nature*, 414(6859):105-111.
  - **Thomas S.K. Wan**, 2017, Applications of Fluorescence In Situ Hybridization Technology in Malignancies, (ed), *Cancer Cytogenetics: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*. Page: 75-76.
  - **Trecul A.**, 2014-09-29 - Effet de l'acide valproïque sur l'hématopoïèse : rôle du réseau de régulation "microARN / Facteurs de transcription", Université de Lorraine, **Sciences du Vivant [q-bio]/Médecine humaine et pathologie**.
  - **Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD.**, 2002, The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*, (100) 2292-302.

**Annexes :**

**Equipements**



**Hotte à flux laminaire**



**Etuve à CO2**



**Centrifugeuse**



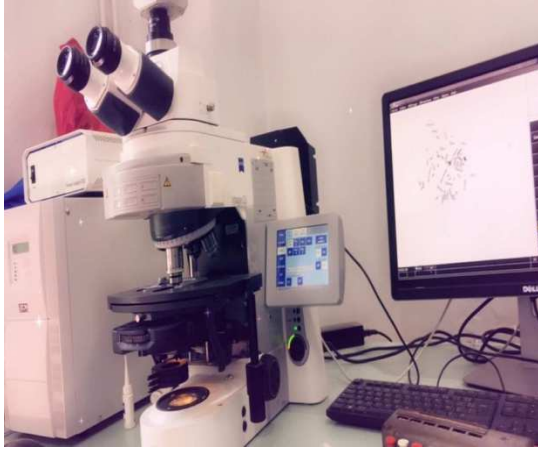
**Bain marie**



**Hybrite**



**Hotte Chimique**



**Microscope à fluorescence**



**Refrigerateur +4°C congélateur -20°C**

## Consommables



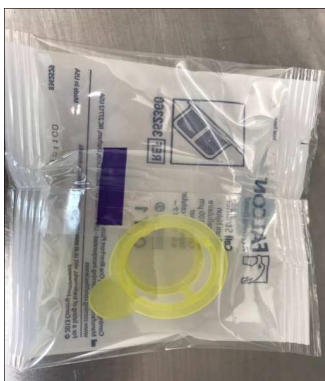
**Trocart de moelle**



**Flasque**



**Kit de prélèvement**



**Filtre**



**pipettes pasteur**



**Embouts**

- **Les réactifs de la mise en cultures**

- **RPMI complet** : 400ml RPMI 1640 + 100ml SVF+ 5ml L. glutamine-pénicilline-streptomycine + 1ml d'héparine.
- Solutions de synchronisation A et B
- Colchicine
- **Les réactifs de la sortie de culture**
- KCL pour le choc hypotonique
- Solution Carnoy : 1/3 acide acétique + 2/3 méthanol absolu

- **Les réactifs du caryotype**

- Tampon phosphate :  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
- Solution Giemsa
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12 \text{ H}_2\text{O}$

- **Les réactifs de la FISH**

- SCC
- PBS
- Igépal
- Tween
- Sonde Inv(16)/t(16 ;16) Cytocell
- DAPI
- Ethano

➤ **Préparation des solutions pour la FISH**

Avant de commencer toute technique de FISH, il faut d'abord préparer les solutions utilisées.

- Ethanol 70%, 85%, 100 %.
- Solution de Buffer (2scc).
- Solution IGEPAL 0,1%.
- Solution IGEPAL 0,3%.
- Solution Tween 20%.