

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université SAAD DAHLAB Blida 1

Faculté Des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

Laboratoire de recherche sur les Hémopathies Malignes et les Hémoglobinopathies,

Faculté de Médecine, B.P 270, Route de Soumaa, BLIDA, ALGERIE



MEMOIRE

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du Diplôme Master II

Domaine : Biologie

Filière : Génétique

THEME

**Intérêt pronostique de la délétion p53 dans la leucémie
lymphoïde chronique**

Soutenu le 15 juillet 2019

Présenté par : **KHELIFA Amira**

MELLEK Rym

Composition du jury :

Mme AMOKRANE

MAA

Présidente

Mr MOHAMED SAID. RM

MCB

Examinateur

Mme TAOUSSI S.

MCA

Promotrice

Mme SAADI L.

MCA

Co-promotrice

Promotion 2018/2019

Remerciement

Nous tenons à exprimer toute nos reconnaissances à notre promotrice Mme **TAOUSSI** Maitre de conférence A à l'université Blida 1 de nous avoir accueillie au niveau de son unité, de nous avoir encadré, orienté, d'être patiente et de nous avoir supporté. Pour sa générosité et son partage de savoir. La réalisation de ce travail n'aurait pas vu le jour si vous ne nous avez pas accepté.

Nous remercions notre co-promotrice **Mme SAADI** Maitre de conférence A à l'université Blida 1 pour toute l'aide qu'elle nous a apportée, nous sommes très chanceuses d'avoir travaillé avec vous, nous étions très touchées pour sa modestie, sa patience et sa générosité et son attention. Nous vous remercions infiniment pour tout le temps que vous avez consacré pour nous. Le partage de ses connaissances et son expérience scientifique en toute circonstance nous ont permis de bien avancer et d'être optimistes. Vous nous avez inspiré.

Nos remerciements s'adressent aussi à **Mme AMOKRANE** Maitre assistante à l'université Blida 1 d'avoir accepté de présider ce jury et pour son partage de savoir au cours de notre parcours et de nous avoir inspiré par sa passion envers la science ainsi que de nous avoir poussé à travailler très dure. Nous vous remercions pour vos conseils judicieux qui ont contribué à alimenter notre réflexion.

Nous exprimons toutes nos reconnaissances à notre chef d'option **Mr Mohamed SAID** Maitre de conférence B à l'université Blida 1 pour son partage de savoir au cours de notre parcours nous vous remercions d'avoir été très compréhensif durant tous les 5ans, merci beaucoup pour votre disponibilité, ainsi que vos conseils judicieux, nous sommes honorées et nous vous remercions d'avoir accepté de faire partie du jury.

Nous adressons nos remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail.

A la fin, nous aimerions remercier tous les enseignant de notre université qui ont contribué à notre instruction ainsi que celle de milliers d'étudiants. De nous avoir pousser, nous faire rêver et à regarder plus haut.



Dédicaces

Je dédie ce travail marquant de ma vie :

A mes parents que je ne remercierai jamais assez.

A ma mère, ma championne et ma superwoman. Je ne saurai jamais décrire ma gratitude pour toi, pour tes sacrifices. Merci d'être la maman la plus forte et la plus douce. Merci d'être si inspirante et si courageuse, merci pour ton amour inconditionnel. Tu es à jamais mon idole.

A mon père, mon héros. Aujourd'hui je me sens très heureuse par ta présence. Merci pour ton amour et tous les sacrifices que tu fais pour nous papa.

A ma chère sœur, ma poupée Romaïssa. Merci d'être ma source d'énergie et de mon bonheur. Tu es simplement la meilleure sœur au monde.

A mon frère, Abdelfattah, je te remercie pour ton optimisme et ta gentillesse. Merci d'être mon frère et mon support.

A mon fiancé, Oussama, merci de ton soutien sans faille et d'être toujours présent dans les bons moments comme dans les plus difficiles.

Je remercie aussi bien mes amies qui m'ont beaucoup soutenu. Merci d'avoir toujours été prêtes à m'aider : Riheb, Rym, Nora, Roufaïda, Linda,
Très chanceuse de vous avoir rencontré.

Khelifa Amira



Dédicaces

Du fond du cœur, je dédie ce travail à tous ceux qui me sont chers

A mes chères parents, les anges qui m'ont soutenu et encouragé durant ces années d'études.

Nul mot ne saurait exprimer à sa juste valeur le profond respect que je porte envers vous

Rien au monde ne pourrait compenser tout ce que vous avez fait pour moi.

Que ce travail soit le témoignage de ma gratitude et de mon grand amour.

A mes frères et à mes sœurs

Omar et Alaa, la source de bonheur et de joie

Nadjib et Asmaa, merci d'être toujours à mes coté, par votre présence, votre amour

Vous êtes l'exemple de persévérance, de courage et de générosité

A mon fiancé

Hocine, aucun mot ne peut exprimer ma joie de t'avoir dans ma vie.

Je remercie le bon DIEU qui a illuminé ma vie par ta présence.

A mes chères amies

Roufaida, Amira, Safia, Nora et Linda pour les bons souvenirs et le beau temps que nous avons passé ensemble, je vous souhaite le bonheur dans votre vie

A toute ma famille et à toutes les personnes que j'aime et qui m'aiment

Que DIEU vous protège.

Mellek Rym

Résumé

La leucémie lymphoïde chronique est la leucémie la plus fréquente chez l'adulte en occident, avec une nette prédominance masculine. Elle résulte d'une prolifération avec accumulation monoclonale maligne de lymphocytes B matures avec envahissement médullaire, sanguin et des autres organes hématopoïétiques. La maladie est liée autant à un défaut d'apoptose qu'à une prolifération excessive.

Le premier objectif de notre travail était de réaliser un examen cytogénétique par FISH centré sur la délétion 17p sur les culots cellulaires congelés de six patients atteints de leucémie lymphoïde chronique dans le plateau de cytogénétique hématologique du service Hématologie, EHS ELCC, Blida.

Les résultats obtenus se superposent cas par cas à ceux déjà retrouvés sur culot frais par le Professeur S. Taoussi. Cela témoigne de la reproductibilité de la méthode FISH et donc de sa fiabilité à rechercher cette délétion dans la LLC.

Le deuxième objectif était de préciser l'impact pronostique de la délétion (P53) dans la LLC ; pour ce faire, une étude rétrospective des cas index recrutés sur une période de 09 ans (2007-2015) a été présentée. Les données de cette étude révèlent la fréquence particulière de la délétion P53, avec une survie globale considérablement raccourcie (médiane = 25 mois) témoignant du très mauvais pronostic de cette anomalie dans la leucémie lymphoïde chronique.

Mots clés : LLC, FISH, délétion 17p, p53, cytogénétique.

ملخص

سرطان الدم الليمفاوي المزمن هو احد الأورام اللمفاوية الأكثر شيوعًا لدى البالغين في الغرب ، مع غلبة الذكور. هو تراكم خبيث للخلايا اللمفاوية أحادية النسيلة الناضجة وغزو للدم ونخاع العظام. يرتبط هذا المرض بعدم القدرة على برمجة الموت الخلوي وبالانتشار المفرط. إنه أحد أورام الخلايا اللمفاوية ب الناضجة حسب تصنيف منظمة الصحة العالمية.

الهدف من هذا العمل هو تقييم التكهن لحذف (17p13) لدى 172 مريضاً بلوكيميا الدم الليمفاوية المزمنة. تم إجراء الفحص الوراثي الخلوي بتقنية FISH يركز على الحذف p17 للرواسب المجمدة لستة مرضى مصابين بسرطان الدم الليمفاوي المزمن في مركز الوراثة الخلوية الدموية في قسم أمراض الدم، EHS ELCC، البليلة.

النتائج المتحصل عليها تتطابق كل حالة على حدة مع نتائج الرواسب الجديدة المتحصل عليها من طرف البروفيسور TAOUSSI. S. هذا يدل على إمكانية التكرار لطريقة FISH و بالتالي موثوقيتها في العثور على هذا الحذف في LLC الهدف الثاني كان توضيح تأثير النذر لحذف بروتين 53 في LLC للقيام بهذا العمل قمنا بتقديم دراسة باثر رجعي لحالات التي تم استقبالها على مدار 9 سنوات (2007-2015) تكشف بيانات هذه الدراسة عن التكرار الخاص بحذف بروتين 53 مع امد للعيش قصير (الوسيط:25 شهر) مما يشير الى تشخيص سيء للغاية لهذه الحالة الشاذة في LLC

الكلمات المفتاحية:

لوكيميا الدم الليمفاوية المزمنة، FISH LLC، حذف 17p13، p53، علم الوراثة الخلوية،

Abstract

Chronic lymphocytic leukemia is the most common leukemia in adults in the West, with a clear predominance of men. It results from proliferation with malignant monoclonal accumulation of mature lymphocytes with invasion of bone marrow, blood and other hematopoietic organs. The disease is linked as much to a lack of apoptosis as to excessive proliferation.

The primary objective of our work was to perform FISH-based cytogenetic examination centered on the 17p deletion on the frozen pellets of six patients with CLL in the Hematologic Cytogenetic center of Hematology, EHS ELCC, Blida Department.

The results obtained are superimposed case by case on those already found on fresh pellet by Professor S. Taoussi. This demonstrates the reproducibility of the FISH method and therefore its reliability in finding this deletion in the LLC.

The second objective was to clarify the prognostic impact of deletion (P53) in CLL; to do this; a retrospective study of index cases recruited over a period of 09 years (2007-2015) was presented. Data from this study reveal the particular frequency of the P53 deletion, with a significantly shortened overall survival (median = 25 months) indicating the very poor prognosis of this abnormality in CLL.

Keywords: CLL, FISH, deletion 17p, p53, cytogenetic.

Liste des figures

| Figure | Titre | Page |
|-----------|--|------|
| Figure 1 | Domaines structuraux et fonctionnels de la P53. | 6 |
| Figure 2 | Principales étapes des voies de signalisation apoptotiques. | 7 |
| Figure 3 | Hétérogénéité des voies de signalisation utilisées par la p53 assure son rôle de gardien du génome. | 9 |
| Figure 4 | Probabilité de survie à partir de la date du diagnostic chez les patients des cinq catégories génétiques | 12 |
| Figure 5 | Résultats de la FISH : F.F : délétion (P53) sur noyaux. | 22 |
| Figure 6 | Résultats de la FISH : délétion P53 et délétion (ATM) sur noyaux. | 23 |
| Figure 7 | Résultats de la FISH : délétion (P53) sur mitose. | 24 |
| Figure 8 | Résultats de la FISH : délétion P53 sur noyaux. | 25 |
| Figure 9 | Résultats de la FISH : délétion P53 sur mitose. | 26 |
| Figure 10 | Résultats de la FISH : délétion P53 su noyaux. | 27 |
| Figure 11 | La répartition des patients atteints de LLC selon le sexe | 29 |
| Figure 12 | Répartition des patients selon les stades de Binet | 30 |
| Figure 13 | La répartition des patients selon la présence des anomalies cytogénétique | 31 |
| Figure 14 | Courbe de survie globale selon les anomalies cytogénétiques de 172 LLC. | 32 |
| Figure 15 | Survie globale LLC avec délétion (P53) versus LLC sans délétion (P53). | 33 |

Liste des tableaux

| Tableau | Titre | Page |
|--------------|--|--------|
| Tableau I | La classification clinico-biologique de Binet. | 11 |
| Tableau II | Présentation des cas. | 21 |
| Tableau III | Résultats de l'hémogramme de premier cas. | 22 |
| Tableau IV | Résultats de l'hémogramme de troisième cas. | 23 |
| Tableau V | Résultats de l'hémogramme de troisième cas. | 24 |
| Tableau VI | Résultats de l'hémogramme de quatrième cas. | 25 |
| Tableau VII | Résultats de l'hémogramme de cinquième cas. | 26 |
| Tableau VIII | Résultats de l'hémogramme de sixième cas. | 27 |
| Tableau IX | Réactifs pour la culture et la sortie de culture cellulaire. | Annexe |
| Tableau X | Réactifs pour FISH. | Annexe |

Glossaire

Thrombopénie ou thrombocytopénie :

Est une diminution du nombre de plaquettes sanguines en dessous du seuil de 150 000 plaquettes par mm³ (Godeau et Bierlin., 2012).

Cellules nurse like (NLC) :

Ces cellules correspondent à une contrepartie des macrophages associés aux tissus qui sont associés aux leucémies. NLS jouent un rôle central dans la LLC, car elles favorisent la survie et la prolifération des cellules de la LLC (burger et *al*, 2009)

Hypogammaglobulinémie :

Indique la diminution du taux de gammaglobulines (représentant les immunoglobulines G et M) dépistée par l'électrophorèse des produits du sang (Eichhoest et *al*, 2015)

Hypermutation somatique :

Les hypermutations somatiques sont induites à la suite d'une stimulation antigénique, dans la zone sombre des centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires. Ces modifications sont essentiellement ciblées sur la région variable des gènes d'immunoglobuline des cellules B activées. Les mutations introduites permettent la modulation, et donc dans certains cas l'augmentation de l'affinité pour l'antigène. (Owen et *al*, 2013)

Commutation isotypique :

Par un réarrangement des gènes codant pour la chaîne lourde des Ig des cellules B, ce phénomène va permettre de changer le type d'immunoglobuline (Ig) produite en réponse à un antigène donné. Ces Ig seront ensuite produites par les plasmocytes, qui constituent le stade ultime de la différenciation de la lignée cellulaire B (Owen et *al*, 2013)

Liste des abréviations

Bax: Bcl-2-associated X protein.

BCL: B-Cell Lymphoma.

BMSC: Bone Marrow Stromal Cells.

BIM: Bcl-2 Interacting Mediator of cell death.

Cdk : Cyclin-dependent kinase.

CLCC : Centre de Lutte Contre le Cancer.

DHFR : Dihydrofolate Réductase.

ELCC : Etablissement de Lutte Contre le Cancer.

FISH: Fluorescence In Situ Hybridization.

HMS: Hypermutation Somatique.

IGF-BP3: Insulin- like Growth Factor-1 Binding Protein 3.

LAL : Leucémie Aigüe Lymphoblastique.

LAM : Leucémies Aigües Myéloblastiques.

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique.

MDM2: Murine Double Minute 2.

NLS: Nuclear Localisation Signal

PIG3: P53 Inductible Gene.

PRD: Proline-Rich Domain.

RAG: Recombination Activating Gene V(D) J.

SSC: Standard Sodium Citrate.

TK: Thymidine Kinase.

TS : Thymidylate Synthétase.

Sommaire

| | |
|---|----------|
| INTRODUCTION | 1 |
| CHAPITRE I : DONNES BIBLIOGRAPHIQUES | |
| I.1. Généralité sur les leucémies..... | 2 |
| I.1.1. Définition..... | 2 |
| I.1.2. Classification..... | 2 |
| I.2. Leucémie lymphoïde chronique | 3 |
| I.2.1. Généralité | 3 |
| I.2.2. Épidémiologie | 3 |
| I.2.3. Origine des cellules leucémique..... | 4 |
| I.3. Aspect physiopathologique de la leucémie lymphoïde chronique | 4 |
| I.4. Aspect et moléculaire de la leucémie lymphoïde chronique | 5 |
| I.4.1. Structure de gène p53 et sa localisation | 5 |
| I.4.2. Structure de la protéine P53 | 5 |
| I.4.3. Rôle de P53..... | 6 |
| I.5. Aspect clinique de la leucémie lymphoïde chronique..... | 9 |
| I.5.1. Circonstances de découvert : variable..... | 9 |
| I.5.2. Diagnostic positif | 10 |
| I.5.3. Facteurs pronostique | 11 |
| I.6. Méthodes d'études de la délétion P53..... | 12 |
| I.6.1. Caryotype..... | 12 |
| I.6.2. L'hybridation in situ fluorescente (FISH)..... | 13 |
| I.7. Délétion P53 ou délétion (17P13)..... | 13 |
| I.8. P53 muté au cours de la leucémie lymphoïde chronique | 14 |
| I.8. Evolution et complication | 14 |
| I.8. Traitement | 15 |

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

| | |
|---|-----------|
| Introduction..... | 16 |
| II.1. Matériel et méthodes..... | 16 |
| II.1.1. Matériels biologique | 16 |
| II.1.2. Matériels non biologique | 16 |
| II.2. Méthodes | 16 |
| II.2.1. Prélèvement | 16 |
| II.2.2. Comptage | 17 |
| II.2.3. Mise en culture | 17 |
| II.2.4. Sortie de culture | 17 |
| II.2.5. Etalement cellulaire sur lames | 18 |
| II.2.6. Hybridation <i>in situ</i> fluorescente | 18 |
| II.2.7. Lecture au microscope à fluorescence | 20 |

CHAPITRE III RESULTATS ET DISCUSSION

| | |
|------------------------------------|----|
| III.1. Résultats..... | 21 |
| III.1.1. Etude prospective..... | 21 |
| III.1.2. Etude rétrospective | 29 |
| III.2. discussion..... | 34 |
| III.3. Conclusion..... | 34 |

| | |
|--|-----------|
| CONCLUSION ET PRESPECTIVE | 35 |
|--|-----------|

Références bibliographiques

ANNEXE

Introduction

Introduction

Les leucémies sont des néoplasies développées à partir de cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse et du système lymphoïde. Elles peuvent se présenter cliniquement sous la forme de leucémies (présence de nombreuses cellules néoplasiques dans le sang circulant et la moelle osseuse) ou de tumeurs solides appelées sarcomes pour les cellules de la moelle osseuse (sarcome myéloïde, sarcome histiocytaire, etc.) ou lymphomes pour les cellules lymphoïdes (Diebold et *al.*, 2008).

La leucémie est dite myéloïde ou lymphoïde selon la lignée atteinte et est classée en deux catégories évolutives, aiguë ou chronique (Swerdlow., 2016). La leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) est une hémopathie maligne lymphoïde génétiquement hétérogène, à l'origine d'une évolution très variable allant de survies de quelques mois à plusieurs années (Swerdlow., 2008). L'une des anomalies génétiques récurrentes observées dans cette affection, la délétion (P53) est de très mauvais pronostic avec des taux de survie médiane ne dépassant pas 24 mois.

Les analyses cytogénétiques détectent les anomalies chromosomiques de la leucémie lymphoïde chronique grâce à plusieurs examens réalisées dans le laboratoire de cytogénétique en utilisant les techniques conventionnelles (Caryotype) et surtout moléculaires (FISH) dans le but de révéler ces anomalies.

Chapitre I

Partie bibliographique

I.1. Généralités sur les leucémies

I.1.1. Définition

Les leucémies sont des néoplasies développées à partir de cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse et du système lymphoïde. Elles peuvent se présenter cliniquement sous la forme de leucémies (présence de nombreuses cellules néoplasiques dans le sang circulant et la moelle osseuse) ou de tumeurs solides appelées sarcomes pour les cellules de la moelle osseuse (sarcome myéloïde, sarcome histiocytaire, etc.) ou lymphomes pour les cellules lymphoïdes (Diebold et *al.*, 2008).

I.1.2. Classification des leucémies

Selon l'OMS les leucémies sont classées par leur mode évolutif en :

- Leucémie aigües (LA), d'installation rapide, progressant très vite ; elles se caractérisent par une prolifération monoclonale médullaire avec accumulation de leucocytes immatures. Elle aboutit à un dérèglement aigu du fonctionnement normal de la moelle osseuse hématopoïétique.
- Leucémies chroniques (LC), d'évolution plus lente ; elles se caractérisent par une prolifération monoclonale médullaire de cellules souches avec accumulation de leucocytes différenciés. Elle aboutit à un dérèglement progressif du fonctionnement normal de la moelle osseuse hématopoïétique.

Ces deux groupes de leucémies sont à leur tour classés en sous-groupes en fonction de l'origine des cellules tumorales :

- Cellules lymphoïdes : leucémie aigüe lymphoblastique (LAL) et leucémie lymphoïde chronique (LLC).
- Cellules myéloïdes : leucémies aigües myéloblastiques (LAM) et leucémie myéloïde chronique (LMC) (Swerdlow., 2016).

I.2. Leucémie lymphoïde chronique

1.2.1. Généralités

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est définie comme un syndrome lymphoprolifératif chronique (SLPC) appartenant au groupe des néoplasies lymphoïdes B matures. En occident, c'est la plus fréquente chez l'adulte. Elle est caractérisée par une prolifération médullaire monoclonale et une accumulation de lymphocytes B mature immunologiquement incompetents avec passage dans le sang (taux de lymphocytes supérieur ou égale à 5 G/l). Ils envahissent les autres tissus lymphoïdes secondaires (Swerdlow., 2008).

Sur le plan physiopathologique, elle est caractérisée par 3 grandes particularités : un défaut d'apoptose, la fréquence des phénomènes auto-immuns et un déficit immunitaire qui peut être sévère. Certains patients atteints de LLC ne nécessitent jamais de traitement alors que d'autres présentent une évolution agressive avec une mauvaise réponse à la thérapie conduisant à la mort en quelque mois (Kipps et *al.*, 2017)

I.2. 2. Epidémiologie

La LLC représente 3 à 4 % de toutes les tumeurs malignes, l'incidence est similaire en Europe et aux États-Unis et varie de 4 à 6 cas par an. Elle est moins fréquente chez les personnes d'origine asiatique ou africaine (Roman et Smith, 2011). Dans toutes les séries de la littérature, la prédominance masculine est nette avec un ratio homme /femme = 2. En occident, l'âge médian au diagnostic est de 72 ans (Wendter et *al.*, 2012). Elle est exceptionnelle avant 40 ans (Roman et Smith., 2011).

En Algérie l'incidence annuelle moyenne de la LLC est estimée à 0,72 cas /100000 habitants. Cette faible incidence est expliquée par le jeune âge de la population et un diagnostic tardif (Dali et *al.*, 2015).

I.2. 3. Origine des cellules leucémiques

Il a été démontré que la région variable de la chaîne lourde (IgVH) du BCR stratifie les patients atteints de LLC en 2 sous-groupes présentant des résultats cliniques significativement différents.

Les cellules LLC expriment les gènes de région IgVH muté ou non muté, reflétant le stade de différenciation des LB normaux dont elles sont issues (Fabbri et Dalla-Favera., 2016).

Les cellules LLC qui expriment des IgVH non muté (IgVH-UM) proviennent d'une cellule B non différenciée dans les centres germinatifs ou dérivé d'une cellule B naïve (Hamblin et *al.* ; 1999).

Les cellules LLC avec IgVH muté (IgVH-M) proviennent d'un Lymphocyte B post -germinal, exprimant une Ig de surface qui subit une hypermutation somatique (HMS) et dans certains cas une commutation isotypique (Damle et *al.*, 1999 ; Tobin et *al.*, 2002).

Le sous-groupe IgVH-M est associé à un bon pronostic tandis que le groupe IgVH-UM est associé à un mauvais pronostic (Hallek., 2008).

I.3. Aspect physiopathologique de leucémie lymphoïde chronique

La LLC se caractérise par une accumulation des lymphocytes B de morphologie normale qui coexpriment les antigènes des lymphocytes B (CD19, CD20 et CD23 et l'antigène des lymphocytes T (CD5). L'expression d'immunoglobulines de surface, de CD20 et de CD79b est caractéristiquement faible par rapport à ceux observés sur les lymphocytes B normaux. A l'échelle cellulaire, il a été montré que le récepteur BCR et l'activation de sa voie de signalisation jouent un rôle dans l'expansion, la prolifération et la survie des cellules tumorales de LLC. Les cellules tumorales interagissent avec les cellules du microenvironnement comme les cellules stromales médullaires et les cellules nurse-like, formant une niche évitant aux cellules de LLC de subir l'apoptose. (Hallek, et *al.*, 2008 ; Troussard et Cornet., 2016).

I.4. Aspect moléculaire de la leucémie lymphoïde chronique

Les mécanismes déterminants l'apparition d'une LLC sur les plans moléculaires sont très nombreux et complexes. Nous développerons dans notre partie théorique que ceux impliquant le gène P53.

I.4.1. Structure du gène P53 et sa localisation

Le gène P53 a été découvert en 1979. C'est le premier suppresseur de tumeur identifié. Il est localisé au niveau du chromosome 17p13.1 et s'étend sur 20kb et comprend 11 exons et 10 introns. Chez l'Homme, le TP53 code pour une protéine de 393 acides aminés, appelé p53 (Linzer et Levine., 1979 ; Deleo et *al.*, 1979 ; Bakert et *al.*, 1989).

I.4.2. Structure de la protéine p53 (figure 1)

C'est un homotetramère. Chaque monomère est constitué de 4 domaines structuraux :

Domaine N-terminal : Appelé domaine de trans-activation (Saha et *al.*, 2015), est une région cruciale pour la liaison de MDM2 (murine double minute 2).

L'interaction de l'E3 ubiquitine ligase permet l'ubiquitination de p53 et sa dégradation (Meek., 2015), cette région participe à la régulation et la stabilisation de p53 (Dorman et *al.*, 2003).

Domaine riche en proline (PRD) : Comprend 5 motifs de type PXXP (p ; proline et X : n'importe quel acide aminé), il intervient dans l'arrêt du cycle cellulaire ainsi qu'à l'induction de l'apoptose (Moueden., 2018).

Domaine central de p53 : constitue le domaine nécessaire à la fonction onco-suppressive ; intervient dans la formation du complexe Zn⁺² dépendant ADN_P53 (Joerger et *al.*, 2003). L'absence de Zn⁺² entraîne l'agrégation de p53 en affectant la spécificité de la liaison à l'ADN (Duan et Nilson., 2006). 97% des mutations de gène P53 sont localisées dans cette région. (Oliver et *al.*, 2002).

Domaine C-terminal : Renferme des séquences nécessaires pour la localisation nucléaire et pour la liaison à l'ADN, un domaine de tétramérisation et un domaine de régulation post-traductionnel qui joue un rôle clé dans le contrôle de renouvellement de p53 et la régulation de ses activités. Des mutations ponctuelles dans cette région altèrent la capacité de p53 d'induire l'apoptose (Appella et Anderson., 2001 ; Carr et al., 2012 ; May et al., 1999).

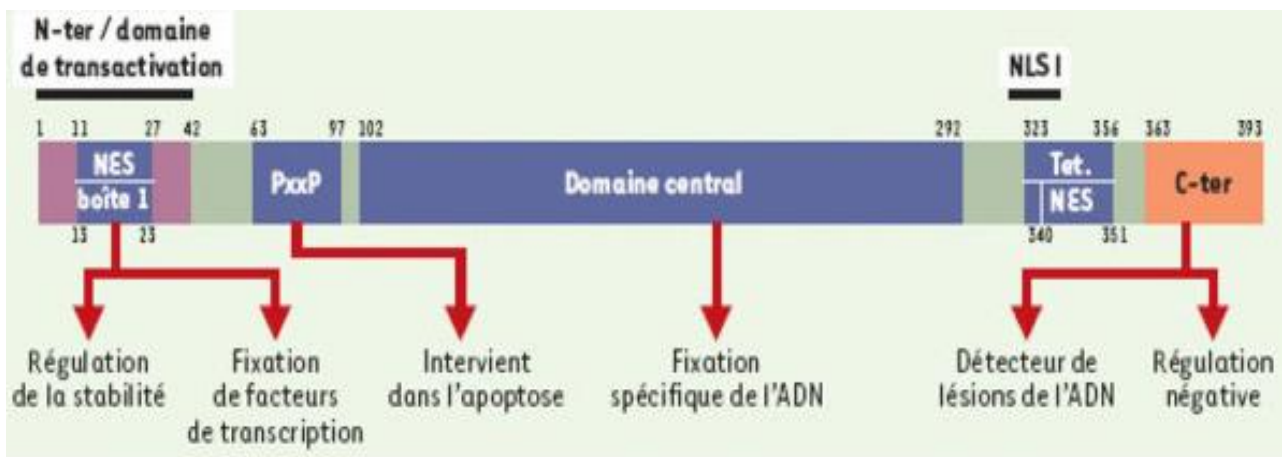


Figure 1 : Domaines structuraux et fonctionnels de la P53 (Moueden., 2018).

I.4.3. Rôle de p53

La protéine de tumeur 53 a une durée de vie très courte de 20 à 30 minutes (Maltzman et Czyzyk., 1984), en réponse à un stress (dommage de l'ADN ou l'activation des oncogènes), la p53 est stabilisée par l'inhibition de sa dégradation. Une fois stabilisée, la p53 induit selon le type et le degré de stimulation, l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose ou la réparation de l'ADN (Sandra Alvarez., 2003 ; Hu et al., 2012). Ceci afin d'arrêter la prolifération incontrôlée des cellules et permettre de réparer leur ADN endommagé ou de les éliminer. Ainsi, le p53 stimule la phosphorylation oxydative mitochondriale induisant la production de l'ATP et la réduction de synthèse de substrat nécessaire à la prolifération et la division cellulaire (Feng et Levine., 2010).

I.4.3.1. P 53 et apoptose

Suite à un dommage de l'ADN, l'activation de p53 est nécessaire pour l'apoptose. Cette voie requiert l'activation par p53 du gène Bax. La protéine Bax, en se dimérisant, va perforer la membrane mitochondriale pour permettre au cytochrome c d'en sortir. La sortie du cytochrome c de la mitochondrie vers le cytosol est un événement central dans le processus apoptotique intrinsèque, et le IGF-BP3 qui agirait en séquestrant le facteur de survie cellulaire IGFI et aussi l'induction de gène PIG3 impliqué dans la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS) contribuant à la mort cellulaire programmée (Soussi., 2000 ; Migdal et Serres., 2011).

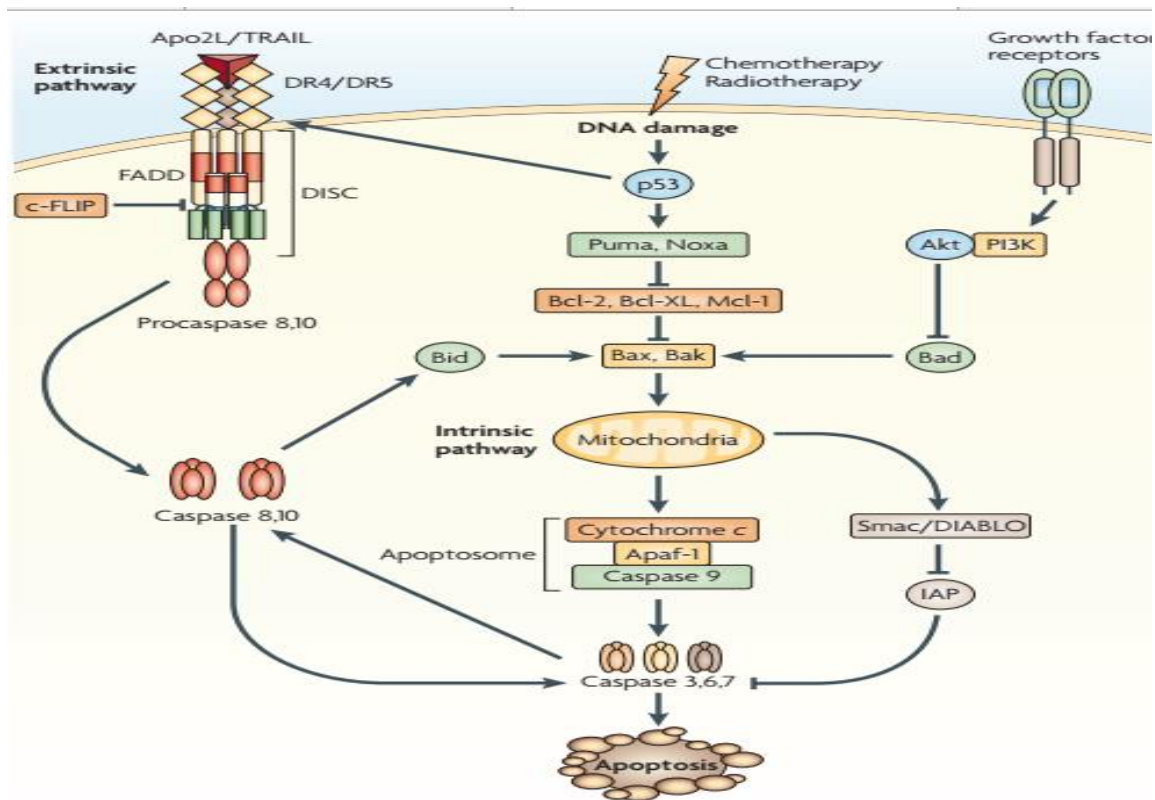


Figure 2 : Principales étapes des voies de signalisation apoptotique (Ashkenazi., 2008).

I.4.3.2. P53 et arrêt du cycle cellulaire

La p53 entre dans la régulation du point de contrôle entre G1 et S et l'autre point de G2 et M.

- Pour le 1^{er} point de contrôle G1-S :

En présence d'un stress cellulaire ; cette protéine change sa conformation en tétramère (forme active), elle se fixe sur l'ADN et augmente la transcription et l'expression des gènes cibles, notamment elle stimule le gène TP21. La p21 inhibe la phosphorylation de la protéine Rb (rétinoblastome), cette dernière reste complexée aux facteurs de transcriptions E2F lui-même stimule la transcription des gènes conduisant à la synthèse d'enzymes impliquées dans la division cellulaire qui sont : la dihydrofolate réductase (DHFR), la thymidine Kinase (TK), la thymidylate synthétase (TS), la DNA polymérase et les Cdk qui ne peuvent pas activer la phase S (Soussi., 2000).

- Pour le 2eme point de contrôle G2-M

Le facteur clé c'est le complexe Cdc2-cycline B1 qui ne rentre au noyau qu'au moment de la mitose, le gène 14-3-3 σ activé par le p53 est capable de séquestrer ce complexe Cdc2 cycline B dans le cytoplasme et l'empêche de rentrer au noyau pour provoquer un arrêt de la division cellulaire en phase G2 (Soussi., 2000 ; Godin et Cumano., 2007).

I.4.2.4. Rétrocontrôle de p53 par murine double minute 2

Dans le cas normal, la p53 est en équilibre constant entre la production et la dégradation. Sa dégradation est associée à la liaison avec MDM2 (Brooks et Gu., 2006) induite par le p53, au niveau des résidus lysines localisés dans la région C-terminal de p53 (Rodriguez et *al.*, 2000). La plupart des mutations du gène p53 entraînent une perte totale de l'activité transactivatrice de la protéine p53, ce qui a pour conséquence d'abolir la réponse à un stress dépendante de p53 (Sandra Alvares., 2003).

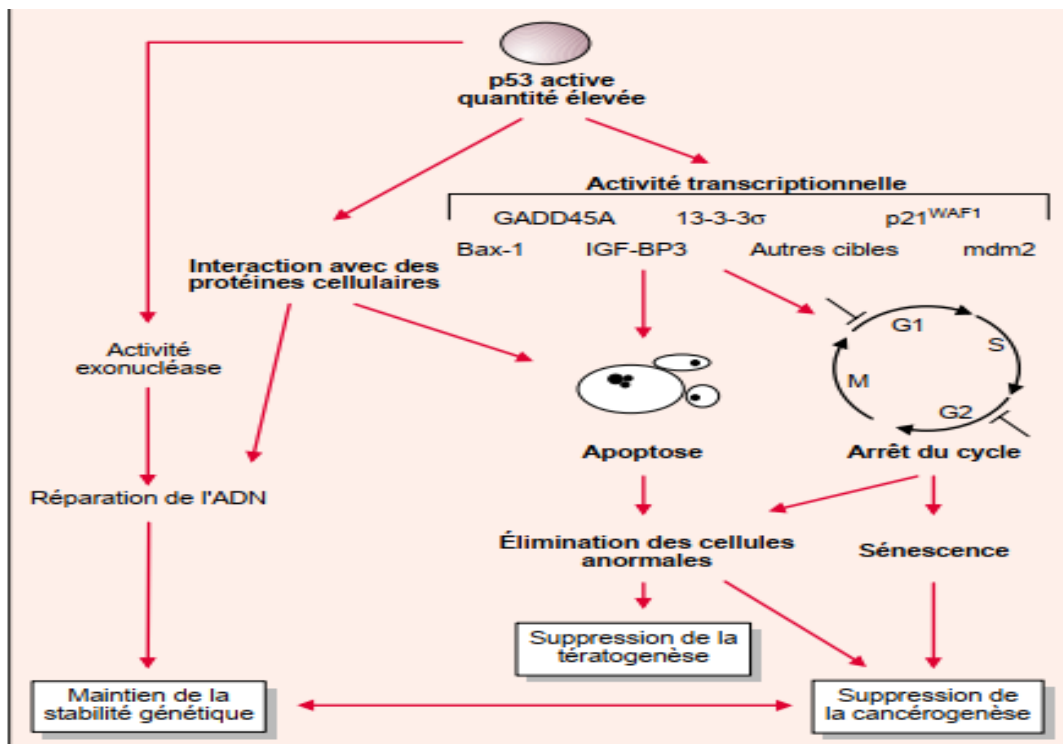


Figure 3 : Hétérogénéité des voies de signalisation utilisées par la p53 assure son rôle de gardien du génome (Soussi., 2000).

I. 5. Aspect clinique de la leucémie lymphoïde chronique

Les tableaux cliniques dans la LLC sont polymorphes et traduisent une évolutivité de la maladie très différente d'un patient à l'autre.

I.5.1. Circonstances de découverte : variables

- Au décours d'un hémogramme systématique révélateur (médecine du travail ou autre pathologie).
- Lors de signes généraux : asthénie mais très souvent, l'état général est conservé.
- Devant un tableau d'adénopathies généralisées, bilatérales, symétriques (c'est le tableau le plus fréquent en Algérie) et ou une splénomégalie.
- Devant un syndrome d'insuffisance médullaire : anémie et ou thrombopénie.

- Au décours d'une complication : infectieuse, anémie hémolytique auto immune (Eichhorst et *al.*, 2015).

I.5.2. Diagnostic positif

- **Hémogramme** : Hyperleucocytose variable souvent supérieure à 50 000 / μ l dont la composante majeure est une hyper lymphocytose toujours supérieure à 5000/ μ l, persistante sur plusieurs examens (plus de 3 mois), ou supérieure à 15000/ μ l sur un seul examen (Zandecki., 2006).
- **Examen du frottis sanguin** : petits lymphocytes matures ; les ombres de Gümprrecht (Troussard et *al.*, 2013 ; Hallek et *al.*,2008).
- **Immunomarquage lymphocytaire par cytométrie en flux** : Examen clé du diagnostic Les lymphocytes de LLC sont de phénotype B expriment le CD19, CD20 faible et expriment un ensemble des marqueurs qui définissent le score de Matutes fait de 5 points :CD5+, CD23+, FCM 7-, CD79b faible et une seule chaîne Légère membranaire K ou λ (monoclonalité) (Hallek et *al.*,2008) Un score de Matutes ≥ 4 pose le diagnostic de certitude de LLC, Un score < 3 élimine un diagnostic de LLC, et Un score = 3 ouvre une discussion cytologique, immunophénotypique avec d'autre marqueur (CD10, cycline D1, CD40, CD200) et cytogénétique, pour retenir ou éliminer une LLC (Lauren Rigollet., 2013).
- **Myélogramme** : est inutile au diagnostic : infiltration par des lymphocytes matures à un taux > 30 %. (Sébahoun, 2005 ; Zandecki., 2006).
- **Electrophorèse des protides avec taux de γ globulines** : la LLC se caractérise par la présence d'une hypogammaglobulinémie qui contribue parmi d'autres facteurs à l'état d'immunodépression que le malade présente au cours de son évolution. Toute fois un taux normal voire un pic monoclonal souvent de type IgG k peut se voir (Zandecki., 2006).

- **La classification clinico-biologique de Binet (tableau I)**

| | |
|---------|--|
| Stade A | Moins de 3 aires ganglionnaires atteintes, avec hémoglobine $\geq 10\text{g/L}$, plaquettes $\geq 100\text{ g/L}$. |
| Stade B | Au moins 3 aires ganglionnaires atteintes avec hémoglobine $\geq 10\text{g/L}$, plaquettes $\geq 100\text{ g/L}$. |
| Stade C | Anémie : hémoglobine $< 10\text{g/L}$ et/ou thrombopénie plaquettes $< 100\text{ G/l}$ quelque soit l'atteinte ganglionnaire |

(Binet et al, 1981)

I.5.3. Facteurs pronostiques

Le stade détermine la gravité de la maladie et la réponse au traitement.

- **Les marqueurs sériques** : Le CD23 présente une forme tronquée appelée CD23 soluble (CD23s). Il est augmenté entre 3 et 500 fois dans le sérum de patients atteints de LLC, contrairement aux sujets sains (Bergmann et al., 2007 ; Troussard., 2009).
- La beta 2-microglobuline et la thymidine kinase marqueurs de masse tumorale peuvent prédire la survie ou la progression de la maladie (Haute Autorité de Santé., 2011).
- **Le statut mutationnel des gènes IgVH** : Les patients avec un gène IgVH non muté ont un mauvais pronostic. (Devereux et al., 2017 ; Thorselius et al., 2006).
- **Anomalies génétiques dans la LLC**

La LLC est caractérisée par des anomalies chromosomiques déséquilibrées (gains ou pertes), en particulier des délétions et des amplifications, dont les plus fréquentes sont les délétions 13q, 11q, 17p et la trisomie 12 (Figure 4) (Klein et al., 2001 ; Döhner et al., 2000).

Ces différentes anomalies sont corrélées à des survies différentes ; la plus péjorative est représentée par la délétion 17p13 (délétion P53).

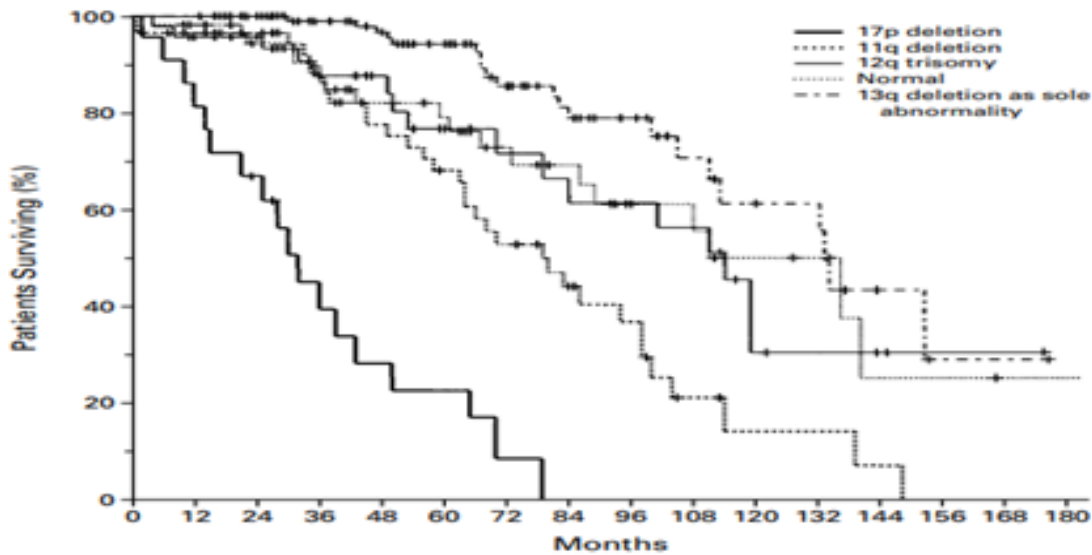


Figure 4 : Probabilité de survie à partir de la date du diagnostic chez les patients des cinq catégories génétiques (Döhner et *al.*, 2000).

I.6. Méthodes d'étude de la délétion p53

I.6.1. Caryotype

C'est un examen qui permet de visualiser l'ensemble des chromosomes, Dans certaines situations, les insertions et les micro-délétions ne sont pas visualisées (Mylène Beridexheimer., 2009)

En caryotype, la del17p13, du fait de sa petite taille, est parfois cryptique et nécessite une bonne résolution pour sa détection. Les clones minoritaires peuvent ne pas être visualisé surtout à l'ère des anciens mitogènes utilisés dans la culture des lymphocytes de LLC. Actuellement, avec l'apport des oligonucléotides et IL2, la fréquence des anomalies chromosomiques détectées par caryotype a rejoint celle de L'hybridation in situ fluorescente (FISH) avec la notion du caryotype complexe à pronostic péjoratif. Ce dernier contient parmi ces anomalies une bonne partie de del17p13 (Lamaison., 2016).

I.6.2. L'hybridation in situ fluorescente

C'est une technique ciblée et plus sensible que le caryotype. Elle surmonte le problème de la quantité et la qualité des mitoses à étudier, du fait que l'étude peut se faire sur noyaux (FISH interphasique sans culture cellulaire et/ou sur mitose si on réalise une culture cellulaire) (Christine Lefebvre., 2014).

Il s'agit d'une hybridation de sondes à des séquences spécifiques. La détection de clone minoritaire sur noyaux est parfaitement possible, les clones peuvent être présents au diagnostic avant tout traitement ou représentent des clones de sélection chez des patients traités. Ces clones sont à surveiller au cours de l'évolution de la pathologie (Lamaison., 2016).

La délétion P53 peut être recherché par une sonde locus qui ne cible que le locus 17p13 ou en utilisant une sonde double qui recherche au même temps la délétion P53 et la délétion ATM (11q22) (Nguyen., 2016).

I.7. Délétion p53 ou délétion (17p13)

Elle représente 7% à 10% des cas de LLC au diagnostic initial. (Döhner et *al.*, 2000 ; Dicker et *al.*, 2009). C'est une perte de la région 17p13.1, site du gène suppresseur de tumeur P53.

La délétion 17p13 est associée à un pronostic très défavorable, avec une survie sans traitement de 9 à 32 mois (Oscier et *al.*, 2002 ; Zenz et *al.*, 2008 ; Hallek et *al.*, 2010 ; Wierda et *al.*, 2011 ; Fischer et *al.*, 2011 ; Doubek et *al.*, 2011 ; Bullian et *al.*, 2012).

Les patients porteurs d'une délétion (P53) sont habituellement résistants aux traitements comportant de la fludarabine et de manière plus générale à toute chimiothérapie conventionnelle. Ils constituent de ce fait un groupe de patients réfractaires pour lesquels de nombreux essais cliniques utilisant des thérapies innovantes (ciblées), sont développés pour améliorer le caractère péjoratif de cette anomalie (Hallek., 2008).

I.8. P53 muté au cours de leucémie lymphoïde chronique

Il existe plusieurs modes d'inactivation des fonctions suppressives de p53. Au niveau génomique, il s'agit le plus souvent d'une inactivation bi-allélique par délétion d'un allèle et mutation somatique de l'autre (Zenz *et al.*, 2008).

Les mutations du gène P53 résultent souvent en une diminution de la dégradation par MDM2 conduisant à l'accumulation de protéine p53 mutante, celle-ci exerce un effet dominant-négatif sur la liaison à l'ADN et l'action Trans activatrice de la protéine (Brosh et Rotter., 2009).

Au niveau de l'ARN, l'épissage alternatif, éventuellement favorisé par une mutation du site d'épissage, peut induire une activité transcriptionnelle sélective de p53, ou une perte d'activité transcriptionnelle. Certains micro ARN peuvent également interférer au niveau post-transcriptionnel et diminuer la traduction de p53. Ces mutations sont actuellement recherchées devant toute LLC réfractaire avec ou sans délétion P53 (Johnson *et al.*, 2009 ; Bilous *et al.*, 2012).

I.9. Evolution et complications

La fréquence accrue des infections, pourrait être un mode de révélation et elle caractérise cette maladie tout au long de son évolution. L'infection est la première cause de décès dans la LLC du faite de l'immunodépression cellulaire et humorale qui caractérise cette maladie (Hallek., 2008).

Une cytopénie auto-immune peut survenir au diagnostic ou compliquée une maladie évoluée.

I.10. Traitement

En règle générale, les stades A ne sont pas traités à surveiller régulièrement. Pour les patients qui ont besoin de traitement (maladie progressive), on dispose d'un panel de chimiothérapie, d'immunothérapie et de thérapie ciblée (Hallek., 2008).

La chimiothérapie repose sur la Fludarabine, le Cyclophosphamide et la Bendamustine. L'immunothérapie repose sur l'anti CD20, le plus utilisé est le Rituximab en association à une chimiothérapie ; d'autres anticorps anti-CD20 sont utilisés comme Obinutuzumab, Ofatumumab (Sébahoun., 2005).

Des thérapies ciblées sont récentes ou encore en cours de développement : l'Ibrutinib cible la protéine associée au récepteur du lymphocyte B (Dougé, et *al.*, 2016). Le Venetoclax cible la molécule Bcl2. Ces molécules (anti-BCR et anti-BCL2) ont des résultats prometteurs chez les patients avec délétion P53 qui s'intègrent dans la catégorie des LLC réfractaires (Étienne-Selloum., 2018). En cas de LLC avec P53, la greffe de moelle peut être discutée dans les formes graves du sujet jeune. Actuellement et selon les recommandations internationales, sa place vient après la thérapie ciblée (Jain, N. et O'Brien, S., 2015).

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

Introduction

Les objectifs de notre étude sont de réaliser durant notre travail pratique au niveau du laboratoire de cytogénétique, service hématologie, Centre de lutte contre le cancer (CLCC), Hôpital Frantz fanon à Blida, une étude cytogénétique par Hybridation In Situ Fluorescente (FISH) centrée sur la délétion 17p chez 6 patients atteints de leucémie lymphoïde chronique et de préciser l'impact pronostique de la délétion (P53) dans la LLC ; pour ce faire, une étude rétrospective des cas index recrutés sur une période de 09 ans (2007-2015) sera présentée pour évaluer son impact sur le pronostic de cette anomalie.

II.1. Matériel et méthodes

II.1.1 Matériel biologique

Des culots cellulaires congelés issus de patients déjà typés par FISH ont été utilisés au niveau du plateau technique de cytogénétique du service hématologie de l'EHS CLCC, CAC Blida.

II.1. 2 Matériel non biologique

La réalisation de notre étude a nécessité l'utilisation d'une gamme d'appareillage et de réactifs. L'ensemble du matériel est illustré dans l'Annexe.

II.2. Méthodes

Du fait de la rareté de la délétion (17p) dans la LLC, notre travail pratique commence par l'étalement des culots cellulaires de LLC avec délétion (17p) connus.

II.2.1. Prélèvement

Le prélèvement sanguin périphérique de 5 ml de sang total est fait de façon stérile avec dispositif vacutainer hépariné qui est rapidement acheminé au laboratoire pour des examens cytogénétiques.

II.2.2. Comptage

Juste après le prélèvement du sang périphérique nous effectuons une numération sur l'automate d'hématologie pour le comptage des globules blancs (GB). La quantité de sang veineux à mettre en culture dépendra du nombre de GB ; en cas d'hyperleucocytose majeure ($>100.000\mu\text{l}$), une dilution de $\frac{1}{2}$ jusqu'à $\frac{1}{10}$ est réalisée. L'objectif est de mettre en culture 1000.000 de cellules / ml de milieu de culture.

II.2.3. Mise en culture

Toute mise en culture est effectuée stérilement sous hotte à flux laminaire Sur l'étiquette de chaque flasque nous inscrivons : le nom, le prénom, la date de culture, type de culture et la technique utilisée (72h mitogène). Dans chaque flasque, nous ajoutons la quantité de sang prélevée du tube mélangé avec 10 ml de RPMI complet, l'IL2 et le DSP30. La culture se fait dans des flasques à bouchons dévissés d'un quart de tour, incubés à plat dans un plat en inox dans une étuve à 37°C et 5% de CO_2 pendant 72h.

II.2.4. Sortie de culture**II.2.4.1. Blocage des cellules en métaphase**

Après 72 de culture, toujours en milieu stérile (sous hotte), nous mettons 100 μl de colchicine sur échantillon pendant 30 min pour inhiber la mitose. Après 30mn d'action de la colchicine, nous faisons sortir les flasques de l'étuve à CO_2 .

II.2.4.2. Choc hypotonique

Le choc hypotonique a pour objectif l'étirement de la membrane cytoplasmique, la fragilisation des membranes nucléaires et cytoplasmiques en laissant tomber une goutte de la suspension cellulaire sur lame. Il se produit un éclatement des membranes fragilisées libérant ainsi les chromosomes qui restent toutefois groupés.

Le choc est fait à l'aide du KCl qui entraîne le gonflement des cellules par différence de pression osmotique. Nous Transvasons les flasques dans des tubes coniques (15 ml) étiquetés par le nom, prénom du patient, type et date de culture. Après nous Centrifugeons les tubes fermés à 1300 tours pendant 8 min, puis le surnageant est enlevé en laissant un $\frac{1}{3}$ culot pour $\frac{2}{3}$ de surnageant et nous Rajoutons un ml de KCL réchauffé à 37°C , une homogénéisation douce est nécessaire. Nous Complétons progressivement par le KCL jusqu'à

12 ml on procède à des aspirations refoulements de ce mélange sur la paroi interne du tube conique plusieurs fois (choc mécanique) à la fin nous Incubons ces tubes sans bouchons à l'étuve sèche à 37c° pendant 25 minutes.

II.2.4.3. Préfixation

Nous ajoutons sur cette suspension cellulaire 1 ml de solution de fixation, et on l'homogénéise doucement et progressivement, les tubes sont centrifugés a 1300 tours pendant 8 min, puis on enlève le surnagent en laissant 1/3culot pour 2/3 de surnageant.

II.2.4.4 Fixation

Le culot est mise en suspension, cette dernière est mélangée avec 1 ml du fixateur. Le mélange est homogénéisé délicatement, puis nous Complétons jusqu'à 8 ml de fixateur et on les homogénéise. Les tubes sont centrifugés à 1300 tours pendant 8 min.

Nous Refaisons cette fixation deux à trois fois maximum ; pour avoir un culot cellulaire clair. Une fois obtenu, on le garde à 4°C.

II.2.5. Etalement cellulaire sur lames

L'étalement se fait à partir du lendemain de la sortie de culture sauf urgence, a une température ambiante de 23° à 25°C et un taux d'humidité de 30 à 40 %, les tubes ont été centrifugés à 1300 tours pendant 5 min, le surnageant obtenu est éliminé pour obtenir 1/3 de culot et 2/3 de fixateur, à l'aide d'une pipette pasteur cette suspension est homogénéisée. Après préparation des lames avec l'inscription du nom-prénom, date de culture, technique et la sonde P53 (17p13) /ATM (11q22) disponible dans le laboratoire, et avec une pipette pasteur une goutte de culot cellulaire est disposée au centre de la lame.

II.2.6. Hybridation In Situ Fluorescente

Dans cette étude, nous avons utilisé le protocole de FISH pratiqué en routine au laboratoire de cytogénétique du CAC de l'Hôpital Frantz Fanon BLIDA.

La technique est réalisée suivant plusieurs étapes :

II.2.6.1. Prétraitement des lames

Avant le prétraitement plusieurs solutions sont préparées :

- Ethanol 70%,85%,100% Solution IGEP 0.1%
- Solution IGEP 0.3 %
- Solution de Buffer 2 SSC
- Solution Tween

Les lames sont prolongées dans du 2 SSC Standard Sodium Citrate pendant 2 min à température ambiante, une déshydratation est effectuée dans des bain d'éthanol (70% 85% 100%) pendant 2 min dans chacun à température ambiante les lames sont laissées pour le séchage à l'air libre.

II.2.6.2. Dénaturation et hybridation

La sonde est retirée du congélateur -20°C et elle est préchauffée à température ambiante, nous pipetons plusieurs fois pour l'homogénéiser. La sonde et les lames d'échantillons sont préchauffés ensemble à 37°C pendant 5 min. Une fois que les lames et la sonde sont préchauffés, une quantité de 10 µl de sonde est déposée sur l'échantillon, ces derniers on les couvrons avec des lamelles puis sont laissés pour le séchage. Les lames sont mises dans le Thermobrite pour la dénaturation à 75°C pendant 2 min.

Les lames sont incubées dans le Thermobrite pendant une nuit à 37°C à l'abri de la lumière

II.2.6.3. Lavage post hybridation

Le lavage post hybridation a pour but d'éliminer les hybrides non spécifiques et les molécules de sonde non hybridées ainsi que les lamelles.

Les lames sont lavées dans du tampon IGEP 0.1 % à température ambiante pendant 2 min, puis les lamelles sont retirées délicatement, nous transférons les lames dans la solution IGEP 0.3 % à 72°C pendant 2 min, puis les lames sont plongées dans du Tween à température ambiante pendant 30 secondes sans agitation. Nous retirons les lames de solution Tween et on les transfère dans des bains d'éthanol successif (70%85%100%),1min dans chaque bain à température ambiante. Les sont séchées à l'abri de la lumière

Après avoir séché les lames une application du 10^µl de DAPI est nécessaire sur chaque échantillon et nous les recouvrons avec des lamelles a la fin sont conservées a 4c° jusqu'à la lecture au microscope a épifluorescence.

II.2.7. Lecture au microscope à fluorescence

La lecture se fait dans une chambre noire, avec comptage des signaux sur au moins 200 noyaux et 20 mitoses.

CHAPITRE III
RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. RESULTATS

III.1.1. Etude prospective

Nous avons réalisé dans le plateau de cytogénétique hématologique du service Hématologie, EHS ELCC, Blida, sur des culots congelés de patients atteints de leucémie lymphoïde chronique, 6 manipulations de FISH.

Nous exposons les résultats de ces six cas

III.1.1.1. Présentation des cas (tableau II)

| Numéro de patients | Sexe | Age (ans) |
|--------------------|-------|-----------|
| Cas N° :1 | Femme | 57 |
| Cas N° :2 | Homme | 59 |
| Cas N° :3 | Homme | 50 |
| Cas N° :4 | Homme | 68 |
| Cas N° :5 | Homme | 64 |
| Cas N° :6 | Homme | 67 |

Tableau 2 : présentation des cas.

Nous avons choisi d'exposer les résultats des six cas les plus représentatifs avec un pourcentage élevé de la délétion du gène p53 dans la leucémie lymphoïde chronique. Avec une présentation de :

- Données épidémiologiques : âge, sexe, antécédent de cancer familial, origine et profession
- Base diagnostique : hémogramme et score de Matutes
- Stade clinique selon la classification de Binet
- Résultats de la FISH avec une iconographie

III.1.1.2. Résultats des cas

Cas N°1

Femme F.F âgée de 57 ans, originaire de Blida ; frère décédé d'une tumeur cérébrale. Elle est suivie pour LLC depuis le 11/09/2016. Une LLC est évoquée sur une hyperleucocytose faite de lymphocytes au frottis sanguin.

III.1.1.2.1. Résultats d'hémogramme (tableau III)

| GB | Lymphocytes | Hb | Plaquettes | FISH |
|-----------------|-----------------|-----------|------------------|----------------|
| 45380 / μ l | 44800 / μ l | 12.6 g/dl | 135000 / μ l | Délétion (P53) |

Interprétation

Nous observons selon l'hémogramme objective :

- Une hyperleucocytose nette : GB > 10.000/ μ l
- Une hyperlymphocytose majeure : L > 5000/ μ l
- Un taux d'hémoglobine normal
- Une thrombopénie modérée

Score de Matutes : 5/5

Stade Binet : A \rightarrow C

Résultats de la FISH : délétion P 53 = 85%

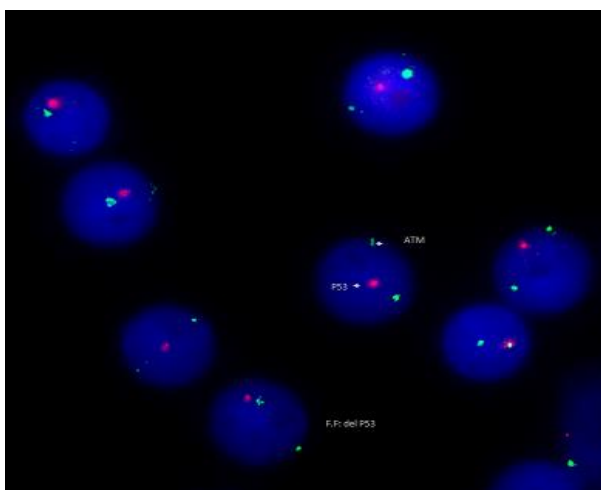


Figure 5: F.F : délétion (P53) sur noyaux

Cas N°2

Homme B.B âgé de 59 ans, originaire de Médéa, soudeur ; Il est suivi depuis le 07/02/2017.

Une LLC est évoquée sur une hyperleucocytose faite de lymphocytes au frottis sanguin.

III.1.1.2.2. Résultats d'hémogramme (tableau 4)

| GB | Lymphocytes | Hb | Plaquettes | FISH |
|-----------------|----------------|-----------|-----------------|----------------------------------|
| 10810 / μ l | 7360 / μ l | 14.8 g/dl | 92000 / μ l | Délétion(P53) +délétion (ATM) |

Interprétation

Nous observons selon l'hémogramme objective :

Une hyperlymphocytose modérée > 5000 μ l et une thrombopénie modérée, (plaquettes < 100000 μ l). Absence d'anémie.

Hb et réticulocytes normaux.

Score de Matutes 4/5

Stade de Binet : C.

Résultat de la FISH : délétion (P53) = 35% et délétion (ATM) = 34%

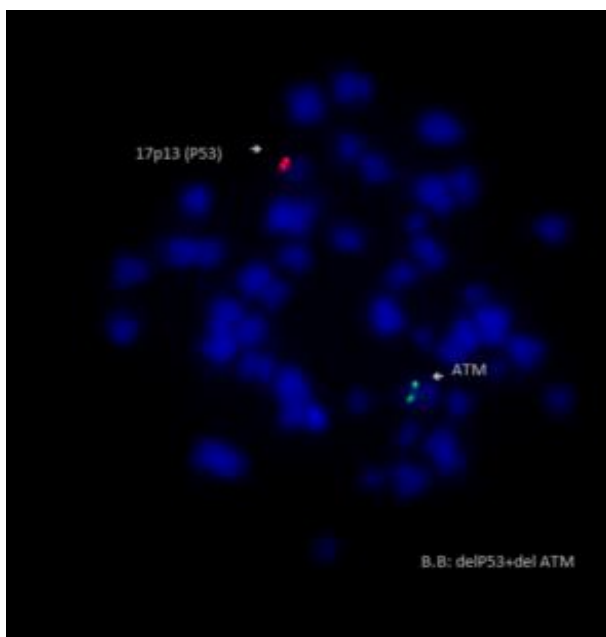


Figure n°6 : FISH : délétion P53 et délétion (ATM) sur mitose

Cas N°3

Patient H.D âgé de 50 ans, originaire de Djelfa, inspecteur du trésor ; Suivi depuis le 03/02/2015. Une LLC est évoquée sur une hyperleucocytose faite de lymphocytes au frottis sanguin.

III.1.1.2.3. Résultats d'hémogramme (tableau 5)

| GB | Lymphocytes | Hb | Plaquettes |
|---------------|---------------|---------|----------------|
| 20660 μ l | 18800 μ l | 15 g/dl | 365000 μ l |

Interprétation

Nous observons selon l'hémogramme objective :

- une hyperleucocytose modérée
- une hyperlymphocytose modérée
- un taux d'Hb normal ; un taux de plaquettes normal

Score de Matutes de 5/5.

Stade de Binet : B

Résultat de la FISH : délétion (P53) = 32%

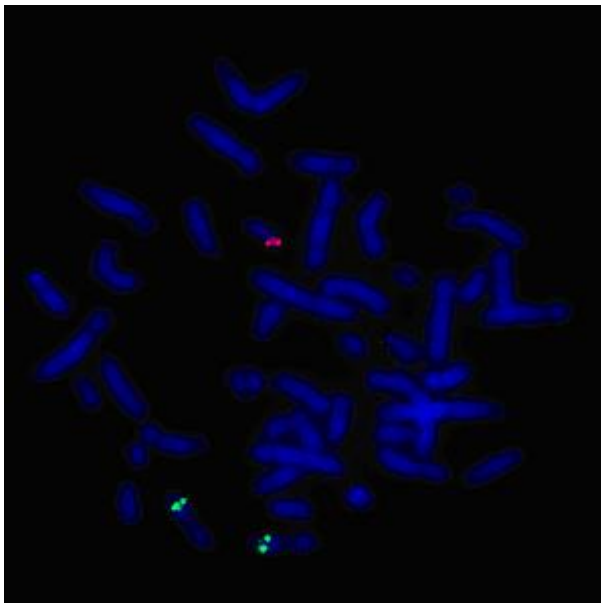


Figure n° 7: FISH : délétion (P53) sur mitose

Cas N°4

Homme L.M âgée de 68 ans, originaire de Blida, commerçant, sœur décédée par une hémopathie maligne. Suivie depuis le 13/03/2017. Une LLC est évoquée sur une hyperleucocytose faite de lymphocytes au frottis sanguin.

III.1.1.2.4. Résultats d'hémogramme (tableau 6)

| GB | Lymphocytes | Hb | Plaquettes |
|-----------------|-----------------|-----------|------------------|
| 48000 / μ l | 30164 / μ l | 15.2 g/dl | 124000 / μ l |

Interprétation

Nous observons selon l'hémogramme objective :

- une hyperleucocytose
- une hyperlymphocytose
- un taux d'Hb normal
- une thrombopénie modérée

Score de Matutes de 4/5.

Stade Binet : B

Résultat de la FISH : délétion (P53) = 74%

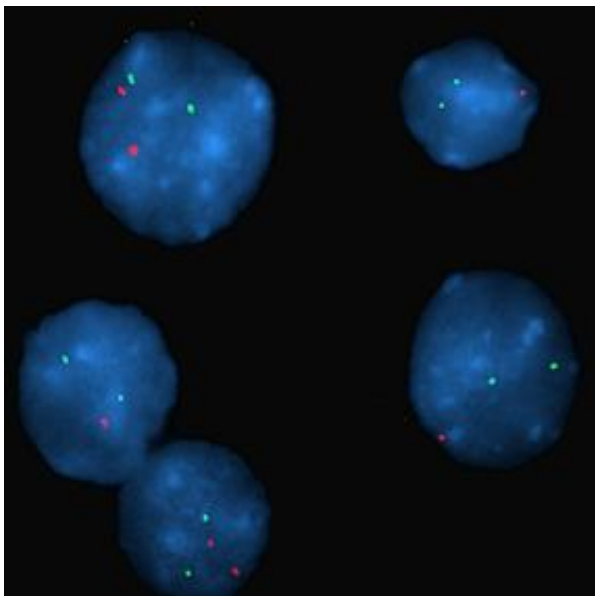


Figure n° 8: FISH : délétion P53 sur noyaux

Cas N°5

Homme M.R âgé de 64 ans, originaire de Blida, agent de Sonatrach, frère suivi pour myélome Suivi depuis le 28/05/2017. Une LLC est évoquée sur une hyperleucocytose faite de lymphocytes au frottis sanguin.

III.1.1.2.5. Résultats d'hémogramme (tableau 7)

| GB | Lymphocytes | Hb | Plaquettes | FISH |
|-----------------|-----------------|---------|------------------|-----------|
| 38060 / μ l | 17000 / μ l | 8.6g/dl | 185000 / μ l | Del (P53) |

Interprétation

L'hémogramme objective :

- Une hyperleucocytose modérée
- Une hyperlymphocytose modérée
- Une anémie modérée
- Un taux de plaquettes normal

Score de Matutes de 5/5.

Stade Binet : C

Résultat de la FISH : délétion (P53) = 48%

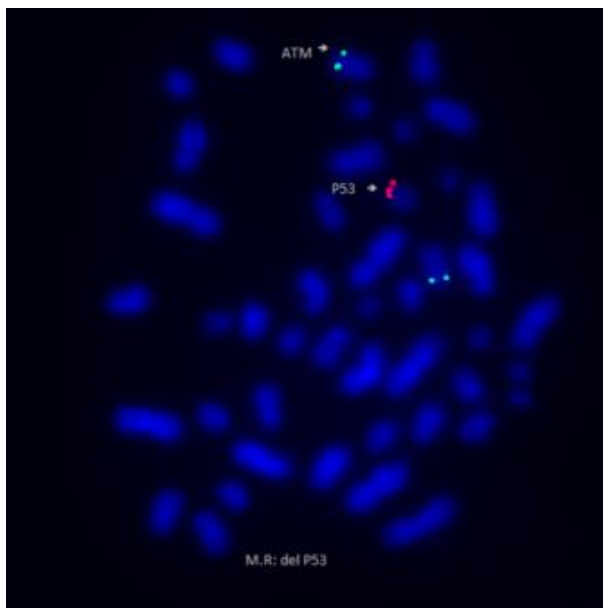


Figure n° 9: FISH : délétion P53 sur mitose

Cas N°6

Homme F.A, âgé de 67 ans, originaire de Blida, directeur d'école, Suivi depuis le 16/05/2017. Une LLC est évoquée sur une hyperleucocytose faite de lymphocytes au frottis sanguin.

III.1.1.2.6. Résultats d'hémogramme (tableau 8)

| GB | Lymphocytes | Hb | Plaquettes |
|-----------------|-----------------|----------|------------------|
| 39710 / μ l | 37320 / μ l | 12.2g/dl | 199000 / μ l |

Interprétation

L'hémogramme objective :

- Une hyperleucocytose modérée
- Une hyperlymphocytose modérée
- Une anémie modérée
- Un taux de plaquettes normal
- HB et Plaquettes normaux

Score de Matutes de 4/5.

Stade Binet : B

Résultat de la FISH : délétion (P53) = 79%

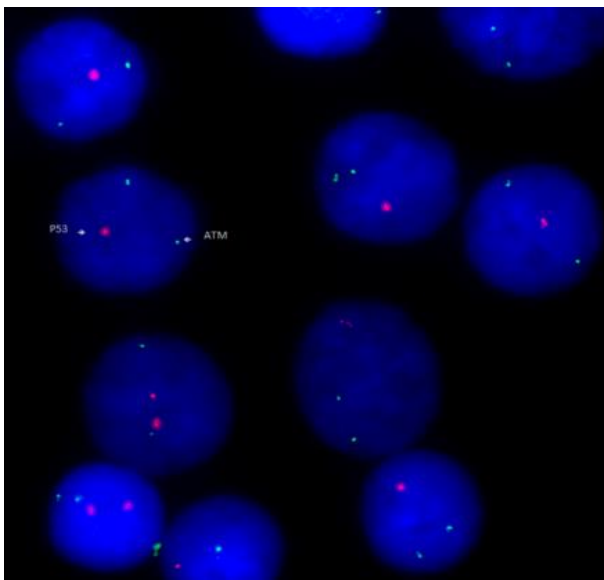


Figure n° 10: délétion P53 su noyaux

III.1.1.3. Commentaires

L'objectif de l'étude que nous avons effectué était de maîtriser cette technologie (FISH).

Partant du fait que les culots cellulaires que nous avons manipulés ont été congelés dès que le diagnostic de délétion(P53) a été posé, il était important de reproduire les mêmes résultats.

Les résultats obtenus se superposent cas par cas à ceux déjà retrouvés sur culot frais. Cela témoigne de la reproductibilité de la méthode FISH, à condition de respecter toutes les procédures requises dans la conservation des culots cellulaires, et dans la procédure de FISH proprement dite.

Dans la littérature, le cut off requis pour retenir une délétion P53 varie selon les études cliniques de 5% à 20% (Döhner et *al.*, 2000 ; Dicker et *al.*, 2009).

Le seuil de plus de 20% paraît plus adapté à la définition de l'impact pronostique de cette anomalie. Dans le cas de notre travail, le taux de délétion de P53 a varié de 32% à 85%, largement supérieur au seuil optimal requis.

Les résultats très satisfaisants obtenus sur la manipulation de culots cellulaires congelés à -20°C sont très encourageants et ouvrent de nouvelles perspectives. En effet disposer de matériel génétique à tout moment permettra entre autres de différer certaines manipulations voire de tester de nouvelles sondes de FISH pour affiner le diagnostic et/ou le pronostic de diverses pathologies.

III.1.2. Etude rétrospective

Pour évaluer la valeur pronostique de la délétion (17p13) dans la LLC , une étude rétrospective des cas index recrutés sur une période de 9 ans (2007-2015) a été réalisée .

Malades

Il s'agit d'une cohorte de 172 patients présentant une LLC de novo confirmée qui ont été traités de façon homogène.

Méthodes

Une fois le diagnostic de certitude affirmé par une étude immunophénotypique, les patients ont bénéficié d'un classement par stades selon la classification de Binet. Un examen cytogénétique par FISH est systématiquement réalisé avant tout traitement : Après un prélèvement sanguin sur héparine lithium, une culture de 72 h avec mitogènes (IL2, DSP30) est réalisée. Une FISH (sondes locus 6q21, 11q22, CEP12, 13 q14q34 et 17p13) a été systématiquement pratiquée au diagnostic. Au minimum, 200 noyaux et 20 mitoses sont analysés.

III.1.2.1. Répartition des patients selon le sexe et l'Age

Dans notre série les 172 patients au moment de diagnostic se répartissent en 42 femmes et 130 hommes, Sexe ratio = 3. L'Age moyen des patients de LLC au moment du diagnostic : 63 ans, varie de (37 – 89).

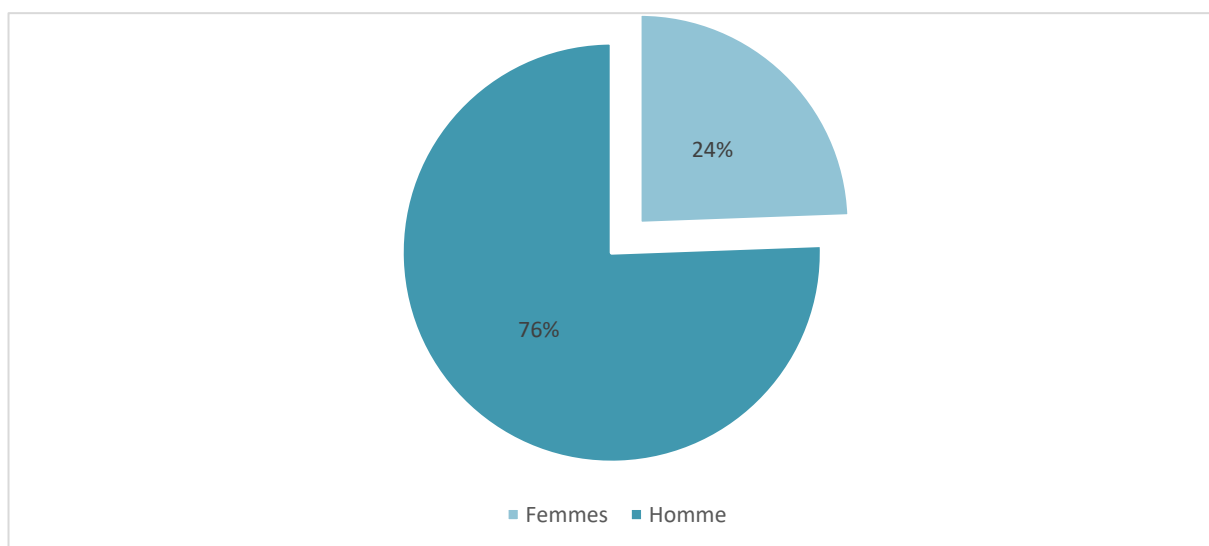


Figure 11 : Secteur représente la répartition des patients atteints de LLC selon le sexe

III.1.2.2. Répartition des patients selon les stades de Binet :

Nous avons effectué une répartition des malades selon le stade de Binet, cette repartitions montre : Stades : A : 45 (26,2%), stade B : 53 (30,8%), stade C : 74 (43%).

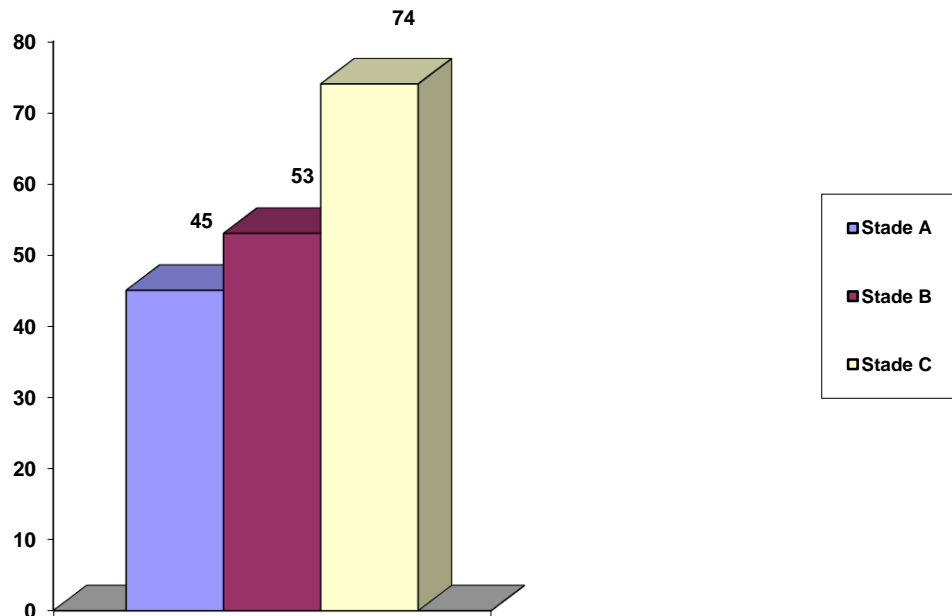


Figure 12 : Histogramme représente la répartition des patients selon les stades de Binet

III.1.2.3. Répartition des patients selon la présence des anomalies cytogénétique (délétion p53)

Les résultats de l'étude cytogénétique de 172 patients obtenu par FISH, représente l'absence d'anomalies cytogénétique chez 30 cas (17,5%) et la présence d'anomalies récurrentes chez 142 patients (82.5%).

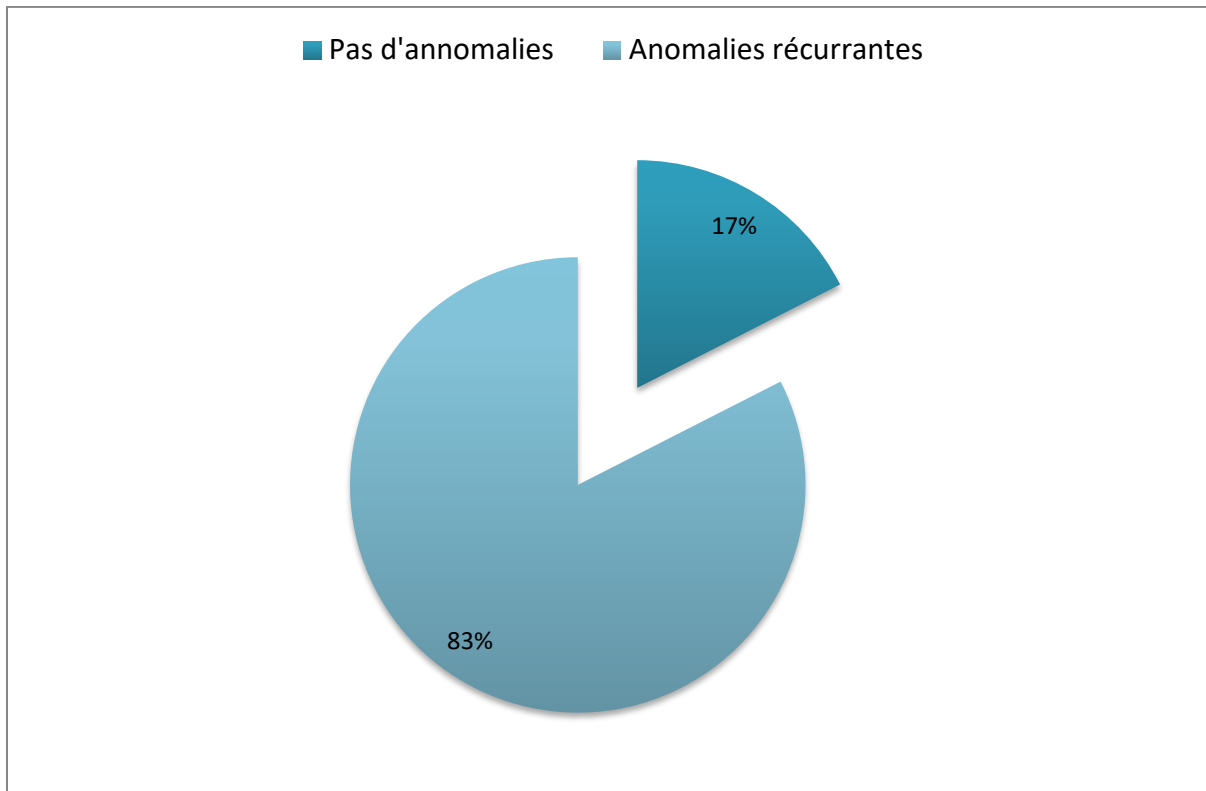


Figure 13 : Secteur représente la répartition des patients selon la présence des anomalies cytogénétique

Parmi les anomalies récurrentes on a la présence de délétion p53 dans 24 cas soit 14%, qui se devise en :

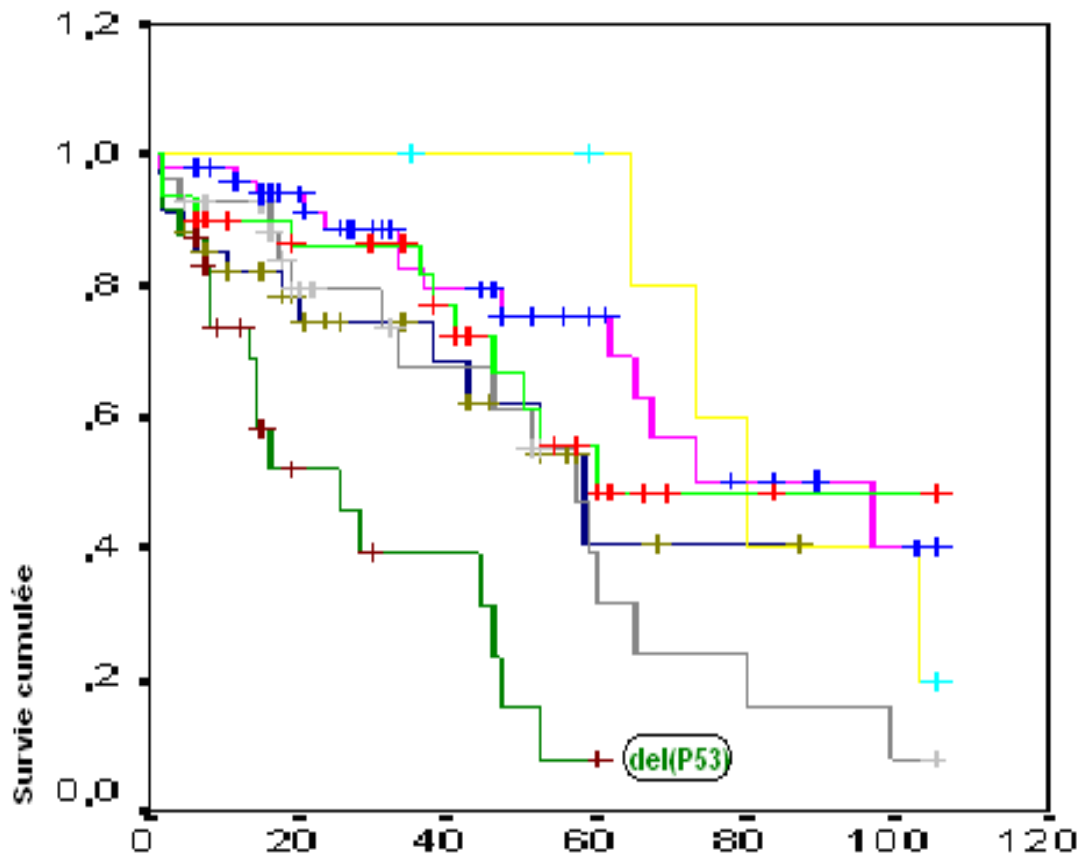
- Délétion (P53) était isolée dans 5 cas soit 20,8% des cas retrouvés
- Délétion (P53) était associée dans 19 cas soit 79,2% des cas retrouvés

III.1.2.4. Survies globales selon l'absence ou la présence d'anomalies cytogénétiques

Les résultats obtenus de notre étude rétrospective concernant la médiane de survie globale (Figure 13) était de :

- 97 mois pour les délétions 13q14 isolées
- 60 mois pour les patients ne présentant aucune anomalie

- 57 mois en cas de délétion ATM
- 58 mois en cas de Tri 12
- 25 mois en cas de délétion P53. ($p < 0,00001$).



Coubes de survie globale selon les anomalies cytogenetiques de 172 LLC

La del(P53) en vert présente la plus mauvaise médiane de survie globale = 25 mois

Figure n° 14 : Courbe de survie globale selon les anomalies cytogénétique

III.1.2. 5 Survie globale selon délétion (P53) versus non délétion (P53)

Nous avons effectué une étude comparative entre la survie globale des patients atteints de LLC délétion p53 et des patients LLC sans délétion p53, on utilise les résultats rétrospectifs.

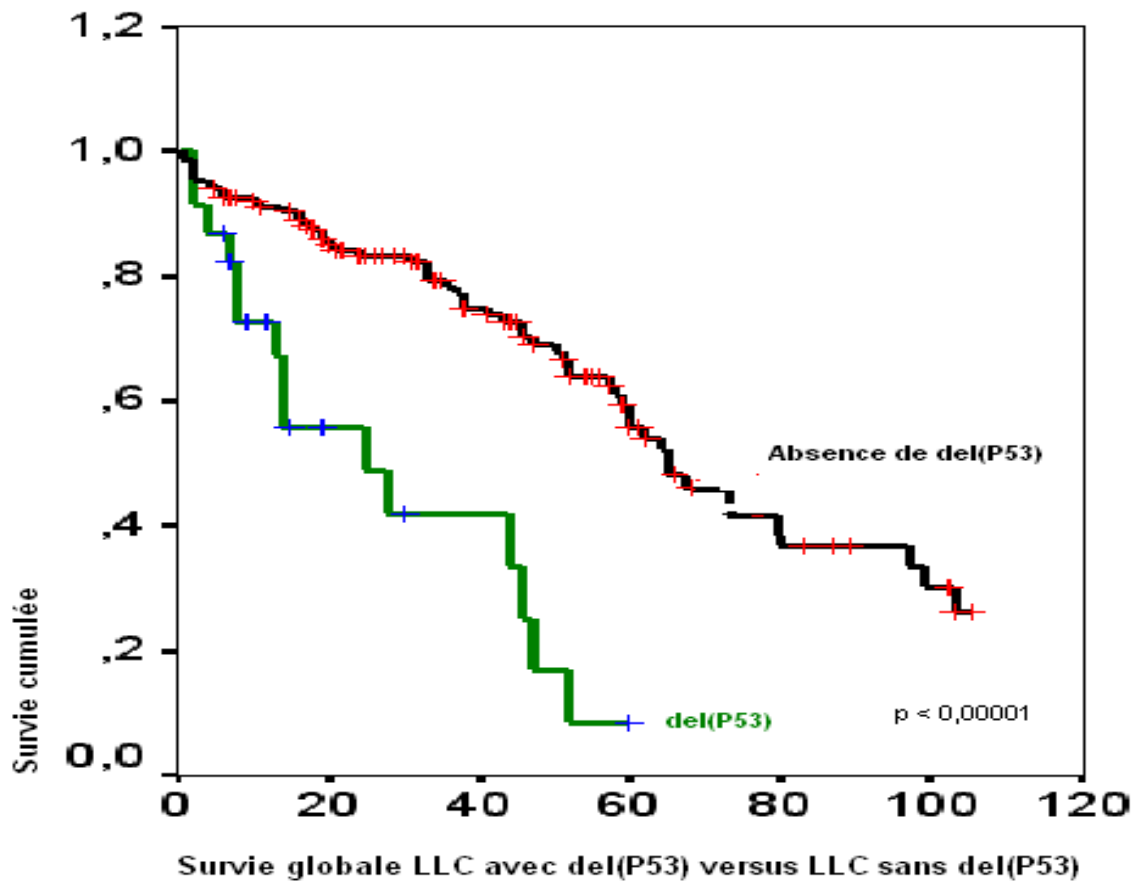


Figure n° 15 : Courbe de survie globale de la délétion (P53) en vert

III.2. Discussion

La fréquence des anomalies récurrentes rejoint celle de l'auteur (82,5% vs > 80%).

La fréquence de la délétion P53 est plus élevée dans cette étude (14 % vs 7%) par rapport à la série historique de Dohner ($p = 0,015$) (Dohner et *al.*, 2000). Cela est certainement lié à la fréquence particulièrement élevée des stades C dans notre série (43%), stades dans lesquels ces délétions sont prédominantes (62,5%) dans cette étude.

Les survies les plus courtes sont retrouvées parmi les patients présentant une délétion P53 courbe en vert sur la (figure 13), une délétion ATM et une trisomie 12. La meilleure survie (courbe en jaune) : (97 mois) est retrouvée en cas de délétion 13q14 isolée.

Lorsqu'on compare la survie des patients porteurs d'une délétion (P53) figure 14 (courbe en vert) versus les patients sans délétion (P53) (courbe en noire), la différence de survie est en faveur des patients sans délétion P53 de manière très significative ($p < 0,00001$).

III.3. Conclusion

La FISH est une méthode sensible, rapide et fiable pour identifier les principales anomalies récurrentes dans la LLC.

Les données de cette étude révèlent la fréquence particulière de la délétion P53, avec une survie globale considérablement raccourcie (médiane = 25 mois) témoignant du très mauvais pronostic de cette anomalie dans la LLC.

CONCLUSION ET PRESPECTIVE

Les objectifs de notre étude pratique étaient :

- 1- De réaliser durant notre pratique une étude cytogénétique par Hybridation In Situ Fluorescente (FISH) centrée sur la délétion 17p dans la LLC.
- 2- De préciser l'impact pronostique de la délétion (17p) dans la LLC en évaluant cela sur une étude rétrospective de cas index.

Au terme de notre stage, l'objectif technique du travail pratique a été atteint par la maîtrise de cette technologie (FISH).

A partir de l'étude cytogénétique de culots cellulaires congelés, nous avons reproduit les résultats attendus. Cela témoigne de la reproductibilité de la méthode FISH, à condition de respecter toutes les procédures requises dans la conservation des culots cellulaires, et dans la procédure de FISH proprement dite.

Parallèlement nous avons apporté une preuve irréfutable de la réalité des délétions initialement trouvées puisque dans ce travail, le taux de délétion de P53 a varié de 32% à 85%, largement supérieur au seuil optimal requis.

La FISH est une méthode sensible, rapide et fiable pour identifier les principales anomalies récurrentes dans la LLC.

De même nous avons montré que les culots cellulaires congelés sont une excellente source pour des compléments de manipulation.

Dans l'étude rétrospective pronostique qui a été menée, il ressort deux arguments importants :

La fréquence des anomalies récurrentes rejoint celle de l'auteur. (82,5% vs > 80%). (Dohner et *al.*,2002)

La fréquence particulière de la délétion P53 dans cette étude (14 % vs 7%) par rapport à la série historique de Dohner ($p = 0,015$) et le caractère particulièrement péjoratif de cette délétion au regard de la survie très courte des patients, comparée à celle des autres anomalies.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Anne-Sophie Michallet, P. S. (s.d.). Leucémie Lymphoïde Chronique. Service hématologie clinique- centre Hospitalier Lyon Sud.
- Appella, E., et Anderson, C. W. (2001). Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *European Journal of Biochemistry*, 268(10), 2764–2772
- Ashkenazi, A. (2008). Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(12), 1001–1012.

B

- Baker, S. J., E. R. Fearon, et al. (1989). "Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas." *Science* 244(4901): 217-221
- Bergman, M.A., Eichhorst, B.F., Busch, R., Adorf, D., Stilgenbauer, S., Eckart, M.J., ... others. (2007). Prospective evaluation of prognostic parameters in early stage chronic lymphocytic leukemia (CLL): result of the CLL1- protocol of the German CLL Study Group (GCLLSG). *Am Soc Hematology*
- Bilous N, Abramenko I, Chumak A et al. Analysis of TP53 Codon72, and p21 Codon31 Polymorphisms in CLL Patients Exposed to Ionizing Radiation Due to the Chernobyl NPP Accident Blood. *ASH Annual Meeting Abstracts 2012*; 120: 4580
- Binet, J. L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguët, H., Goasguen, J., Gremy, F. (1981). A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, 48(1), 198– 206.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Brooks, C. L. and W. Gu (2006). "P53 ubiquitination: Mdm2 and beyond." *Molecular cell* 21(3): 307- 315.
- Bulian P, Rossi D, Forconi F, et al. IGHV gene mutational status and 17p deletion are independent molecular predictors in a comprehensive clinical- biological prognostic model for overall survival prediction in chronic lymphocytic leukemia. *J Transl Med* 2012; 10: 18
- Burger, J.A., Ghia , P., Rosemuvald, .et Caligaris-Cappio, F. (2009) the microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies, *Blood*, 114, 3367-3375.

C

- Carr, S. M., Munro, S., et Thangue, N. B. L. (2012). Lysine methylation and the regulation of p53. *Essays In Biochemistry*, 52, 79–92
- Christine Lefebvre., 2014. Principe et intérêt des examens de cytogénétique en hématologie. *Génétique Oncohématologique*, CHU Grenoble.

D

- Dali, N et al., (2015). Epidemiology and Clinical Features of Chronic Lymphoid Leukemia. Review of the Algerian Chronic Lymphoid Leukemia Study Group. *Blood*, 126(23), 5274
- Damle, R.N., Wasi, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S.L. Others. (1999). IgV Gene mutation status and CD38 Expression as Novel Prognostic Indicators in chronic Lymphocytic Leukemia, Presented in part at the 40 th annual Meeting of the American Society of Hematology, held in Miami Beach, FL, December 4-8, 1998. *Blood*, 94.1840-1847.
- DeLeo, A. B., G. Jay, et al. (1979). "Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse."

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America
76(5): 2420-2424

- Devereux, S., & Cuthill, K. (2017). Chronic lymphocytic leukaemia. *Medicine*, 45(5), 292–296.
- Dicker F, Herholz H, Schnittger S et al. The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia* 2009; 23: 117-24
- Diebold, J., Molina, T., Le Tourneau, A., & Audouin, J. (2008). Hémopathies malignes : définition et différentes variétés selon la classification de l’OMS 2001. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 2008(398), 65–71.
- Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E , Krober A , Bullinger L , et al genomic aberration and survival in chronic lymphocytic leukaemia *N Engl J Med* 2000;343(26):1910-6.
- Dornan, D., Shimizu, H., Burch, L., Smith, A. J., & Hupp, T. R. (2003). The Proline Repeat Domain of p53 binds directly to the Transcriptional Coactivator p300 and Allosterically Controls DNA-Dependent Acetylation of p53. *Molecular and Cellular Biology*, 23(23), 8846–8861
- Doubek M, Mayer J, Obrtlíková P et al. Modern and conventional prognostic markers of chronic lymphocytic leukaemia in the everyday haematological practice. *Eur J Haematol* 2011; 87: 130-7
- Dougé, A., Ravinet, A., Bay, J.-O., Tournilhac, O., Guièze, R., & Lemal, R. (2016). Rationnel et modalités de prescription de l’ibrutinib dans les hémopathies lymphoïdes B. *Bulletin Du Cancer*, 103(2), 127–137. doi:10.1016/j.bulcan.2015.12.003
- Duan, J., & Nilsson, L. (2006). Effect of Zn²⁺ on DNA Recognition and Stability of the p53 DNA-Binding Domain†. *Biochemistry*, 45(24), 7483– 7492.

E

- Eichhorst, B., Robak, T., Montserrat, E., Ghia, P., Hillmen, P., Hallek, M., et Buske, C. (2015). Chronic lymphocytic leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 26(suppl 5), 78–84.
- Étienne-Selloum, N. (2018). Les thérapies ciblées per os. *Actualités Pharmaceutiques*, 57(578), 13–18. doi:10.1016/j.actpha.2018.05.007). Les thérapies ciblées per os. *Actualités Pharmaceutiques*, 57(578), 13–18. doi:10.1016/j.actpha.2018.05.007

F

- Fabbri M, Bottoni A, Shimizu M et al. Association of a microRNA/TP53 feedback circuitry with pathogenesis and outcome of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *JAMA* 2011; 305: 59-67S
- Fabbri, G., et Dalla-Favera, R. (2016). The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia *Nature Reviews Cancer* (16), 145.
- Feng, & Levine, A. J. (2010). The regulation of energy metabolism and the IGF-1/mTOR pathways by the p53 protein. *Trends in Cell Biology*, 20(7), 427–434.
- Fischer K, Cramer P, Busch R et al. Bendamustine combined with rituximab in patients with relapsed and/or refractory chronic lymphocytic leukemia multicenter phase 2 trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol* 2011; 29: 3559-3566

G

- Godeau, B., et Bierling, P. (2012). Thrombopénies. *EMC - Traité de Médecine AKOS*, 7(1), 1–9.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Godin, I., Cumano, A. (2007). Les cellules souches hématopoïétiques. *Médecine/sciences*, 23(8-9), 681–684.
- Grever MR, Lucas DM, Dewald GW, Neuberg DS, Reed JC, Kitada S, et al. Comprehensive assessment of genetic and molecular features predicting outcome in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the US Intergroup Phase III Trial E2997. *J Clin Oncol* 2007;25:799–804.

H

- Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2010; 376: 1164- 1174
- Hallek , M., Cheson , BD, Catovsky , D., Caligaris-Cappio , F., Dighiero , G., Döhner , H., Hillmen , P., Keating , MJ, Montserrat , E., Rai , KR, & Kipps , TJ (2008) . Lignes directrices pour le diagnostic et le traitement de la leucémie lymphoïde chronique: rapport de l'atelier international sur la leucémie lymphoïde chronique mettant à jour les lignes directrices du National Cancer Institute - Working Group 1996. *Blood*, 111 (12) , 5446-5456 . Consulté le 07 juillet 2019
- Hallek, M. et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic
- Hamblin,T.J.,Davis , Z., Gardiner,A., Oscier,D.G., & Stevenson, F.K.(1999).Unmutated IgVH genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia .
- Haute Autorité de Santé. (2011, Juin). Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique Leucémie lymphoïde chronique. **GUIDE – AFFECTION DE LONGUE DURÉE** institut national du cancer.
- Hu, W., Feng, Z., & Levine, A. J. (2012). The Regulation of Multiple p53 Stress Responses is mediated through MDM2. *Genes & Cancer*, 3(3-4), 199– 208.

J

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Jain, N., et O'Brien, S. (2015). Initial treatment of CLL: integrating biology and functional status. *Blood*, 126(4), 463–470. doi:10.1182/blood-2015-04- 585067
- Joerger, A. C., Allen, M. D., & Fersht, A. R. (2003). Crystal Structure of a Superstable Mutant of Human p53 Core Domain. *Journal of Biological Chemistry*, 279(2), 1291–1296
- Johnson GG, Sherrington PD, Carter A et al. A novel type of p53 pathway dysfunction in chronic lymphocytic leukemia resulting from two interacting single nucleotide polymorphisms within the p21 gene. *Cancer Res* 2009; 69: 5210-7

K

- Kharbouch, J. (2016, 05 27). « Les hémopathies malignes: expérience de laboratoire d'hématologie de l'hôpital militaire Avicenne Marrakech » Thèse. Faculté de Médecine et de Pharmacie, Morocco
- Khodabakhshi AH, Morin RD, Fejes AP et al. Recurrent targets of aberrant somatic hypermutation in lymphoma. *Oncotarget* 2012; 3: 1308-19
- Kipps,T,J.,Stevenson,F.K.,Wu,C.J.,Croce,C.M.,Packham,G.,Wierda,W.G.,...Rai,K. (2017).chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Review Disease primers* 3, 13096.
- Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* 2001; 194: 1625–38

L

- Lamaison, C., Cornevin, L., Kergal, A., Toujani, S., Beaumont, M., Lamy-de-la-Chapelle, T., Henry, C. (2016). Comparaison des performances des techniques de cytogénétique conventionnelle (caryotype) et moléculaire (FISH, ACPA) pour l'étude cytogénétique des leucémies lymphoïdes chroniques au diagnostic. *Morphologie*, 100(330), 171–172.
- Lauren Rigollet., 2013. Immunophénotypage : technique et applications en biologie. Eurofins, Focus, département cytologie et immunophénotypage Biomnis.
- leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia

- Linzer, D. I. and A. J. Levine (1979). "Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells." *Cell* 17(1): 43-52.

M

- Maltzman,W. and Czyzyk,L. (1984). UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol. Cell Biol.* 4, 1689-1694
- Meek, D. W. (2015). Regulation of the p53 response and its relationship to cancer. *Biochemical Journal*, 469(3), 325–346.
- May, P., & May, E. (1999). Rôles de P53 dans le cycle cellulaire, l’apoptose et le cancer. *Revue Française Des Laboratoires*, 1999(311), 35–42.
- Migdal, C., & Serres, M. (2011). Espèces réactives de l’oxygène et stress oxydant. *Médecine/sciences*, 27(4), 405–412.
- Moueden, A. M. (2018, 01 17). « stratégie de la mutation P53 dans les leucémies aiguës et chroniques lymphoïdes: du phénotype cytologique et immuno- détection indirecte au génotype moléculaire. » thèse. Faculté de Médecine, Oran.
- Mylène Beri-Dexheimer., 2009. « Recherche de gènes candidats responsables d’anomalies du développement grâce à la caractérisation moléculaire de microremaniement chromosomique. » thèse. Université de Henri Poincar, URF de médecine, école Doctoral Biologie Santé Environnement. 25(168).

N

- Nguyen-Khac F, Borie C, Callet-Bauchu E, Eclache V, Struski S.,2016. Place de la cytogénétique dans la prise en charge de la leucémie lymphoïde chronique : actualisation du Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH). *Ann Biol Clin* 2016; 74(5) : 561-7

O

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Olivier, M., Eeles, R., Hollstein, M., Khan, M. A., Harris, C. C., & Hainaut, P. (2002). The IARC TP53 database: New online mutation analysis and recommendations to users. *Human Mutation*, 19(6), 607–614
- Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ et al. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene is independent prognostic factors. *Blood* 2002; 100: 1177.
- Owen, J. A., Punt, J., & Stranford, S. A. (2013). *Kuby immunology* (pp. 427-444). New York: WH Freeman

P

- Puente XS, Pinyol M, Quesada V et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2011; 475: 101-5.

R

- Redaelli, A., Laskin, B. L., Stephens, J. M., Botteman, M. F., et Pashos, C. L. (2004). The clinical and epidemiological burden of chronic lymphocytic leukemia. *European journal of cancer*, 40, 279-287.
- Rodriguez, M. S., J. M. Desterro, et al. (2000). "Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation." *Molecular and cellular biology* 20(22): 8458-8467.
- Roman, E., et Smith, A. G. (2011). Epidemiology of lymphomas. *Histopathology*, 58(1), 4–14.

S

- Sébahoun G. (2005, Septembre). *Leucémie lymphoïde chronique* (163). Marseille, Faculté de Médecine, France.
- Saha, T., Kar, R. K., & Sa, G. (2015). Structural and sequential context of p53: A review of experimental and theoretical evidence. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 117(2-3), 250–263.
- Sandra Alvares., 2003. « Caractérisation de marqueurs de tumorigénicité et de radiosensibilité par une approche ex vivo. Identification in vivo de marqueurs de radiosensibilité dépendants de p53. » THESE. UNIVERSITE PARIS XI FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD. 35(263).

- Soussi, T. (2000). Cycle cellulaire et apoptose: le gène suppresseur de tumeur p53. *médecine/science*, 469-472.
- Swerdlow, S.H. (2008). WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. *OMS Classification of Tumors*, 22008, 439.
- Swerdlow, S. H., Campo, E., Pileri, S. A., Harris, N. L., Stein, H., Siebert, R. Jaffe, E. S. (2016). The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*, 127(20), 2375–2390.

T

- Thorselius, M. (2006). Strikingly homologous immunoglobulin gene rearrangements and poor outcome in VH3-21-using chronic lymphocytic leukemia patients independent of geographic origin and mutational status. *Blood*, 107(7), 2889–2894.
- Tobin, G., Thumberg, U., Johnson, A., Thorn, I., Soderberg, O., Hultdin, M., ... others. (2002).
- Troussard, X., & Cornet, E. (2009). Leucémie à tricholeucytes : un nouveau regard. *correspondances En Onco-hématologie* 4, 32-38
- Troussard, X. & Cornet, É. Apport des nouvelles petites molécules dans le traitement de la leucémie lymphoïde chronique et place du biologiste dans la surveillance de ces traitements. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 74, 176–183 (2016)

U

- Updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 111, 5446–5456 (2008).

W

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Wendtner,C.M.,Dreger,P.,Gregor,M.,Greil,R.,Knauf,W.,Schetelig,J,...Stilgenbauer,S.(2012). Chronic lymphocytic leukemia.deutsche Medizinische Wochenschrift, 137,1162
- Wierda WG, O'Brien S, Wang X et al. Multivariable model for time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. J Clin Oncol 2011; 29(31): 4088-95

Z

- Zenz T, Kröber A, Scherer K et al. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. Blood 2008; 112: 3322-9
- Zandecki, P. M. (2006, décembre). Leucémie lymphoïde chronique (LLC). Angers, Faculté de Médecine, France.

ANNEXES

ANEXES MATERIELS ET METHODES

Annexe I : Matériels

I.1. Equipement

- Un incubateur à CO₂ pour culture cellulaire
- Une hotte à flux laminaire
- Une hotte chimique pour manipulation de produits toxiques
- Une centrifugeuse
- Un bain marie thermostaté 37°C à 100°C.
- Réfrigérateur à + 4°C.
- Congélateur à -20°C
- Un hygromètre pour la T° et l'humidité de la pièce du laboratoire
- Un microscope équipé d'un système d'acquisition et de traitement d'image avec imprimante
- Des bacs en porcelaine.
- Les plateaux en inox.
- Les haricots, les portes lames, les portoirs des tubes conique 15 ml et 50 ml, minuteurs.
- Micropipettes à différents volumes de 5 microlitres jusqu'à 1000 microlitres.
- Thermobrite : équipement pour dénaturation et hybridation pour FISH.

I.2. Consommables

- Les tubes coniques 15 ml, 50 ml.
- Les embouts
- Les lames et lamelles.
- Les flasques de culture.
- Les Eppendorf.
- Les pipettes pasteur.
- Les seringues et les Compresses.
- Les gants et le désinfectant

I.3. Réactifs

I.3.1. Réactifs pour la culture et la sortie de culture cellulaire (tableau 9)

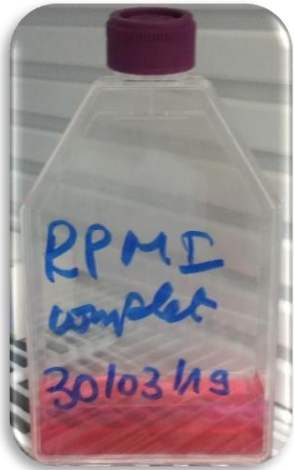
| Réactif | Stockage |
|---------------------------------------|----------|
| RPMI 1640 sans glutamine | +4°C |
| Sérum de veau fœtal | -20°C |
| Pénicilline-streptomycine-L glutamine | -20°C |
| Héparine lithium | TA |
| IL2 | -20°C |
| DSP 30 | -20°C |
| Colcémide (10µg/ml) | +4°C |
| KCL (poudre) | TA |
| Méthanol absolu | TA |
| Ethanol | TA |
| Acide acétique glacial | TA |
| | |

I.3.2. Réactifs pour FISH (tableau 10)

| Réactif | Stockage |
|---------------|----------|
| 20 SSC | TA |
| Tween-20 | TA |
| Ethanol | TA |
| HCL | TA |
| Igépál | TA |
| DAPI | +4C |
| Sonde ATM/P53 | -20C |

I.3.3. Milieux et solution

- Milieu de culture : RPMI complet
A préparer stérilement et à conserver à + 4°C (400ml RPMI + 100ml Sérum de Veau Foetal + 10 ml (L-glutamine + peni-strepto) + 5ml héparine.
 - Colchicine
 - Kcl (5.6 g de Kcl à dissoudre dans 1 litre d'eau distillée)
 - Solution de fixation (1/3 Acide Acétique + 2/3 Méthanol)
- Culture -
sortie de
culture
cellulaire**
-
- Milieu Ethanol (100% : 200 ml Ethanol), 85% : 170 Ethanol + 30ml l'eau distillée ;
70% : 140 Ethanol + 60 ml d'eau distillée.
 - Solution de Buffer 20 SSC (dilution 1%)
 - Solution IGEP 0.1 % (Igéal 1 cc + 20 SSC 100 µl, compléter l'eau distillée à 100 ml)
 - Solution IGEP 0.3 % (Igéal 1.5cc + 20 SSC 100µl, compléter l'eau distillée à 100 ml)
 - Solution Tween (20 SSC 100 ml, compléter l'eau distillée à 1 L + Tween 500 µl.
 - DSP30 (retirer le tube du -20°C, centrifuger le tube dans la centrifugeuse à Eppendorf et ajouter 5 ml d'eau distillée stérile, homogénéiser et aliquoter Par 10 µl et stocker à -20°C
 - IL2 : la préparation peut changer selon le fournisseur : 50000U (25µg) dans 5 ml De PBS stockage à -20°C sous hotte a flux laminaire, aliquoter en tubes de 20 µl et stocker a – 20 °C
- FISH**



RPMI Complet



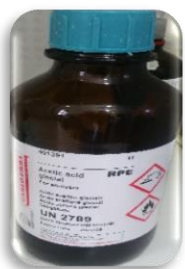
Boite à FISH



Réfrigérateur +4c°



Congélateur -20c°



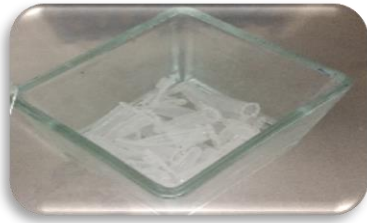
Acide acétique



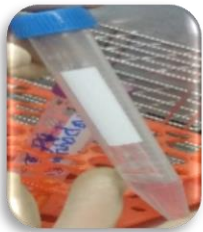
Méthanol



Haute chimique



Eendorffes



Tube conique



Flasque



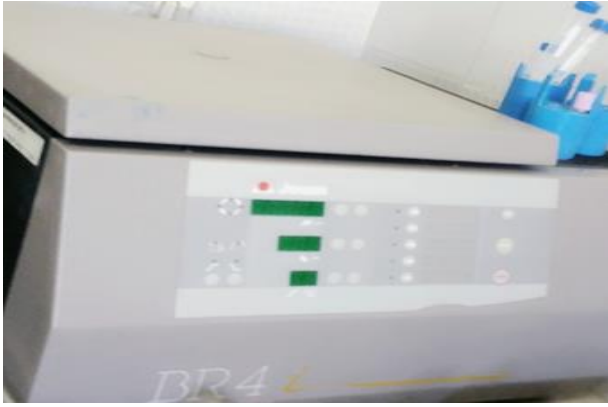
Haute laminaire



Filtre



Micro pipette



La centrifugeuse



Bain Marie



Etuve sèche



KCL



Etuve humide 5 % CO2 37 c°



Sonde ATM /P53



DAPI



Colcémide



Minuteur



Pipette pasteur



Aricaux



Plateau en inox



Solution alcoolique



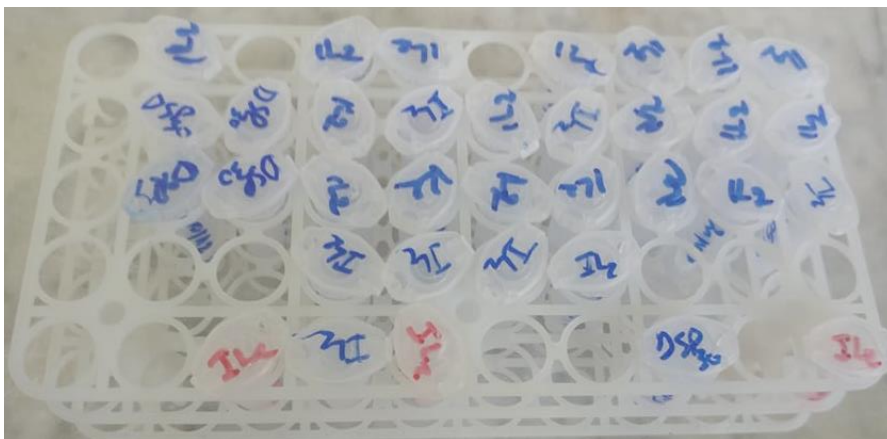
Pince



Porte lame en verre



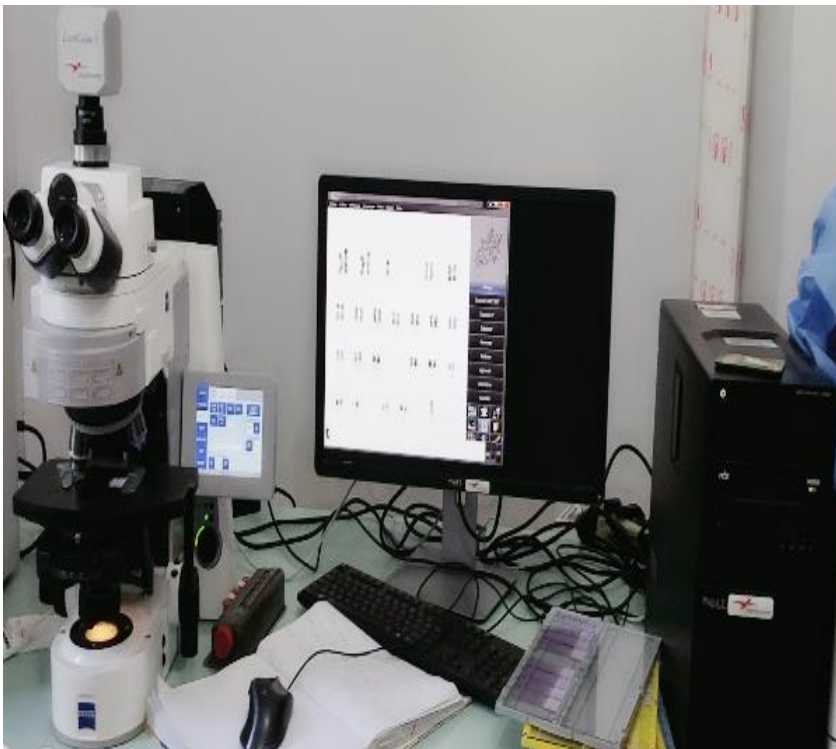
Thermomètre



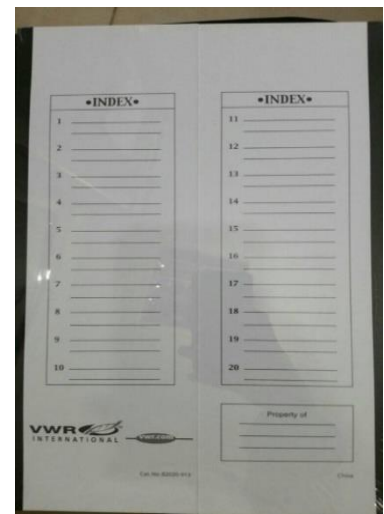
IL2 et DSP30



Thermobrite



Microscope a fluorescence



Boite à FISH