



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Saad Dahleb – Blida – 1

Faculté de médecine

Département de pharmacie



Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Docteur en pharmacie

Intitulé :

Impact des différents transcrits BCR-ABL sur les paramètres de l'hémogramme au diagnostic et sur la réponse moléculaire chez les malades atteints de la leucémie myéloïde chronique

Présenté et soutenu par :

BELATECHE HAKIMA
KOUADRIA NOURHANE

Session Juillet 2023

Jury d'évaluation :

| | |
|-------------------------------------|--|
| Président du jury : Pr BOUCHEDOUB.Y | Professeur en Immunologie Médicale CAC Blida |
| Examineur : Pr BOUCHAKOUR.A | Professeur en Hémobiologie CAC Blida |
| Examineur : Dr AOUMAM.N | Maitre assistante en Hémobiologie CHU Blida |
| Encadreur : Dr HAMEL.H | Maitre assistante en Hémobiologie CHU Blida |

Année universitaire 2022 - 2023

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, nous remercions Dieu, notre créateur de nous avoir donné les forces, la volonté et le courage afin d'accomplir ce travail modeste.

Nous tenons à adresser nos sincères remerciements à notre encadreur Dr HAMEL Hadjer pour ses conseils et son soutien favorable pour l'aboutissement de ce travail.

Nous voulons remercier Pr. BOUCHEDOUB.Y chef service de laboratoire centrale service d'hématologie CAC Blida et à tous le personnel de service de nous avoir aidé pendant la réalisation de cette étude.

Nous voulons également remercier Pr. BOUCHAKOUR pour sa précieuse collaboration, pour ses conseils et disponibilité.

Nos vifs remerciements vont également aux membres du jury Pr. BOUCHEDOUB.Y, Pr. BOUCHAKOUR et Dr AOUAM.N pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de siéger à notre soutenance.

A tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin, par un geste, une parole ou un conseil, je leur dis merci.

Finalement, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à nos familles qui nous ont toujours soutenues et à tout ce qui participe de réaliser ce mémoire.

Dédicace

Je tiens tout d'abord à remercier dieu le tout puissant et miséricordieux, qui m'avoit donné la force, la patience, la volonté et le courage durant ces longues années d'étude.

Avec l'expression de ma reconnaissance, je dédie ce travail à ceux qui, quelque soient les termes embrassées, je m'arriverais jamais à leur exprimer mon amour sincère :

À mes très chers parents,

À Mon Père, l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir.

À la lumière de mes jours, la source de mes efforts, ma vie et mon bonheur, a ma mère que j'adore.

Vous représentez pour moi le symbole de bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'ont pas cessé de m'encourager et de prier pour moi, je vous dédie ce travail.

À mes chères frères **Haithem** , **Amdjed** et **Mourtadha Bel Kacem**, qui m'ont encouragé et soutenu. Je vous souhaite tout le bonheur du monde.

Enfin à tous ceux que j'aime et qui m'aiment.

Nourhane

Dédicace

À mes très chers parents :

À mon Père, L'épaule solide, l'œil attentif compréhensif et la personne la plus digne de mon estime et de mon respect

Aucune dédicace ne saurait exprimer mes sentiments, que Dieu te préserve et te procure santé et longue vie.

À ma Mère, Tu m'as donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir

Je t'offre ce modeste travail pour te remercier pour tes sacrifices et pour l'affection dont tu m'as toujours entouré.

À mes chers frères Ahmed, Mohamed et mes sœurs Iman et Laila :

Qui n'ont pas cessé de m'encourager durant les moments difficiles avec tant d'amour

Je vous souhaite une vie pleine de bonheur, beaucoup de réussite.

Que Dieu vous protège et vous assure une bonne santé et une heureuse vie.

Qu'Allah nous garde à jamais unis dans la joie et la prospérité.

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

Hakima

Liste des figures :

Figure 1 : Les compartiments de l'hématopoïèse.

Figure 2 : Facteurs de croissance hématopoïétiques.

Figure 3 : Formation du chromosome Philadelphie.

Figure 4 : Gène ABL. L'emplacement des deux points de cassure possibles : au niveau de l'intron séparant les exons 1a et 1b ou entre les exons 1a et a2.

Figure 5 : Représentation schématique de la protéine ABL.

Figure 6 : Représentation schématique de la protéine BCR.

Figure 7 : Les différents points de cassures.

Figure 8 : Aspect du frotti sanguin.

Figure 9 : Cytologie médullaire au cours d'une LMC.

Figure 10 : Caryotype d'une personne saine et caryotype d'une personne atteinte.

Figure 11 : Gène de fusion BCR-ABL détecté par FISH.

Figure 12 : Les grandes étapes de l'évolution du traitement de LMC.

Figure 13 : Structure chimique de l'Imatinib.

Figure 14 : Mécanisme d'action de l'Imatinib.

Figure 15 : Schéma récapitulatif des réponses souhaitées.

Figure 16 : Répartition des patients selon la tranche d'âge.

Figure 17 : Répartition des patients en fonction de sexe.

Figure 18 : Répartition des patients selon leur origine.

Figure 19 : Répartition des patients selon les circonstances de découverte.

Figure 20 : Répartition des patients selon la classification pronostique de Sokal.

Figure 21 : Répartition des patients selon les résultats de caryotype et Fish.

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Evolution du taux d'incidence de la LMC en Algérie entre 1994 et 2014

Tableau 2 : Les transcrits de fusions BCR-ABL.

Tableau 3 : Critères définissant les phases : chronique, accélérée et blastique selon l'ELN et l'OMS.

Tableau 4 : les trois groupes à risque selon l'Indice de Sokal.

Tableau 5 : les deux groupes à risque selon l'Indice de EUTOS.

Tableau 6 : les trois groupes à risque selon l'Indice de ELTS.

Tableau 7 : Recommandations pour le traitement de la LMC en phase chronique.

Tableau 8 : Définitions des réponses hématologiques.

Tableau 9 : Définitions de réponse cytogénétique.

Tableau 10 : Définitions de réponse moléculaires.

Tableau 11 : Définition des critères de réponse aux ITK de 1ère ligne de traitement ELN.

Tableau 12 : Définition de la réponse au traitement de 2ème ligne après échec de l'Imatinib ELN.

Tableau 13 : Répartition des patients en fonction du nombre de GB et GR.

Tableau 14 : Répartition des patients selon le taux de plaquettes au moment de diagnostic.

Tableau 15 : Répartition des patients selon le moment de réalisation de la RT-PCR.

Tableau 16 : Répartition des patients selon type de transcrit.

Tableau 17 : Répartition des patients selon les variants de transcriptions.

Tableau 18 : Corrélation des différents types de transcrit avec les paramètres de l'hémogramme pour le 1^{er} groupe (b2a2/ b2a2+b3a2).

Tableau 19 : Corrélation des différents types de transcrit avec les paramètres de l'hémogramme pour le 2ème groupe (b2a2/ b2a2+e1a2).

Tableau 20 : Corrélation entre le type de transcrit et le nombre de GB pour 1^{er} groupe.

Tableau 21 : Corrélation entre le type de transcrit et le nombre de GB pour 2^{ème} groupe.

Tableau 22: Corrélation entre le type de transcrit et le taux des plaquettes pour 1^{er} groupe.

Tableau 23: Corrélation entre le type de transcrit et le taux des plaquettes pour le 2ème groupe.

Tableau 24 : Corrélation entre le type de transcrit et la réponse au traitement pour 1^{er} groupe.

Tableau 25 : Corrélation entre le type de transcrit et la réponse au traitement pour 2^{ème} groupe.

Liste des abréviations :

ABCB1: ATP Binding Cassette sous-famille B1

ABCG2: ATP Binding Cassette sous-famille G2

Abl: gène d'Abelson

ACA : Anomalies Chromosomiques Additionnelles

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

ATK : Activité Tyrosine Kinase

ATP : Adénosine Triphosphate

BCR: Breakpoint Cluster Region.

BCR-ABL : chromosome chimérique, oncogène de fusion

BFU: Burst-Forming Unit

BFU-E: Burst Forming Unit Erythroid

CD: Cluster of differentiation

CFU: Colony Forming Unit

CFU: Colony Forming Unit

CFU-L: colony-forming unit – lymphoid

Ch-ph: chromosome Philadelphie.

C-Kit: v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog cyclo-oxygénase-2

CML: Chronic Myeloid Leukemia

Crkl: Sarcoma virus CT10 oncogene homolog-like

CS : cellules souches

CSH : cellules souches hématopoïétiques

Ct : Cycle threshold

EDF: Eosinophil-Differentiating Factor

Eléts/mm³ : Eléments/mm³

ELN : European Leukemia Net recommendations

EPO: érythropoïétine

F : Femme

FISH : fluorescence in situ hybridation.

GB : Globule Blanc

G-CSF: Granocyte-Colony Stimulating Factor

GFU-GEMM : colony forming unit – granuleuse, érythrocytaire, macrophage et mégacaryocytaire.

GM-CSF: Granocyte Monocyte- Colony Stimulating Factor

GP: Glycoprotéine

GR : Globule Rouge

Grb2: Growth-factor-receptor-bound 2

GTP : Guanosine Triphosphate

H : Homme

Hb : Hémoglobine

HLA : Human leucocyte Antigen

HLA : Human leukocyte antigens

HOCT: Human Organic Cation Transporter

HSC: hematopoietic stem cell

IL : Interleukine

INF: Interferon

INF- α : Interferon alpha.

IS: International Scale

ITK : Inhibiteur de la Tyrosine Kinase.

Kb : Kilobascal.

KDa : Kilo Daltons

LA : Leucémie Aigue

LAM : leucémie aigüe myéloïde

LMC: Leucémie Myéloïde Chronique.

LMC-PA : Phase Accélérée

LMC-PB : Phase Blastique

LMC-PC : Phase Chronique

m-BCR : minor BCR.

M-BCR: major Breakpoint Cluster Region

MFP : Myélo Fibrose Primaire

MO: Moelle Osseuse

NCCN: National Comprehensive Cancer Network

NFS : Numération Formule Sanguine.

NGS: Next Generation Sequencing

NK : Natural Killer

OMS : Organisation Mondiale de Santé.

PAL : Phosphatase Alcaline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDGFR: Platlet-Driven Growth Factor Receptor

Ph-: Philadelphie négatif.

Ph+: Philadelphie positif.

Pqt : Plaquette

PV : polyglobulie de vaquez

RCyC : Réponse Cytogénétique Complète

RCyM : Réponse Cytogénétique Majeur

RCyP : Réponse Cytogénétique Partielle

RHC : Réponse Hématologique Complète

RMC : Réponse Moléculaire Complète.

RMM : Réponse Moléculaire Majeure.

RT-PCR: Real Time Polymerase Chain Reaction

RTQ-PCR: Real Time Quantification Polymerase Chain Reaction

SCF: stem cell factor

SH : src-homology domain

SMP : syndrome myélo-prolifératif

SPM : Splénomégalie.

TE : Thrombocytémie Essentielle

TGF α : Transforming Growth Factor α

TK : Tyrosine Kinase.

TNF α : Tumor Necrosis Factor α

TNF β : Tumor Necrosis Factor β

TPO: Thrombopoietine

μ BCR-ABL : Micro BCR-ABL

SOMMAIRE

PREMIERE PARTIE : Synthèse bibliographique

| | |
|---|-----------|
| Introduction | 1 |
| Historique | 2 |
| I. Chapitre : Rappel Sur l'hématopoïèse | 3 |
| I.1. Définition | 4 |
| I.2. Siègne de l'hématopoïèse | 4 |
| I.3. Les compartiments de l'hématopoïèse | 5 |
| I.3.1. Les cellules souches primitives | 5 |
| I.3.2. Les progéniteurs | 5 |
| I.3.3. Les précurseurs | 6 |
| I.3.4. La maturation | 6 |
| I.3.4.1 Les cellules matures | 7 |
| I.4. La régulation | 7 |
| I.4.1. Le microenvironnement ou stroma médullaire | 8 |
| I.4.2. Les vitamines et oligoéléments | 8 |
| I.4.3. Les facteurs de croissance (FCH) | 8 |
| I.4.3.1. Les facteurs de promotion | 8 |
| I.4.3.2. Les facteurs multipotents | 8 |
| I.4.3.3. Les facteurs restreints | 8 |
| I.5. La régulation négative : | 9 |
| I.6. Les hémopathies | 10 |
| I.6.1. Les Hémopathies malignes | 10 |
| I.6.1.1. Hémopathies myéloïdes | 10 |
| I.6.1.1.1. Les syndromes myéloprolifératifs chroniques | 10 |
| I.6.1.1.2. Les syndromes myélodysplasiques | 10 |
| I.6.1.1.3. Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) | 11 |
| I.6.1.2. Les lymphomes | 11 |
| I.6.1.2.1. Les lymphomes non-hodgkiniens | 11 |
| I.6.1.2.2. Le lymphome de Hodgkin | 11 |
| I.6.1.3. Les néoplasies histiocytaires et des cellules dendritiques | 11 |

| | |
|--|-----------|
| I .6.1.4. Les mastocytoses | 11 |
| II. Chapitre : présentation de la leucémie myéloïde chronique | 12 |
| II.1. Définition | 13 |
| II.2. Epidémiologie | 13 |
| II.3. étiologie | 14 |
| II.4. Physiopathologie | 14 |
| II.4.1. Chromosome Philadelphie | 14 |
| II.4.2. Le gène ABL et sa protéine | 15 |
| II.4.3. Le gène BCR et sa protéine | 16 |
| II.4.4. Gène BCR-ABL et protéine de fusion | 17 |
| II.4.5. Leucémogénèse | 18 |
| II.4.6. Instabilité génétique | 19 |
| II.5. Diagnostic | 19 |
| II .5.1. Circonstances de découverte | 19 |
| II.5.2. Diagnostic biologique | 20 |
| II .5.2.1. Hémogramme : FNS + Frottis sanguin | 20 |
| II.5.2.2. Myélogramme | 20 |
| II.5.3. Diagnostic cytogénétique | 21 |
| II.5.3.1. La cytogénétique conventionnelle : le caryotype | 21 |
| II.5.3.2. La cytogénétique moléculaire : FISH | 22 |
| II. 5.4. Diagnostic moléculaire | 23 |
| II .5.4.1. La reverse transcriptase polymérase Chain réaction (RT-PCR) | 23 |
| II.5.4.2. NGS | 24 |
| II.6. Evolution | 24 |
| II.6.1. Phase chronique (LMC-PC) | 24 |
| II.6.2. Phase accélérée (LMC-PA) | 25 |
| II.6.3. Phase d'acutisation ou crise blastique (LMC-PB) | 25 |
| II.7.Les facteurs pronostics | 26 |
| II.7.1. Score de Sokal | 26 |
| II.7.2. Score EUTOS: (European treatment and Outcome Study for CML) | 27 |
| II.7.3. Score ELTS | 27 |
| II.8.La Prise en charge | 27 |
| II.8.1. Traitement de la LMC | 27 |
| II.8.1.1. Avant l'ère de la thérapeutique ciblée | 28 |

| | |
|---|-----------|
| II.8.1.2. Traitement de la leucémie myéloïde chronique à l'ère de la thérapeutique ciblée | 29 |
| II.8.1.2.1. ITK de première génération (ITK1) | 29 |
| II.8.1.2.1.1. Imatinib Mesylate ou GLivec® | 29 |
| II.8.1.2.2. ITK de deuxième génération (ITK2) | 30 |
| II.8.1.2.2. 1. Dasatinib (Sprycel®) | 30 |
| II.8.1.2.2. 2. Nilotinib (Tasigna®) | 30 |
| II.8.1.2.2. 3. Autre ITK | 30 |
| II.8.1.2.3. ITK de troisième génération | 30 |
| II.8.1.2.3.1. Le Ponatinib (Iclusig®) | 30 |
| II.9. Stratégie Thérapeutique | 31 |
| II.10. Réponses au traitement par les inhibiteurs de la tyrosine kinase | 34 |
| II.10.1. Objectifs thérapeutiques | 34 |
| II.10.2. Critères de réponse | 35 |
| II.10.2.1. Réponse hématologique complète (RHC) | 35 |
| II.10.2.2. Réponse cytogénétique complète (RCyC) | 35 |
| II.10.2.3. Réponse moléculaire | 35 |
| II.10.3. Types de réponses au traitement par les inhibiteurs de tyrosine kinase | 36 |
| II.11. Suivi des patients traités par les ITK | 37 |
| II.11.1. Suivi clinique | 37 |
| II.11.2. Suivi biologique | 37 |
| II.11.3. Suivi moléculaire | 38 |
| II.11.3.1. La RQ-PCR | 38 |
| II.11.3.2. La RT-PCR digitale | 38 |
| II.11.3.3. Détection des mutations par le séquençage de nouvelle génération NGS | 38 |
| II.12. La rémission | 38 |
| II.13. La résistance aux ITK | 39 |

DEUXIEME PARTIE : PRATIQUE

| | |
|-------------------------------|-----------|
| I. Matériel et méthode | 42 |
| I.1. Les patients | 42 |
| I.2. Matériel | 42 |

| | |
|--|-----------|
| I.2.1. Les automates | 42 |
| I.3. Méthode | 43 |
| I.3.1. Récolte de l'échantillon | 43 |
| I.3.2. Traitement des échantillons | 43 |
| I.3.3. Collecte des données | 44 |
| I.3.4. Répartition de la population | 45 |
| I.3.5. traitement statistique des résultats | 45 |
| II. Résultats | 47 |
| II.1. Description de la population | 47 |
| II.1.1. Répartition des patients en fonction de l'âge | 47 |
| II.1.2. Répartition des patients en fonction de sexe | 47 |
| II.1.3. Origine | 48 |
| II.2. Résultats clinico-biologiques au moment de diagnostic | 48 |
| II.2.1. Circonstances de découverte | 48 |
| II.2.2. Les antécédent médicaux | 49 |
| II.2.4. Hémogramme au moment de diagnostic | 49 |
| II.2.4.1. FNS | 49 |
| II.2.4.2. Frotti sanguin | 50 |
| II.2.5. Score pronostique | 51 |
| II.2.6. Résultats de la cytogénétique | 51 |
| II.2.6.1. Fish / caryotype | 51 |
| II.2.7. Résultats de la biologie moléculaire | 52 |
| II.2.7.1. RT-PCR | 52 |
| II.2.7.1.1. Type de transcrit | 52 |
| II.2.7.1.2. les variants de transcriptions | 53 |
| II.3. Corrélation des différents types de transcrit avec les paramètres de l'hémogramme au moment de diagnostic | 53 |
| II.4. Traitement | 56 |
| II.4.1. Traitement ciblé | 56 |
| II.4.2. Arrêt du traitement | 57 |
| II.5. Corrélation des paramètres de l'hémogramme avec les différents types de transcrit après traitement | 57 |

| | |
|---|-----------|
| II.6. Corrélation de la réponse à l’Imatinib avec les différents types de transcrit après traitements. | 61 |
| II.6.1. Les réponse de 3 mois | 61 |
| II.6.2. Les réponse de 6 mois | 61 |
| III.DISCUSSION : | 63 |
| Conclusion et recommandations | 70 |
| Résumé | 72 |
| Références bibliographiques | 78 |
| Annexes | 85 |

PREMIERE PARTIE :
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction :

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une hémopathie maligne du groupe des syndromes myéloprolifératifs (SMP).

Sur le plan cytogénétique, elle est caractérisée par une anomalie chromosomique acquise touchant les cellules hématopoïétiques dénommée chromosome Philadelphie, résultant de la translocation réciproque et équilibrée sans perte du matériel génétique entre les bras longs des chromosomes 9 et 22 t (9;22) (q34 ; q11). La conséquence de cette translocation est la formation d'un gène de fusion chimérique BCR-ABL, qui code pour une protéine chimérique. Cette dernière possède une forte activité enzymatique constitutive de type tyrosine kinase.

En Algérie, la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) occupe la 5ème place des cancers les plus répandus. Le taux d'incidence de cette pathologie a, malheureusement, progressé pour passer de 0,19 cas / 100 000 habitants en 1994 à 0,48 cas / 100 000 habitants en 2014.

Le mode lent de développement de la maladie fait qu'elle s'installe de façon insidieuse. Le plus souvent le diagnostic est porté de manière fortuite à l'occasion d'une numération formule sanguine (NFS) de routine. Ce qui peut conduire à la progression vers des phases avancées de la maladie et la nécessité de la greffe allogénique des CSH.

Aujourd'hui, grâce à l'introduction de nouvelles thérapies dites « ciblées » représentées par les inhibiteurs de tyrosine Kinases (ITK), les données de survie montrent que les espérances de vie des patients atteints de leucémie myéloïde chronique répondant bien au traitement, peuvent même rejoindre celles des non malades.

Notre travail a pour objectif de décrire les différents types de transcrits observés chez les patients atteints de l' LMC et leurs influences sur les principaux paramètres de l'hémogramme lors du diagnostic de la maladie et sur la réponse moléculaire après traitement par les ITKs.

Historique :

Au XIX^{ème}, la maladie « leucémie » a été décrite pour la première fois. En 1845, la LMC ou leucémie myélogène fut caractérisée par Bennett chez deux patients présentant une rate énorme avec un sang épais et d'aspect laiteux dû à un excès de leucocytes, il proposa le nom de leucocytémie (1). Le nom de leucémie a été proposé par la suite par Virchow à une série de cas identiques et différenciés deux types de leucémie ; l'une dite splénique avec grosse rate et globules blancs de grande taille, l'autre dite lymphatique avec polyadénomégalie et petits globules blancs (2). En 1951, William Dameshek, décrit quatre pathologies différentes ayant presque les mêmes caractéristiques clinico-biologiques et les regroupe dans un même syndrome, le syndrome myélo-prolifératif (SMP), il s'agit de polyglobulie de Vaquez (PV), la Myélo Fibrose Primaire (MFP), la Thrombocytémie Essentielle (TE) et la LMC (3).

Ce n'est qu'en 1960 que la compréhension de la pathogénèse de la maladie débute, à travers l'observation des cellules en division par Peter C. Nowell et David Hungerford qui a permis de faire la relation entre la maladie et la présence d'une anomalie non constitutionnelle récurrente du caryotype en mettant en évidence un chromosome anormalement petit nommé le Ch-Ph en l'honneur de leur ville de résidence (4).

En 1973, le Ch-Ph a été caractérisé par Janet Rowley. Il s'agissait d'un chromosome 22 raccourci (22q-), le résultat d'un échange réciproque de fragment entre les bras longs de chromosome 9 et 22 : C'est la translocation $t(9; 22)(q34; q11)$. Le Ch-Ph1 a été la première anomalie chromosomique découverte dans les affections malignes (5).

Le développement de la biologie moléculaire a permis au Bartran et Groffen d'identifier les gènes responsables de cette translocation qui sont le gène ABL (décrit par Abelson pour son rôle dans les leucémies chez la souris), situé sur le bras long du chromosome 9 et le gène BCR (Break Point Cluster Région) qui représente la zone de cassure sur le chromosome 22(6,7). Dès 1984, il a été démontré qu'une activité tyrosine kinase dérégulée était à l'origine de l'anomalie moléculaire chez les patients atteints de LMC (8). En 1996, l'Imatinib a été décrit comme un inhibiteur de la croissance de cellules transformées par l'oncogène BCR-ABL (9), ensuite l'approche thérapeutique de la LMC a été révolutionnée grâce à la compréhension moléculaire de la pathogénèse qui permet au Drucker et al en inhibant l'ATK d'ABL, de cibler pharmacologiquement la protéine BCR-ABL (10).

Chapitre I

Rappel sur l'hématopoïèse

I.1. Définition :

L'hématopoïèse constitue l'ensemble des phénomènes physiologiques qui concourent à la fabrication et au remplacement continu et régulé des cellules sanguines ayant une durée de vie limitée : de quelques heures à quelques jours pour les globules blancs, jusqu'à environ 10 jours pour les plaquettes, et environ 120 jours pour les globules rouges.

Le corps humain contrôle selon ses besoins la vitesse de production des cellules du sang.

Le mode de fabrication est homogène, il faut toutefois distinguer les éléments myéloïdes des éléments lymphoïdes.

L'hématopoïèse assure une production quantitativement importante à raison de 10^{13} cellules sanguines par jour (2 millions d'hématies par seconde) pour pouvoir compenser la durée de vie des cellules sanguines. Cette activité considérable de production est assurée par une petite population de cellules de la moelle osseuse : les cellules souches hématopoïétiques (CSH) (11, 12,13).

I.2. Sièges de l'hématopoïèse :

Le siège de l'hématopoïèse varie au cours de la vie :

- ❖ Développement embryonnaire et fœtal On distingue trois périodes :
 - La période mésoblastique : Les premiers îlots Wolf et Pander sont visibles dès le 19ème jour de gestation par différenciation de cellules mésoblastiques en Hémangioblastes. Ceux-ci seront à l'origine à la fois du système hématopoïétique et du système vasculaires. Cette activité hématopoïétique sera de courte durée, elle s'arrêtera environ à la 9ème semaine.
 - La période hépatique et splénique : Elle prend le relais à la 5ème semaine, lorsque le tissu hématopoïétique primitif colonise l'ébauche hépatique. Le foie est l'organe hématopoïétique quasi exclusif jusqu'au 5ème mois. Lors de cette période, la rate participe également à l'hématopoïèse. Son activité se limite à quelques semaines entre le 4ème et le 6ème mois de vie intra-utérine. En pathologie, la rate peut reprendre son activité hématopoïétique, générant des cellules myéloïdes.
 - La période médullaire : Elle devient active environ à la 20ème semaine. Elle assure progressivement toutes les fonctions, pour être, à partir du 6ème mois, l'organe majoritaire. L'hématopoïèse hépatique va voir son activité diminuer progressivement, pour disparaître avant la naissance.
- ❖ Après la naissance l'hématopoïèse normale est localisée exclusivement dans la moelle osseuse.

- ❖ Jusque l'âge de 5 ans tous les os ont une activité hématopoïétique, ensuite cette activité va progressivement se limiter au niveau des os courts et plats (sternum, côtes, vertèbres, os iliaques).

En situations pathologiques il peut exister une hématopoïèse extra-médullaire qui se traduit alors par une augmentation de la taille de l'organe qui en est le siège (14).

I.3. Les compartiments de l'hématopoïèse :

L'hématopoïèse s'appuie sur quatre compartiments fonctionnels différents :

- Les cellules souches primitives.
- Les progéniteurs.
- Les précurseurs.
- La maturation

I.3.1. Les cellules souches primitives :

Toutes les cellules sanguines sont produites à partir d'une même cellule indifférenciée dite cellule souche primitive ou cellule souche totipotente

Ces cellules possèdent deux propriétés essentielles sont en équilibre :

- la capacité d'auto renouvellement, multiplication sans différenciation permettant de maintenir intact un pool de cellules souches primitives et donc le potentiel de l'hématopoïèse.
- la capacité de différenciation, possibilité de division avec engagement irréversible vers une ou plusieurs lignées sous l'influence des facteurs de croissance. A ce stade, le passage vers la cellule souche engagée entraîne une perte de la totipotence.

Ces cellules ne sont pas identifiables morphologiquement. Cependant, elles présentent certains marqueurs immunologiques :

- Marqueurs positifs : CD 34+, Ckit+, Rhodamine (Rho) +, Thy1+
- Marqueurs négatifs : HLA-DR- (HLA de Classe II), CD38-, CD 33-(11, 12,13).

I.3.2. Les progéniteurs :

Sous l'influence des facteurs stimulants, une cellule souche totipotente va s'engager dans la différenciation d'une lignée cellulaire. Elle devient alors un progéniteur ou cellule souche différenciée ou " engagée ". Figure 1.

Les deux grandes voies de différenciation :

- La cellule souche lymphoïde (progéniteur commun lymphoïde - CFU-L) : exerce une potentialité de différenciation vers les trois principaux types de lymphocytes : Les lymphocytes T, lymphocytes B/plasmocytes et les lymphocytes NK (Natural killer, ou grands lymphocytes granuleux).

- La cellule souche myéloïde (progéniteur commun myéloïde - GFU-GEMM) : exerce une potentialité de différenciation vers les lignées myéloïdes granuleuse, érythrocytaire, monocyttaire et mégacaryocytaire.

A ce stade, les progéniteurs perdent progressivement leur capacité d'auto renouvellement mais ils sont encore peu nombreux et non identifiables morphologiquement. Ils acquièrent tout de même les marqueurs immunologiques CD 33+ et HLA-DR+ en plus du CD34+.

Chaque progéniteur, dont le nom est fait de CFU (Colony Forming Unit) suivi de(s) lettre(s) caractérisant les lignées, garde le potentiel de 5 différenciations. Il va poursuivre son programme de différenciation et donner naissance à des progéniteurs encore plus engagés (11, 12).

I.3.3. Les précurseurs :

C'est un compartiment de division et de maturation qui apparaît après plusieurs divisions des progéniteurs avec une potentialisation de différenciation de plus en plus limitée. A ce stade, les précurseurs sont spécifiques d'une seule lignée et sont morphologiquement identifiables par des examens complémentaires comme le médullogramme et la biopsie ostéomédullaire. Ils ont perdu toute capacité d'auto renouvellement (11).

Les précurseurs les plus immatures sont :

- les myéloblastes, précurseurs des polynucléaires.
- les proérythroblastes, précurseurs des hématies.
- les monoblastes, précurseurs des monocytes.
- les lymphoblastes, précurseurs des lymphocytes.
- les mégacaryoblastes, précurseurs des plaquettes.

I.3.4. La maturation :

Les modifications morphologiques communes et générales liées à la maturation sont représentées par :

- La diminution de la taille cellulaire.
- La diminution du rapport nucléo cytoplasmique.
- La disparition des nucléoles.
- La condensation de la chromatine.

Mais, la maturation de chaque lignée induit également des modifications spécifiques, comme au niveau du noyau (polylobulation dans la lignée granuleuse), du cytoplasme (granulations spécifiques de la lignée granuleuse), de la membrane (apparition de protéines membranaires spécifiques reconnaissables par des anticorps monoclonaux) (11).

I.3.4.1 Les cellules matures :

L'ensemble de l'hématopoïèse a lieu dans la moelle osseuse et, dans les conditions physiologiques, seules les cellules terminales, matures et fonctionnelles vont passer dans le sang : polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles, hématies, plaquettes, lymphocytes et monocytes. Seules, les lymphocytes et les monocytes auront de nouvelles différenciations après leur séjour sanguin (11). Figure 1

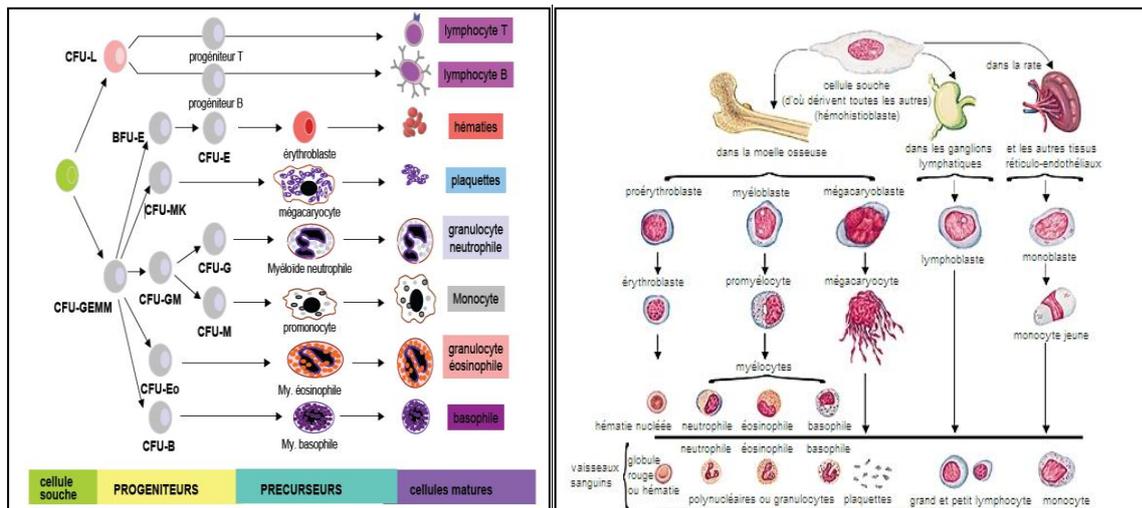


Figure 1 : Les compartiments de l'hématopoïèse

CFU-L: Colony Forming Unit – Lymphoid. CFU-GEMM: Colony Forming Unit - Granulo-Erythro-Mono-Megakaryocyte. CFU-Eo (éosinophiles) et CFU-Baso (basophiles). BFU-E : Burst Forming Unit – Erythroid (les plus immatures) . CFU-E: Colony Forming Unit –Erythroid (plus matures). BFU-MK : Burst Forming Unit – Megakaryocyte (les plus immatures). CFU-MK : Colony Forming Unit –Megakaryocyte (plus matures)

I.4.La régulation :

La régulation permet de maintenir à peu près constant le nombre de cellules sanguines malgré les variations de consommation importantes liées à des circonstances pathologiques.

Le principe de la régulation repose sur des mécanismes cellulaires et humoraux qui peuvent être stimulateurs ou inhibiteurs de l'hématopoïèse.

Les cellules souches de la moelle constituent la base indispensable à une hématopoïèse efficace. Ainsi, trois éléments jouent un rôle important pour obtenir une hématopoïèse correcte et régulée :

- ❖ Le microenvironnement médullaire.
- ❖ Certaines vitamines et oligoéléments.
- ❖ Les facteurs de croissance hématopoïétique (11, 12,15).

I.4.1. Le microenvironnement ou stroma médullaire :

L'hématopoïèse efficace nécessite une bonne organisation générale de la moelle c'est-à-dire des conditions anatomiques et intercellulaires adéquates représentées par :

- Les fibroblastes.
- Les cellules endothéliales.
- Les macrophages.
- Les cellules épithéliales
- les adipocytes.

Ces cellules sécrètent la matrice extracellulaire (pour l'adhésion des cellules souches) et des facteurs de croissance (11, 13).

I.4.2. Les vitamines et oligoéléments :

La vitamine B12 et l'acide folique (anti-mégaloblastiques) nécessaires à la synthèse de l'ADN (division cellulaire). Leurs déficits entraîneront des anomalies de formation dans toutes les lignées. D'autres sont nécessaires à la fabrication de protéines spécifiques de lignées comme le fer, indispensable à l'érythropoïèse pour la synthèse de l'hémoglobine (11, 13).

I.4.3. Les facteurs de croissance (FCH) :

L'étude des cellules souches par culture de moelle in vitro a montré la nécessité de "facteurs de croissance hématopoïétiques" pour la survie, la différenciation, la multiplication et la maturation des cellules de l'hématopoïèse. Ces FCH sont des cytokines sauf ceux synthétisés spécifiquement par les lymphocytes que l'on nomme interleukines (IL) et qui reconnaissent leurs cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs membranaires (11, 12).

Selon leur lieu d'application au cours de l'hématopoïèse, il existe trois grands types de facteurs de croissance :

I.4.3.1. Les facteurs de promotion :

Ce sont principalement : L'IL 1, l'IL 4, l'IL 6 et le SCF (Stem Cell Factor).

Ils augmentent le nombre de CSH et les sensibilisent à l'action des autres facteurs de croissance (13).

I.4.3.2. Les facteurs multipotents :

Il s'agit principalement de : L'IL 3 et le GM-CSF (CSF = Colony Stimulating Factor).

Ils agissent sur les cellules souches les plus immatures après sensibilisation par les facteurs de promotion et permettent la survie et la différenciation des cellules souches (13).

I.4.3.3. Les facteurs restreints :

Ils agissent sur les cellules souches engagées et favorisent la multiplication cellulaire ainsi que la maturation des précurseurs. Ce sont principalement :

- Le G-CSF pour la lignée granuleuse neutrophile.
- Le M-CSF pour la lignée monocyttaire.
- L'IL 5 ou Eosinophil Differentiating Factor (EDF) pour la lignée granuleuse éosinophile.
- L'IL 4 ou BSF 1 pour la lignée granuleuse basophile.
- L'IL 6 pour la lignée mégacaryocytaire.
- L'érythropoïétine EPO pour la lignée érythroïde.
- La thrombopoïétine TPO pour la lignée mégacaryocytaire. (13,15,16).

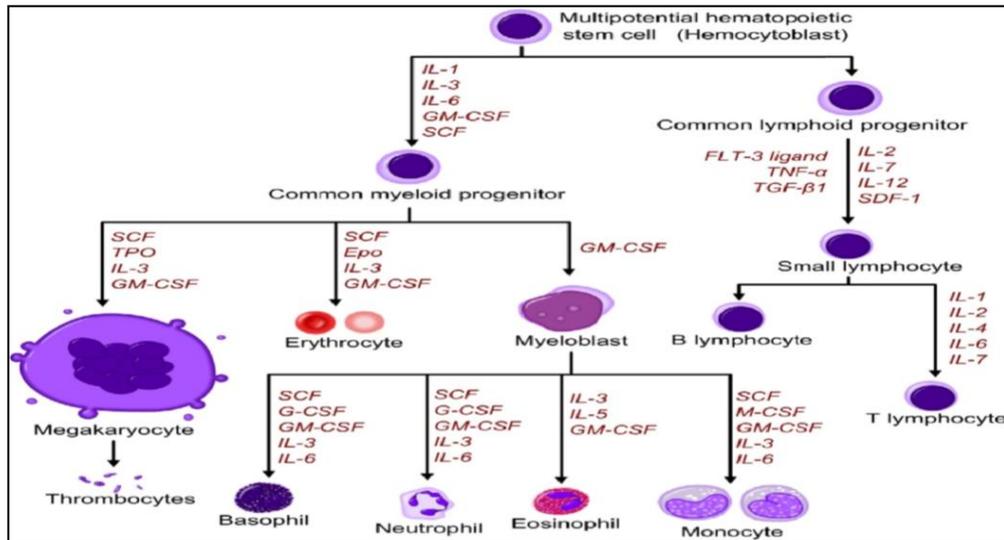


Figure 2 : facteurs de croissance hématopoïétiques.

I.5. La régulation négative :

Des cellules normales et divers facteurs ont été impliqués dans la régulation négative de l'hématopoïèse :

- ❖ Les lymphocytes T disposent de deux mécanismes d'inhibition :
 - L'un non restreint par les groupes majeurs d'histocompatibilité (HLA), est médié par l'interféron γ et les TNF α et β lesquels diminuent le nombre de récepteurs R-G-CSF et augmentent les récepteurs R-GM-CSF et R-IL-3.
 - L'autre a été décrit sur la pousse des BFU-E, puis également des CFU-GM avec une restriction génétique liée au locus HLA-DR.
- ❖ Les cellules Natural Killer ont également des effets suppresseurs sur la différenciation des progéniteurs CFU - E, CFU-GEMM par action des TNF α .
- ❖ Les monocytes/macrophages ont une action soit isolée, soit en coopération avec les lymphocytes T ou avec les cellules du stroma médullaire par la sécrétion de facteurs solubles comme les prostaglandines E, les interférons, les isoferitines acides ou le TNF α qui diminue la production de G-CSF et de GM-CSF.

- ❖ Enfin, il faut signaler que les cellules matures d'une lignée peuvent sécréter leurs propres facteurs inhibiteurs comme les contenus des plaquettes circulantes pouvant jouer un rôle dans le rétrocontrôle de la production plaquettaire. Il s'agit par exemple du facteur dont l'effet inhibiteur s'exerce sur le facteur plaquettaire 4 (PF4) et du TGF α , sur l'ensemble des lignées myéloïdes et non exclusivement sur la lignée mégacaryocyto-plaquettaire (13).

I.6. Les hémopathies :

Le terme hémopathie correspond aux maladies du système hématopoïétique qui touche les cellules du sang. Il existe deux groupes d'hémopathies :

- Les hémopathies bénignes.
- Les hémopathies malignes.

I.6.1. Les Hémopathies malignes :

Ce sont des néoplasies développés 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.
- Tumeurs solides appelées sarcomes pour les cellules de la moelle osseuse.
- Lymphomes pour les cellules lymphoïdes (17).

Classification :

Selon la classification de l'OMS 2001 on distingue :

I.6.1.1 Hémopathies myéloïdes :

Ces affections se développent à partir des cellules souches de la moelle osseuse, comportant des précurseurs des lignées granuleuse, érythroblastique, mégacaryocytaire, histio-monocytaire. Elles comportent trois grands groupes de maladies (18,19) :

I.6.1.1.1 Les syndromes myéloprolifératifs chroniques :

Elles se caractérisent par l'accumulation sanguine et médullaire de cellules différenciées :

- granuleuses : leucémie myéloïde chronique LMC.
- érythroblastiques : polyglobulie primitive.
- mégacaryocytaires : thrombocytémie essentielle.
- des trois lignées : myélofibrose idiopathique.

Ces affections chroniques peuvent évoluer vers une leucémie aiguë (LA).

I.6.1.1.2. Les syndromes myélodysplasiques :

Ils se caractérisent par d'importants désordres de maturation d'une ou des trois lignées médullaires, responsables de cytopénie. Ils peuvent également évoluer vers une leucémie aiguë.

I.6.1.1.3. Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) :

Elles se caractérisent par la prolifération rapide de précurseurs médullaires des trois lignées, aboutissant à l'accumulation dans le sang et la moelle de cellules immatures, détruisant l'hématopoïèse normale.

I.6.1.1.2. Les lymphomes :

Ce sont des néoplasies se développant à partir de cellules souches donnant les lignées B ou NK/T. Deux grands groupes sont distingués (19,20) :

I.6.1.1.2.1. Les lymphomes non-hodgkiniens :

Ces néoplasies peuvent réaliser tantôt des leucémies, tantôt des tumeurs solides, les deux présentations pouvant coexister ou se succéder chez un même patient. L'immunophénotype permet de distinguer trois groupes de lymphomes non-hodgkiniens :

- ❖ Les lymphomes de type précurseur.
- ❖ Les lymphomes périphériques à cellules B.
- ❖ Les lymphomes périphériques à cellules NK/T.

I.6.1.1.2.2. Le lymphome de Hodgkin :

Ce lymphome représente environ 35 à 40 % de tous les lymphomes. Néoplasie du sujet jeune, Deux grandes variétés de lymphome de Hodgkin sont reconnues :

- ❖ Lymphome de Hodgkin classique.
- ❖ Lymphome de Hodgkin à prédominance lymphocytaire nodulaire.

I.6.1.1.3. Les néoplasies histiocytaires et des cellules dendritiques :

Ces proliférations, peu fréquentes, se développent à partir des précurseurs monocytaires et histiocytaires de la moelle osseuse (19).

I.6.1.1.4. Les mastocytoses :

Il s'agit de proliférations se développant à partir des mastocytes.

La mastocytose peut être cutanée ou systémique (19).

Chapitre II

Présentation de la Leucémie myéloïde chronique LMC

II.1. Définition :

La leucémie myéloïde chronique est une hémopathie maligne appartenant au groupe des syndromes myéloprolifératifs chroniques .Elle consiste en une prolifération clonale maligne du tissu myéloïde, prédominante sur la lignée granuleuse, avec conservation de la capacité de maturation.

Sur le plan cytogénétique, elle est caractérisée par une anomalie chromosomique acquise dénommée chromosome Philadelphie, résultant de la translocation réciproque et équilibrée sans perte du matériel génétique entre les bras longs des chromosomes 9 et 22 t (9;22) (q34 ; q11). La conséquence de cette translocation est la formation d'un gène de fusion chimérique BCR-ABL, qui code pour une protéine chimérique. Cette dernière possède une forte activité enzymatique constitutive de type tyrosine kinase (TK) susceptible d'activer certaines voies de transduction de signal et ainsi participer à la Leucémogénèse (21,22).

II.2. Epidémiologie :

La LMC est une pathologie rare, représentant 2 à 5 % des leucémies de l'enfant et autour de 15 % des leucémies de l'adulte. Certains auteurs présentent même le chiffre 25 % de leucémies, chez l'adulte (23).

L'incidence de la leucémie myéloïde chronique dans le monde est estimée entre 0,6 et 2 cas / 100 000 habitants. Elle varie d'un pays à l'autre, la plus basse incidence étant retrouvée en Suède et en Chine, avec une valeur de 0.7 cas / 100 000 habitants et la plus élevée, retrouvée en Suisse et aux Etats Unis, avec une valeur de 1.7 cas / 100 000 habitants (24).

En Algérie, la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) occupe la 5ème place des cancers les plus répandus avec quelques 1000 à 3000 patients atteints et une moyenne de nouveaux cas diagnostiqués par année, passée de 88 entre 1994 et 2004, à 155 entre 2005 et 2009 (24). Le taux d'incidence de cette pathologie a, malheureusement, progressé pour passer de 0,19 cas / 100 000 habitants en 1994 à 0,48 cas / 100 000 habitants en 2014 (tableau).

Une étude algérienne a révélé, chez les sujets atteints de LMC, un âge moyen, au diagnostic, de 43,5 ans, avec un pic de fréquence dans la tranche allant de 36 à 45 ans, faisant de la LMC une affection de l'adulte jeune (24).

Enfin, la répartition en fonction du sexe, montre une légère prédominance masculine en Algérie, Un sex-ratio H/F de 1,2, a été retrouvé dans une étude algéro-tunisienne, réalisée entre 2010 et 2014 (25).

Tableau 1: Evolution du taux d'incidence de la LMC en Algérie entre 1994 et 2014.

| Année | Taux d'incidence (/100 000 habitants) | Année | Taux d'incidence (/100 000 habitants) |
|-------|---------------------------------------|-------|---------------------------------------|
| 1994 | 0.19 | 2005 | 0.37 |
| 1995 | 0.25 | 2006 | 0.45 |
| 1996 | 0.30 | 2007 | 0.50 |
| 1997 | 0.31 | 2008 | 0.54 |
| 1998 | 0.30 | 2009 | 0.44 |
| 1999 | 0.25 | 2010 | 0.56 |
| 2000 | 0.26 | 2011 | 0.56 |
| 2001 | 0.32 | 2012 | 0.50 |
| 2002 | 0.38 | 2013 | 0.57 |
| 2003 | 0.33 | 2014 | 0.48 |
| 2004 | 0.40 | | |

II.3. Etiologie :

Souvent, aucun agent étiologique n'est incriminé dans la LMC. L'exposition aux rayonnements ionisants (par exemple les survivants des expositions atomiques au Japon en 1945 ou les personnes soumises à des radiothérapies pour spondylarthrite ankylosante ou cancer du col de l'utérus) augmente le risque de LMC, le pic d'incidence se situant 5 à 12 ans après l'exposition ; le risque dépend de la dose (26).

L'exposition professionnelle aux dérivés benzéniques et aux pesticides semble, également, augmenter modérément le risque de développement d'une LMC (27).

II.4. Physiopathologie :

II.4.1. Chromosome Philadelphie :

C'est une anomalie acquise présente dans environ 98 % des cas de LMC. Il résulte d'une translocation réciproque entre le bras long de chromosome 9 en position q34 au niveau de l'oncogène Abelson (ABL) et le bras long de chromosome 22 en position q11 au niveau du gène BCR (breakpoint cluster région), la $t(9;22)(q34;q11)$, aboutissant à un nouveau gène appelé BCR-ABL(28),(29) (Figure). Ce gène de fusion chimérique, ainsi formé, est à l'origine de la néosynthèse d'une protéine hybride à activité kinase dérégulée (30,31).

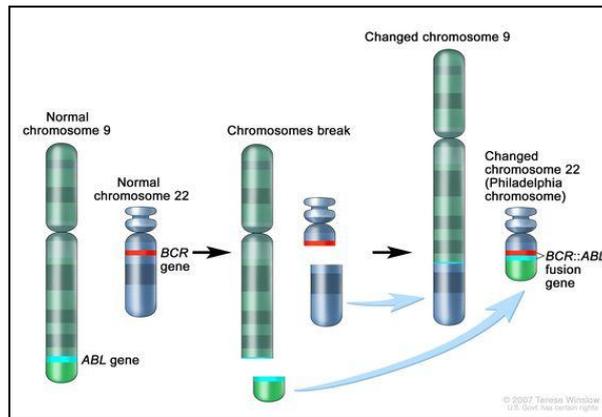


Figure 3 : Formation du chromosome Philadelphie.

II.4.2. Le gène ABL et sa protéine :

Le gène ABL est un oncogène, localisé sur le bras long du chromosome 9, au niveau de la bande q34. Il est composé de 11 exons, dont deux exons alternatifs (1a et 1b), les introns situés entre les exons 1b et 1a et les introns situés entre 1a et 2a constituent les points de cassures lors de la LMC (32), leur transcription résulte en deux ARN messagers mesurant respectivement 6 et 7 kb dont la traduction aboutit à la formation de deux isoformes protéiques d'environ 145 kDa (33, 34).

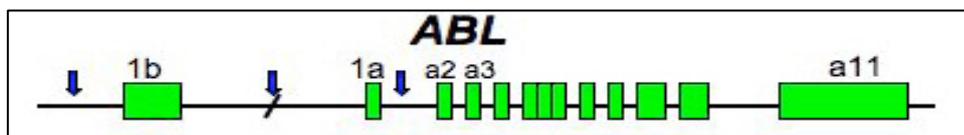


Figure 4 : Gène ABL. L'emplacement des deux points de cassure possibles : au niveau de l'intron séparant les exons 1a et 1b ou entre les exons 1a et a2 (34).

- Ces isoformes se distinguent par leurs localisations. La myristoylation de la protéine provenant de l'exon 1b, permet sa localisation à la membrane cytoplasmique ou elle joue un rôle important dans la croissance et la prolifération cellulaire, participant à la transduction du signal initiée par certains récepteurs aux facteurs de croissance. tandis que l'absence du résidu glycine dans la forme majoritaire 1a entraîne sa localisation nucléaire (33) ou elle joue un rôle de régulateur négatif du cycle cellulaire (40).

À l'instar de la protéine Src, la protéine ABL comporte également des domaines d'homologie SH (Src homology) au niveau de sa région N-terminale.

- Le domaine SH3 stabilise ABL sous sa forme inactive, il est régulateur négatif de l'activité du domaine SH2. La délétion de la région codant pour le domaine SH3 résulte en l'activation de l'oncogène (35).

- Le domaine SH2 permet la reconnaissance de motifs contenant une tyrosine phosphorylée participant ainsi à la transmission du signal, il est à son tour un régulateur positif du domaine catalytique SH1(35).
- Le domaine SH1 constitue le support de l'activité tyrosine kinase de la protéine ABL (36).

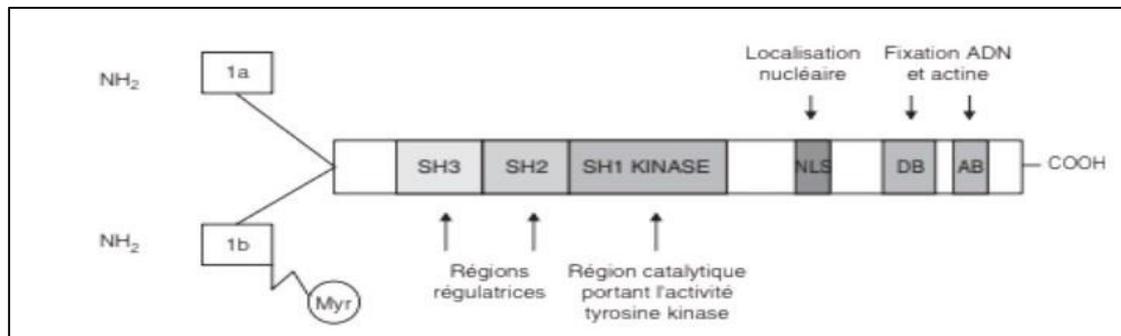


Figure 5: Représentation schématique de la protéine ABL.

II.4.3. Le gène BCR et sa protéine :

Le gène BCR, positionné sur le bras long du chromosome 22, a été découvert en clonant la région appelée major-Breakpoint cluster région (M-BCR) où ont lieu la majorité des points de Cassure dans la LMC. Comprend 23 exons et permet la transcription de deux types d'ARN messagers dont les poids moléculaires sont respectivement de 4,5 et 6,7 kb et qui codent une protéine de 160 kDa, d'expression ubiquitaire.

Cette protéine, de localisation cytoplasmique lorsque la cellule n'est pas en cycle, est exprimée de manière perichromosomique lors de la mitose, ce qui suggère qu'elle joue un rôle dans le cycle cellulaire (37).

La protéine BCR est constituée de plusieurs domaines : (Figure 6).

- Le domaine 1B constitue une région importante puisqu'il permet la dimérisation de la protéine BCR-ABL conduisant à l'ouverture de l'activité kinase.
- Le domaine 2B comprend deux sites de liaison aux domaines SH2 comme ceux portés par la protéine ABL et la protéine Grb2.
- La région centrale présente un domaine d'homologie avec les protéines Dbl (facteur d'échange guanosine triphosphate [GTP]/guanosine).

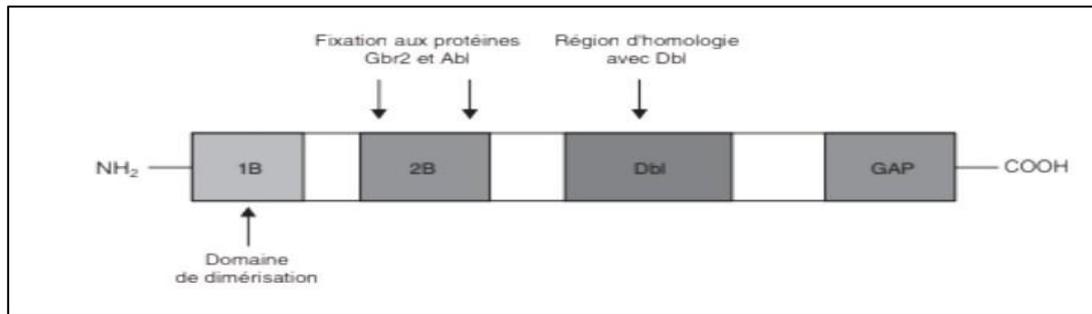


Figure 6: Représentation schématique de la protéine BCR

II.4.4. Gène BCR-ABL et protéine de fusion :

La formation du gène hybride BCR-ABL est la résultante de la fusion des exons du gène ABL avec différentes régions du gène BCR. En effet, les points de cassure permettent de distinguer trois régions (Figure 7) :

- **M-BCR (Major BCR)** : qui correspond aux exons 12 à 16 du gène BCR, est subdivisée en cinq bandes, de b1 à b5, qui correspondent aux cinq exons impliqués (exons 12 = b1, exon 13 = b2..., exon 16 = b5). La coupure au sein de cette région se produit préférentiellement [18] entre les exons b2 et b3 ou b3 et b4 (Fig. 2). Ainsi se forment, respectivement, les produits de fusion b2a2 et b3a2.

Les ARN messagers ainsi produits codent tous deux une protéine chimérique de 210 kDa. (38)

- **m-BCR (minor BCR)**: la cassure entre les exons 1 et 2 de BCR de cette région se produit la fusion e1a2. Elle produit une protéine chimérique de 190 kDa dont l'activité tyrosine kinase serait plus intense que celle de la protéine de 210 kDa.
- **μ-BCR (micro-BCR)** : la cassure entre les exons 19 et 20 de BCR de cette région se produit la fusion e19a2, permet la synthèse d'une protéine chimérique de 230 kDa (39).
- Plus rarement le point de cassure dans ABL peut survenir dans l'intron 2 entraînant alors la juxtaposition de l'exon 13 et 14 de BCR avec l'exon 3 d'ABL. Ainsi se forment respectivement les produits de fusion b2a3, b3a3.

Dans des cas on trouve des transcrits atypiques, notamment les transcrits e8a2, e6a2, e1a3, (41), (42).

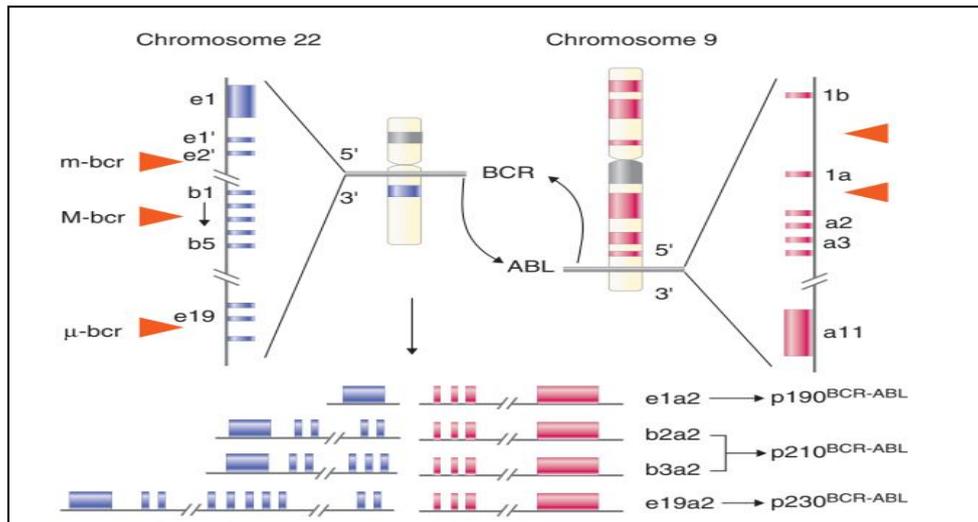


Figure 7: Les différents points de cassures.

La protéine BCR-ABL de 210kd comprend les trois domaines SH1, SH2, SH3 et tous les autres domaines d'ABL. Du côté BCR, le motif de dimérisation est la partie la plus importante. Cette partie de BCR conduit à la dimérisation de la protéine BCR-ABL et à son autoactivation par transphosphorylation. De plus, la perte de la partie N-terminale d'ABL supprime son auto-inhibition. Ces deux modifications protéiques expliquent l'activation permanente de la tyrosine kinase de BCR-ABL.

La protéine tyrosine kinase ABL physiologique est autorégulée, sa fusion à BCR modifie cette auto-inhibition et active en permanence la kinase (40).

II.4.5. Leucémogénèse :

Ce qui distingue une cellule leucémique d'une cellule normale est sa propriété de phosphoryler un nombre très important de substrats.

L'autoactivation et la perte de régulation de l'activité tyrosine kinase entraînent, en effet, l'activation directe ou indirecte et le recrutement de diverses voies de signalisation (voies Ras/Mapk, PI3k/Akt, Jak/stat et Myc) dont il est difficile d'établir un schéma définitif et de distinguer celles essentielles au processus oncogénique. Ces voies de signalisation sont impliquées dans divers processus et leur désorganisation par BCR-ABL est à la base des effets cellulaires observés, avec essentiellement : défaut d'adhésion, production autocrine de facteurs de croissance, prolifération cellulaire accrue et défaut d'apoptose (40), (43).

Les principaux mécanismes impliqués dans cette leucémogénèse sont :

- ❖ Diminution de l'adhésion des cellules tumorales immatures BCR-ABL aux cellules du stroma de la moelle osseuse et à la matrice extracellulaire médullaire. (40), (30).

L'adhésion cellulaire est médiée par différentes familles de molécules comme les intégrines. L'expression de ces molécules d'adhésion n'est pas modifiée mais leur fonction et le signal qu'elles induisent sont dérégulés. Ainsi, la phosphorylation par Bcr-Abl de protéines comme Crkl, la paxilline ou la talline, jouerait un rôle important dans cette dérégulation (41).

- ❖ Activation de signaux mitotiques induisant une perte de contrôle de la myéloprolifération mais maintien de la différenciation. Cette activation des voies de signalisation mitogéniques est, notamment, due à l'autophosphorylation d'un résidu tyrosine de la protéine BCR-ABL (40), (30).
- ❖ Inhibition de l'apoptose et augmentation de la survie des cellules BCR-ABL, notamment par phosphorylation d'une protéine proapoptotique ou hyperexpression d'une protéine antiapoptotique (40,30).

II.4.6. Instabilité génétique :

L'instabilité génétique dans la LMC peut faire intervenir plusieurs mécanismes, dépendant ou non de BCR-ABL.

BCR-ABL dépendant : Stimulation de l'activité du protéasome, entraînant la dégradation d'inhibiteurs physiologiques de l'activité catalytique ABL et de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN (Acide DésoxyriboNucléique).

Elle est, probablement, responsable de l'apparition, à l'échelle chromosomique, d'anomalies cytogénétiques additionnelles (ACA) et explique la progression de la maladie (accélération ou crise blastique). A l'échelle moléculaire, diverses mutations ont été mises en évidence. Ces anomalies génétiques, combinées à des modifications épigénétiques, mènent à l'activation d'oncogènes ou à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs qui jouent un rôle pivot dans le processus de transformation, en coopération avec BCR-ABL (40,43).

Il a été démontré que les progéniteurs de patients en phase blastique, pouvaient s'autorenouveler, alors que cette propriété est, normalement, propre et exclusive de la cellule souche (40).

II.5. Diagnostic :

II .5.1. Circonstances de découverte :

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

- ❖ La maladie peut aussi se révéler par son symptôme cardinal, la splénomégalie retrouvée dans 50 à 60 % des cas (44).

II.5.2. Diagnostic biologique :

II .5.2.1. Hémogramme : FNS + Frottis sanguin

L'hémogramme est l'examen le plus important car il permet à lui seul d'évoquer le diagnostic.

- Une hyperleucocytose, supérieure à $25000/\text{mm}^3$, majoritairement composée de polynucléaires neutrophiles, associée à une basophilie et à une éosinophilie.
- L'anémie (normocytaire et normochrome) est peu courante et modérée.
- La thrombocytose est habituelle et souvent supérieure à $500\ 000/\text{mm}^3$.
- La myélémie est constante et harmonieuse, sans hiatus de différenciation ($>20\%$), et la blastose est faible lors de la phase chronique ($<5\%$) (45).

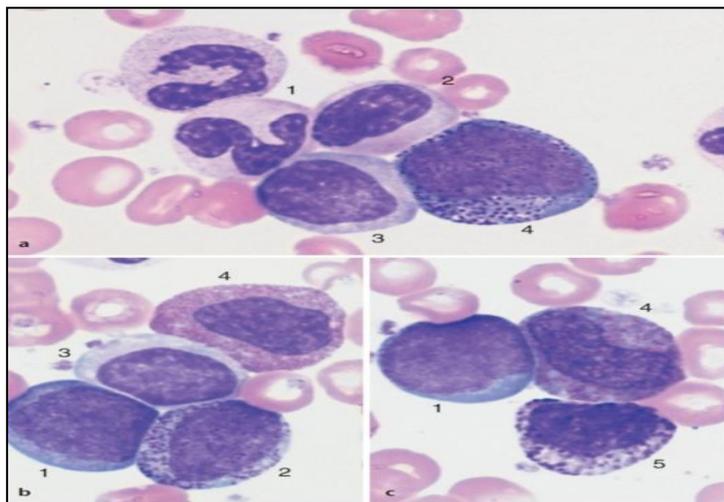


Figure 8: aspect du frottis sanguin.

a. Frottis au cours d'une LMC dans sa phase chronique : (1) polynucléaires neutrophiles à noyau segmenté, (2) polynucléaire à noyau non segmenté (le noyau « replié » le fait ressembler à un métamyélocyte), (3) myélocyte avec déficit de granulations et (4) promyélocyte.

b, c. LMC en phase chronique : (1) myéloblaste, (2) promyélocyte, (3) myélocyte avec déficit de granulations, (4) éosinophile immature, (5) polynucléaire basophile (granules plus épais et plus foncés, noyau plus dense que celui du promyélocyte).

II.5.2.2. Myélogramme :

Un myélogramme est systématiquement réalisé au diagnostic afin de préciser la phase de la maladie et de réaliser le caryotype initial.

Les frottis médullaires montrent une hyperplasie importante de la lignée granuleuse à tous les stades de maturation sans anomalie morphologique des lignées granuleuse et érythroblastique.

Le nombre de blastes permettra de définir le stade de la maladie. Concernant les mégacaryocytes, ces derniers sont souvent en nombre augmenté avec le plus souvent un aspect morphologique anormal : de petite taille et à noyaux hypolobés (45).

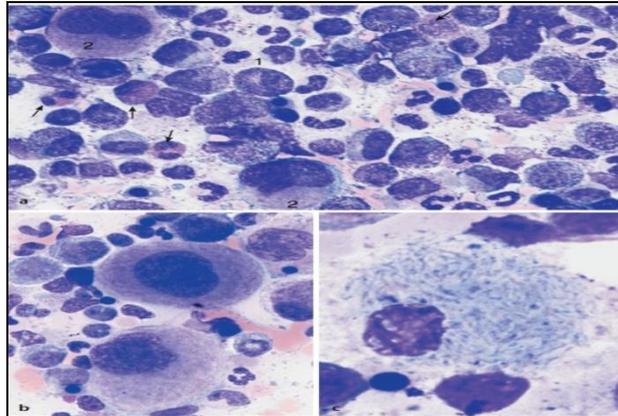


Figure 9: Cytologie médullaire au cours d'une LMC.

a. Cytologie médullaire au cours d'une phase chronique : (1) augmentation de la densité cellulaire en raison d'une granulopoïèse accrue et augmentation de la proportion des formes jeunes, dont un nid de promyélocytes, (2) des mégacaryocytes. (Flèches) Augmentation des éosinophiles, diminution apparente de l'érythropoïèse.

b. Micromégacaryocytes sur un frottis médullaire.

c. Cellules pseudo-Gaucher dans la moelle osseuse au cours d'une LMC.

II.5.3. Diagnostic cytogénétique :

II.5.3.1. La cytogénétique conventionnelle : le caryotype

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

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

C'est un examen utilisé pour le diagnostic de la LMC, met en évidence dans 95 % des cas la présence du chromosome Philadelphie, classiquement présent dans toutes les cellules.

Il permet également la détection d'éventuelles anomalies cytogénétiques additionnelles (ACA) dont les plus fréquentes sont : la duplication du chromosome Philadelphie, les trisomies 8 et 19 et anomalie du bras court du chromosome 17 (en particulier l'isochromosome 17). Ces anomalies clonales surajoutées dans les métaphases Ph1+ (ACA/Ph1+) constituent

une évolution clonale de la maladie et sont considérées comme un critère d'échec au traitement et un critère d'évolution de la maladie (46).

La t(9;22)(q34;q11) caractéristique n'est retrouvée que dans 95 % des cas, dans les 5 % restant, le chromosome Philadelphie est dit « masqué » et donc non visible au caryotype, ce phénomène est dû à l'insertion cryptique de 3' ABL1 dans le chromosome 22 non visible au caryotype, cela peut être révélé par des techniques de cytogénétique moléculaire, permettant de visualiser la fusion des gènes BCR et ABL sur les chromosomes ou sur les noyaux en interphase, la plus utilisée est l'hybridation in situ par fluorescence (FISH).

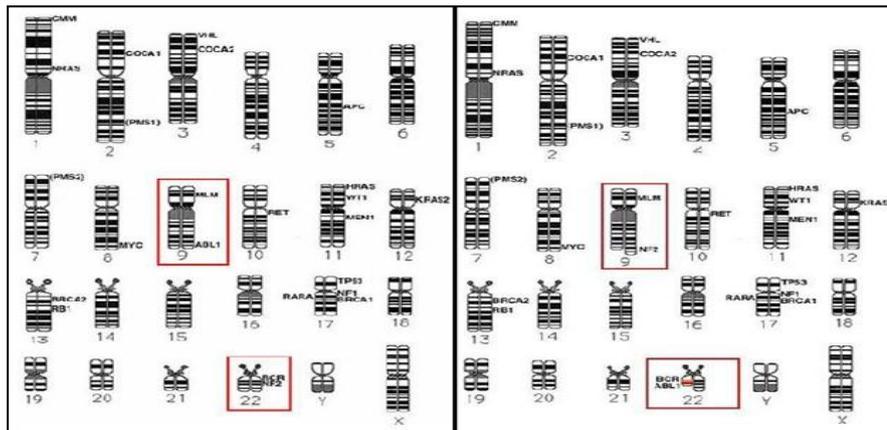


Figure 10: caryotype d'une personne saine (à gauche) et caryotype d'une personne atteinte (à droite).

II.5.3.2. La cytogénétique moléculaire : FISH

Il s'agit d'une technique réalisée par hybridation de sondes génomiques fluorescentes complémentaires des gènes BCR (sonde rouge) et ABL (sonde verte). Elle permet de visualiser directement le gène de fusion BCR-ABL sur des métaphases ou des noyaux cellulaires en interphases, qu'il y ait translocation visible en cytogénétique ou pas. La fusion BCR-ABL est visualisée sous forme d'un signal jaune résultant de la fusion des deux couleurs. Figure 11

L'avantage de cette technique est de détecter les remaniements BCR-ABL et d'être plus sensible que le caryotype. Elle ne permet pas, en revanche, de mettre en évidence des anomalies cytogénétiques additionnelles. Cependant, elle peut être utile pour rechercher une délétion du chromosome 9, reconnue comme facteur pronostique péjoratif (23).

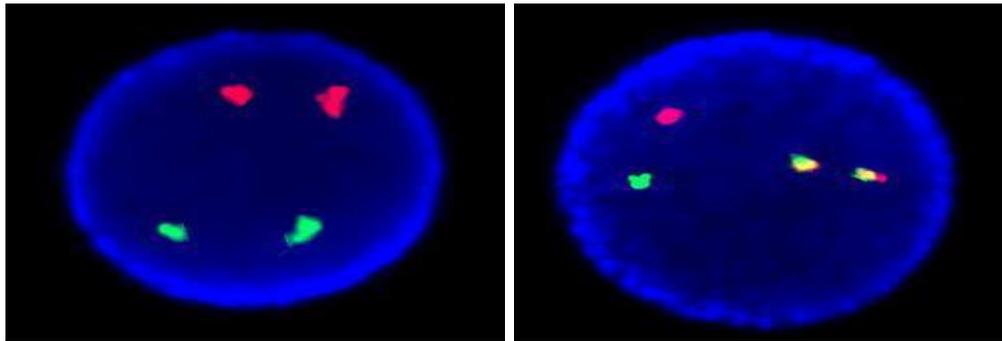


Figure 11: Gène de fusion BCR-ABL détecté par FISH.

A gauche : cellule normale (sonde BCR en vert, sonde ABL en rouge).

A droite : détection du gène de fusion BCR-ABL1 en jaune. (41)

II. 5.4. Diagnostic moléculaire :

II .5.4.1. La reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) :

La RT-PCR Permet la recherche des transcrits du gène de fusion BCR-ABL. Cette technique repose sur l'extraction des ARN totaux à partir des globules blancs, la transformation de l'ARN en son ADN complémentaire (ADNc) grâce à une transcriptase inverse, puis l'amplification par PCR de l'ADNc (48).

Elle confirme le diagnostic en mettant en évidence le transcrit de fusion. Elle permet aussi de définir l'isoforme moléculaire produit en fonction du point de cassure sur le gène BCR Tableau (49).

Tableau 2 : Les transcrits de fusions BCR-ABL.

| Désignation du point d'arrêt | Chrm 22 (gène <i>bcr</i>) Emplacement de la rupture | Chrm 9 (gène <i>abl</i>) Emplacement de la rupture | Variant Transcript Désignation |
|------------------------------|---|--|--------------------------------|
| <i>M-bcr</i> (exons 12-16) | Intron 13 | Intron 1 | b2-a2 (e13-a2) |
| | Intron 14 | Intron 1 | b3-a2 (e14-a2) |
| | Intron 13 | Intron 2 | b2-a3 (rare) (e13-a3) |
| | Intron 14 | Intron 2 | b3-a3 (rare) (e14-a3) |
| <i>m-bcr</i> | Intron 1 | Intron 1 | e1-a2 |
| <i>μ-bcr</i> (rare) | Intron 19 | Intron 1 | e19-a2 |

L'étude moléculaire par RT-PCR constitue une bonne alternative à l'étude cytogénétique dans la LMC. Elle ne nécessite pas obligatoirement de prélèvement de la moelle et permet de s'affranchir des contraintes liées à la culture cellulaire et à l'étude des mitoses. Elle permet de diagnostiquer les LMC Ph- mais ne met pas en évidence les anomalies génétiques additionnelles (50).

La RT-PCR peut être qualitative ou permettre de faire des mesures quantitatives : il s'agit de la RT-QPCR (Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction), au diagnostic, elle permet une évaluation de la « masse leucémique », utile pour l'interprétation du suivi(51).

La difficulté de ce diagnostic moléculaire est lorsque certains patients expriment des transcrits variant, le recours donc à une amplification multiplexe capable d'amplifier la plupart de ces transcrits est fortement recommandé (52).

II.5.4.2. NGS :

Le NGS permet la détection des mutations du domaine kinase de BCR-ABL, après une première étape de RT-PCR nichée(53). La limite de détection (de l'ordre de 1 %) autorise le dépistage des mutations à l'origine d'une résistance aux ITK plus précocement, mais aussi la détection des mutations minoritaires (additionnelles ou indépendantes). Si le NGS est capable de mettre en évidence des mutations doubles, la distinction entre mutations polyclonales et mutations composées peut être difficile du fait de la petite taille des fragments séquencés (short-read lengths). Dans ce cas, des technologies de NGS longue distance (long-range NGS) peuvent à la fois assurer une sensibilité élevée, donc la détection de mutations minoritaires et la caractérisation de mutations composées(54).

L'analyse NGS contribue à une meilleure compréhension de l'architecture clonale des populations mutées(55).

II.6. Evolution :

La LMC est une maladie d'évolution lente. Les lignées myéloïdes ont une expansion progressive dans la moelle osseuse et le sang. En l'absence de traitement adapté, l'évolution naturelle de la maladie suit 3 phases : phase chronique, phase accélérée et crise blastique (56).

II.6.1. Phase chronique (LMC-PC) :

Il s'agit d'une phase d'installation progressive et d'évolution lente, au cours de laquelle le diagnostic est le plus souvent posé. Plus de 90 % des patients sont, en effet, diagnostiqués pendant cette phase qui dure, en moyenne, 4 à 5 ans. Les signes cliniques sont, souvent, insidieux et peu caractéristiques ; 40 % des patients sont asymptomatiques, au moment du diagnostic qui est, souvent, fortuit (23 56 57). Trois grands syndromes peuvent cependant se présenter :

- ❖ Altération de l'état général, en relation avec l'hypermétabolisme, associant asthénie, amaigrissement et, plus rarement, une fébricule et des sueurs nocturnes (23).

- ❖ Un syndrome tumoral, largement caractérisé par une splénomégalie (50 %), parfois responsable d'une symptomatologie digestive.
- ❖ Signes de leucostase exceptionnels, notamment représentés un priapisme ou autres complications inaugurales telles qu'une crise de goutte (23,58).

Les critères énumérés par l'OMS diffèrent, principalement, par la valeur du taux de blastes sanguins et médullaires, qui est fixée à 10 % au lieu de 15 %.

II.6.2. Phase accélérée (LMC-PA) :

Inconstante, elle peut être quasi-inexistante et correspond à la transition entre la phase chronique et la phase blastique. Sa durée moyenne est de 12 à 18 mois. Plusieurs critères sont, classiquement, décrits dans l'accélération de la LMC parmi lesquels, la réapparition ou la majoration de certains signes cliniques, l'évolutivité des anomalies de l'hémogramme et du myélogramme ou l'apparition d'anomalies chromosomiques additionnelles (23,56,59).

II.6.3. Phase d'acutisation ou crise blastique (LMC-PB) :

C'est la phase au cours de laquelle la leucémie devient aiguë, avec l'apparition de cellules blastiques dans la moelle et dans le sang. Elle dure 3 à 6 mois et peut se présenter comme une transformation myéloïde ou lymphoblastique, avec possibilité de retrouver des anomalies cytogénétiques additionnelles (ACA) au caryotype (23,56,57).

Tableau 3 : Critères définissant les phases : chronique, accélérée et blastique selon l’ELN et l’OMS.

| | Critères de l’ELN (2020) | Critères de l’OMS (2016) |
|------------------------|--|---|
| Phase chronique | <ul style="list-style-type: none"> •Blastes sanguins et médullaires < 15 % •Blastes + promyélocytes sanguins et médullaires < 30 %. •Basophiles sanguins < 20 %. •Plaquettes ≥ 100 000/m3. | <ul style="list-style-type: none"> •Blastes < 10 %. •Blastes + myéloblastes < 30 %. •Basophiles < 20 %. •N° plaquette > 100 G/L. <p>Ces critères permettent de ne pas considérer une partie des patients comme étant en phase accélérée ou blastique pour l'inclusion dans des protocoles thérapeutiques.</p> |
| Phase accélérée | <ul style="list-style-type: none"> •Blastes dans le sang ou la moelle de 15 à 29%. •Blastes + promyélocytes ≥ 30% dans le sang ou dans la moelle avec un taux de blastes < 30%. • Basophilie dans le sang ≥ 20% •Persistance d’une thrombopénie (<100G/L) non rattachée au traitement • Anomalies chromosomiques clonales sur les cellules Ph+ sous traitement. | <ul style="list-style-type: none"> •Blastes dans le sang ou la moelle de 10 à 19%. •Basophilie ≥ 20%. •Persistance de la thrombopénie < 100G/L, sans lien avec le traitement. •Persistante ou augmentation du Nb des leucocytes au-delà de 10 G/L, ne répondant pas au traitement •Thrombocytose > 1000 G/L ne répondant pas au traitement. •Augmentation de la taille de la rate ou le taux des cellules sanguines ne répondant pas au traitement. •Anomalies chromosomiques clonales sur les cellules Ph+ sous traitement. |
| Phase blastique | <ul style="list-style-type: none"> •Blaste dans le sang ou la moelle ≥ 30%. •Prolifération blastique extra médullaire, en dehors de la rate. | <ul style="list-style-type: none"> •Blaste dans le sang ou la moelle ≥20% •Prolifération blastique extramédullaire, en dehors de la rate (les blastes pouvant être lymphoïdes ou myéloïdes) • Grandes foyers de blastes dans la BOM (Biopsie Ostéo-Médullaire) |

II.7.Les facteurs pronostics :

Plusieurs scores sont utilisés pour définir le pronostic initial du patient. Ils sont calculés à partir de paramètres évalués au moment du diagnostic, avant toute thérapie. Ils sont au nombre de quatre : score de Sokal, score de Hasford, score EUTOS et score ELTS (56,59).

II.7.1. Score de Sokal :

Proposé, en 1984, par Sokal et al, ce score est calculé à partir de 4 paramètres (âge, taille de la rate, pourcentage de blastes sanguins et nombre de plaquettes) et permet de séparer les patients en 3 groupes, en fonction du risque d’évolution vers la transformation, pour lesquels la survie globale diffère significativement (tableau 4). Bien qu’antérieur aux thérapeutiques actuelles, le score de Sokal reste le plus utilisé en pratique. En Algérie, la classification pronostique selon le score de Sokal, reste la classification de base au diagnostic (23,60,61,62).

Tableau 4 : les trois groupes à risque selon l'Indice de Sokal (NCCN2020).

| Score | Calcul | Interprétation | |
|--|---|---|--------------------------|
| Sokal | $\text{Indice} = \exp 0,0116 (\text{âge} - 43,4) + 0,0345 (\text{rate} - 7,51) + 0,188 [(\text{plaquettes}/700)^2 - 0,563] + 0,0887 (\text{blastés} - 2,10)$ | 3 groupes de risque : | Médiane de survie |
| | | ▪ Risque faible : indice < 0,80 | 66 mois |
| | | ▪ Risque intermédiaire : Indice = [0,80 - 1,2] | 44 mois |
| | | ▪ Risque élevé : indice > 1,2 | 32 mois |
| Rate : taille en dessous du rebord costal en cm Plaquettes en G/L Sexe : 1 pour masculin et 2 pour féminin Hématocrite en pourcentage (%) | | | |

II.7.2. Score EUTOS: (European treatment and Outcome Study for CML):

Le score EUTOS a été publié en 2011 (63) a été développé pour les patients traités par Imatinib en première intention ; il dépend, uniquement, de la basophilie sanguine et de la taille de la rate. Il sépare les patients en 2 groupes de risque (tableau 6). Ce score est utilisé, au diagnostic, et représente un modèle prédictif de la réponse cytogénétique complète à 18 mois (64).

Tableau 5 : les deux groupes à risque selon l'Indice de EUTOS.

| Score | Calcul | Interprétation |
|-------------|--|--------------------------------|
| Score EUTOS | $\text{Indice} = \text{rate} \times 4 + \text{basophiles} \times 7.$ | 2 groupes de risque |
| | | ▪ Risque faible : indice ≤ 87. |
| | | ▪ Haut risque : indice > 87. |

II.7.3. Score ELTS :

Le score ELTS (EUTOS Long-Term Survival) utilise le score EUTOS mais définit 3 niveaux de risque (tableau 7), en rapport avec la probabilité de mourir de LMC, en tenant compte de l'âge, de la taille de la rate, du pourcentage de blastés sanguins et du nombre de plaquettes (65,59).

Tableau 6 : les trois groupes à risque selon l'Indice de ELTS (NCCN2020).

| Score | Calcul | Interprétation |
|------------|---|---|
| Score ELTS | $\text{Indice} = 0,0025 \times (\text{age}/10)^3 + 0,0615 \times \text{rate} + 0,1052 \times \text{blaste} + 0,4104 \times (\text{plaquettes}/1000)^{0,5}.$ | 3 groupes de risque : |
| | | ▪ Risque faible : indice ≤ 1,5680 |
| | | ▪ Risque intermédiaire : Indice =] 1,5680 – 2,2185] |
| | | ▪ Haut risque : indice > 2,2185 |

II.8.La Prise en charge :

II.8.1. Traitement de la LMC :

Le traitement de la LMC a changé de manière progressive depuis sa découverte, passant

d'une chimiothérapie à visée symptomatique à une thérapie ciblée c'est à dire le ciblage de l'anomalie génétique à l'origine de la maladie (66).

II.8.1.1. Avant l'ère de la thérapeutique ciblée :

La prise en charge de la LMC demeura, essentiellement, palliative jusqu'à la fin du 20ème siècle (43).

- ❖ L'arsenic au début du 20e siècle, puis le busulfan et l'hydroxyurée (Hydréa), ont été utilisés pour améliorer la qualité de vie des patients en phase chronique, mais ne permettaient pas de stopper ou de ralentir de manière significative la progression de la maladie vers ses formes avancées. Par ailleurs, selon les dernières recommandations du ELN, l'hydroxyurée peut être utilisée temporairement jusqu'à ce qu'un diagnostic soit établi(67).
- ❖ Dans les années quatre-vingt, le seul traitement curatif de la LMC reconnu chez les patients jeunes était la greffe allogénique de CSH, elle est devenue ensuite dans les années quatre-vingt-dix, le traitement de première ligne pour tous les patients éligibles en phase chronique et en phase d'accélération précoce (68).

Cependant, depuis l'introduction des ITK et en raison d'une morbidité accrue liée à la maladie du greffon contre l'hôte (GVH), la transplantation n'est envisagée qu'en cas d'échec d'une prise en charge en seconde ligne par ITK(67).

- ❖ Le traitement par l'INF alpha est devenue dans les années quatre-vingt dix un traitement de première ligne chez les patients ne pouvant pas bénéficier d'une allogreffe car il permettait d'induire une RCyC(69). A l'heure actuelle, il offre un choix thérapeutique pour des patients intolérants aux ITK sans autre alternative thérapeutique.

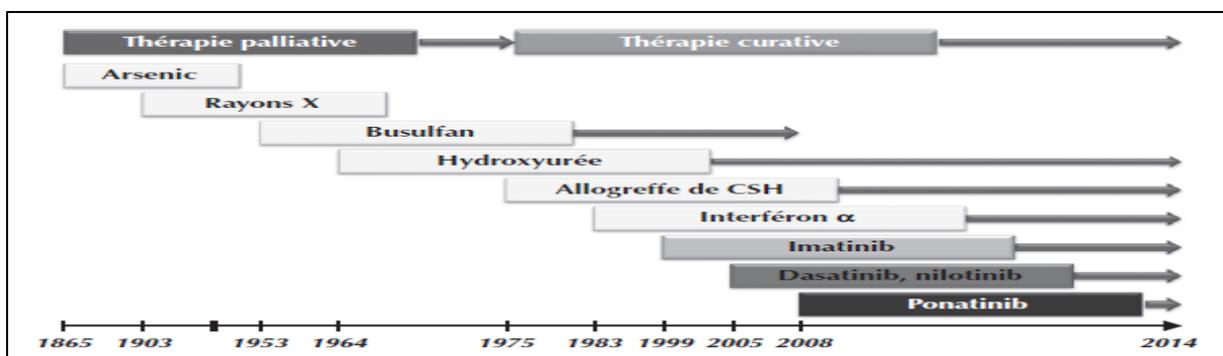


Figure 12 : Les grandes étapes de l'évolution du traitement de LMC.

II.8.1.2. Traitement de la leucémie myéloïde chronique à l'ère de la thérapeutique ciblée :

La LMC a été un modèle pour le développement des thérapies ciblées. Son pronostic a été radicalement transformé par la découverte des ITK. Ces molécules sont des inhibiteurs compétitifs de l'ATP et bloquent l'activation de la kinase BCR-ABL. Ils ont largement fait la démonstration de leur supériorité en termes de survie, de tolérance et d'efficacité sur tous les autres traitements précédemment décrits(70).

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

II.8.1.2.1. ITK de première génération (ITK1) :

II.8.1.2.1.1. Imatinib Mesylate ou GLivec®

C'est le premier inhibiteur compétitif actif de l'activité tyrosine-kinase de la protéine BCR-ABL. La thérapie avec imatinib entraîne de bonnes réponses de traitement et une espérance de vie normale chez la majorité des patients (71,72)

Nom chimique : (méthanesulfonate de 4-[(4-méthyl-1-pipérazinyl) méthyl]-N-[4-méthyl-3-[[4-(3-pyridinyl)-2-pyrimidinyl] amino]-phényl]benzamide) (73,74,75)

Structure chimique :

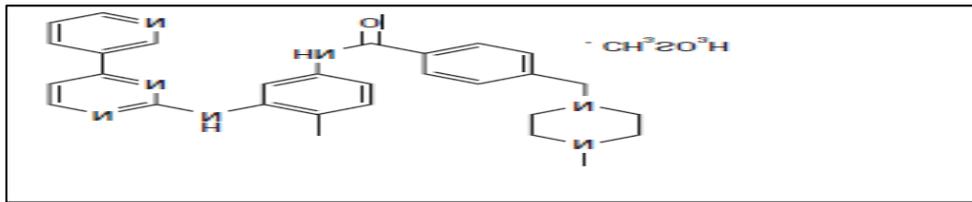


Figure 13: Structure chimique de l'Imatinib

Mécanisme d'action :

Il agit comme un agent compétiteur de l'adénosine triphosphate (ATP) au niveau du site catalytique de la protéine Kinase BCR-ABL et l'empêche ainsi d'exercer son activité de phosphorylation. Il bloque ainsi l'autophosphorylation de BCR/ABL et celle d'autres kinases telles : PDGF-R et c-Kit(76)

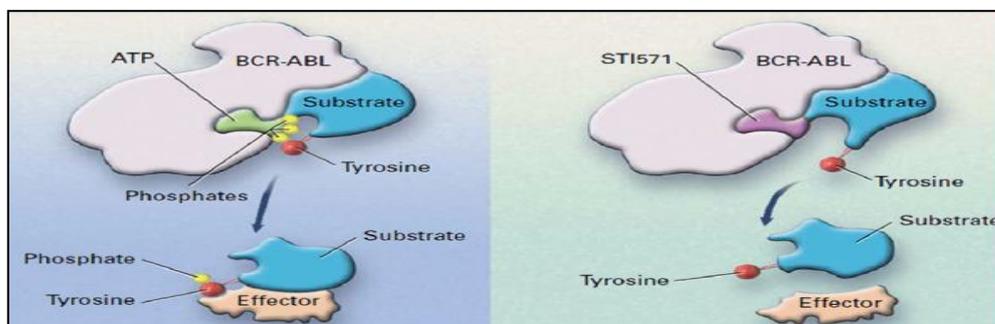


Figure 14 : Mécanisme d'action de l'Imatinib.

II.8.1.2.2. ITK de deuxième génération (ITK2):

Indiqués initialement dans les formes résistantes par nouvelles mutations ou en cas d'intolérance à l'Imatinib. Ils sont efficaces en cas de mutation à l'exception de la mutation T315I. Le risque d'intolérance croisée lors du passage de l'Imatinib aux ITK 2ème génération est très faible (77).

II.8.1.2.2. 1.Dasatinib (Sprycel®)

Il a une action plus puissante que l'Imatinib et peut provoquer une réponse plus rapide et plus profonde alors que la survie du patient est similaire.

Mécanisme d'action :

Il est également un inhibiteur spécifique de l'activité tyrosine kinase de BCR-ABL. Son activité intrinsèque est 325 fois plus puissante que l'Imatinib, et il se fixe sur les conformations actives et inactives de BCR-ABL, contrairement à l'Imatinib et au Nilotinib. Il conserve son activité contre la plupart des mutations de BCR-ABL sauf T315I (78,79,80)

II.8.1.2.2. 2.Nilotinib (Tasigna®)

Plus puissante et très spécifique que l'Imatinib.

Mécanisme d'action :

Il a une action inhibitrice de BCR-ABL et qui inclut de nombreuses mutations BCR-ABL Imatinib-résistantes, à l'exception de T315I (81).

II.8.1.2.2. 3. Autre ITK :**Bosutinib (Bosulif®)**

Il inhibe également plusieurs mutants BCR-ABL.

Est une autre option de traitement de première intention de la LMC.

A une action plus puissante et peut entraîner une réponse plus rapide et plus profonde que l'Imatinib(81)

Radotinib (Supect®)

Est disponible en tant que traitement de première intention seulement en Corée du Sud.

Une réponse moléculaire considérablement plus élevée a été constatée avec le Radotinib.

Les valeurs des tests de la fonction hépatique sont souvent augmentées avec le Radotinib(81).

II.8.1.2.3. ITK de troisième génération :**II.8.1.2.3.1. Le Ponatinib (Iclusig®)**

Plus puissant que tous les autres ITK, il a été approuvé pour les patients porteurs de la mutation BCR-ABL T315I et pour les patients atteints de LMC résistant à deux ITK ou plus (68).

Mécanisme d'action :

Il est un inhibiteur de la protéine BCR ABL, il possède des éléments structuraux spécifiques qui lui confèrent une forte affinité de liaison à la fois à la protéine BCR ABL et aux formes mutantes de l'ABL kinase. Il inhibe l'activité de la tyrosine-kinase du gène ABL et du mutant ABL T315I(68).

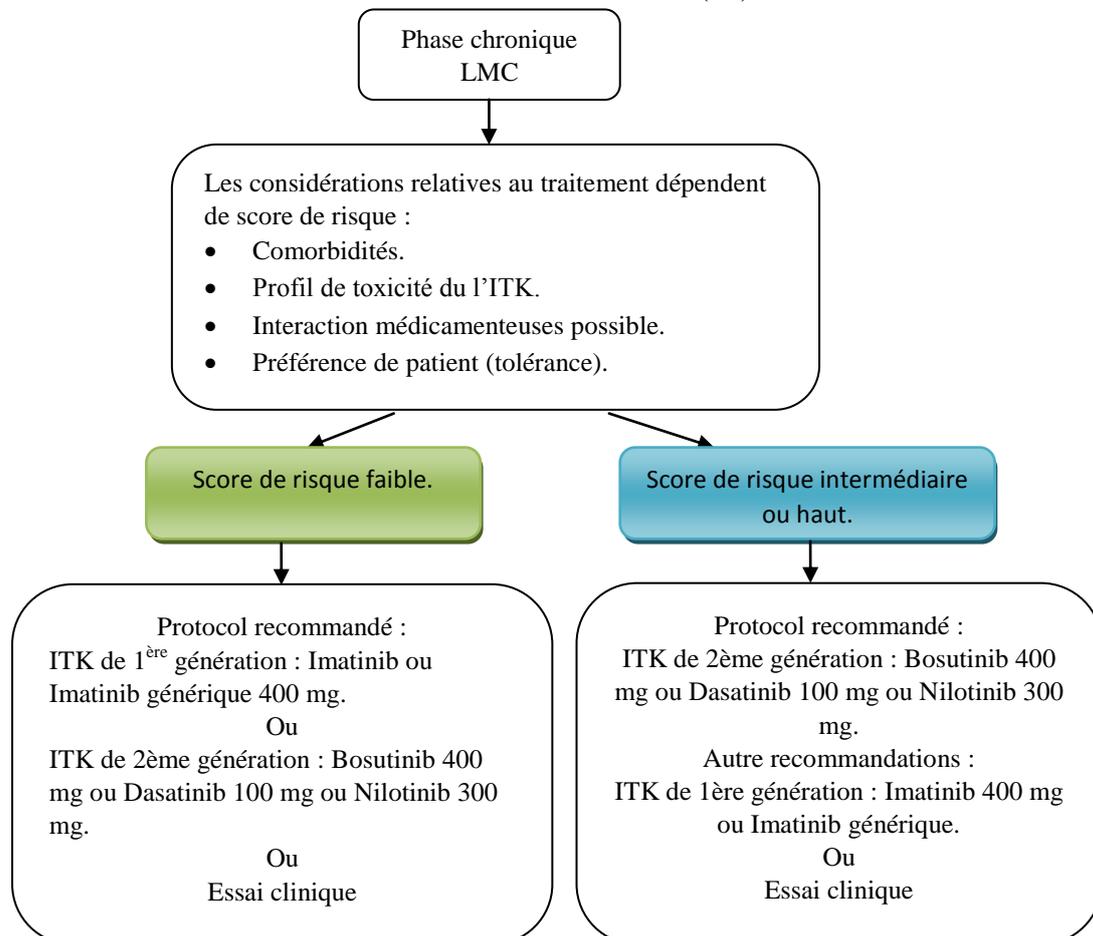
II.9. Stratégie Thérapeutique :

❖ Selon les recommandations internationales (ELN 2020), les ITK indiqués en 1ère ligne de traitement sont ceux de 1ère et de 2ème génération : Imatinib, Dasatinib, Bosutinib, et Nilotinib.

Le choix de l'ITK doit être fait selon :

- Les objectifs du traitement.
- L'âge.
- Des comorbidités.
- Doit prendre en considération le profil de tolérance des médicaments disponibles. (85)

A noter que les recommandations du NCCN 2021 préconisent de privilégier les ITK de 2ème génération (Dasatinib, Bosutinib et Nilotinib) chez les patients avec un score de risque de la maladie intermédiaire ou élevé selon le schéma suivant : (84).



❖ Les ITK autorisés en 1ère ligne peuvent être utilisés en 2ème ligne, le choix se basant sur les mêmes critères qu'en 1ère ligne, ainsi que sur :

- la toxicité de l'ITK utilisé en 1ère ligne
- le statut mutationnel du patient.

De plus, le Ponatinib (un ITK de 3ème génération) peut également être utilisé à partir de la 2ème ligne de traitement, il ne doit pas être prescrit chez les patients ayant des antécédents d'infarctus du myocarde ou d'accident vasculaire cérébral.

❖ En 3ème ligne de traitement et plus, il n'existe pas de recommandation précise sur la stratégie thérapeutique à adopter. En l'absence d'alternative, le choix d'un ITK doit être guidé par le profil de sensibilité des mutations de BCR-ABL.

❖ Selon les recommandations européennes, l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est une option thérapeutique pour :

- les patients atteints de LMC en phase chronique qui ne répondent pas (ou avec une réponse sous-optimale) à au moins deux ITK ou qui sont potentiellement porteurs de la mutation T315I.
- Les patients présentant un risque élevé de transformation doivent également être envisagés pour une allogreffe.
- peut être également une option thérapeutique chez les patients développant une phase avancée pendant le traitement par ITK(85).

Tableau 7 : Recommandations pour le traitement de la LMC en phase chronique.

| Intention de traitement | Quels patients ? | Quel traitement ? |
|---|-----------------------------------|---|
| Première intention | Tous les patients | Imatinib , 400mg une fois par jour ou moins si la MMR est atteinte 300mg, une fois par jour en cas de faible tolérance Dasatinib , 100mg une fois par jour ou éventuellement une dose aussi faible que 50mg une fois par jour Nilotinib , 300mg deux fois par jour Bosutinib , 400mg une fois par jour ou une dose inférieure en cas d'intolérance Radotinib , 300mg deux fois par jour (seulement en Corée du Sud) |
| | Echec ou résistance au traitement | Tout ITK non utilisé en première intention, guidé par l'analyse de la mutation <i>BCR-ABL</i> : par exemple, T315A avec nilotinib , 400mg deux fois par jour ou bosutinib , 500mg une fois par jour |
| Deuxième intention | Intolérance et effets secondaires | Tout ITK non utilisé en première intention, le choix dépend du patient et de la réponse au traitement. Les doses peuvent devoir être adaptées. |
| | Echec ou résistance au traitement | Tout ITK non utilisé en première intention, guidé par l'analyse de la mutation <i>BCR-ABL</i> : par exemple, T315I avec le ponatinib , 45mg une fois par jour ou une dose inférieure en cas de faible tolérance ; une dose inférieure après la réponse initiale ; le ponatinib est également préférable en cas d'échec de la 1re et 2ème intention et si aucune mutation spécifique n'est présente. |
| Troisième intention et intentions ultérieures | Faible réponse à 2 ITK, ou plus | Envisager la greffe de cellules souches |

- ❖ L'hydroxyurée est administrée aux patients symptomatiques en attente de la confirmation de la LMC, l'IFN α en combinaison avec les ITK est une approche récente du traitement de première intention de la LMC.
- ❖ La mention d'intolérance au traitement concerne les effets indésirables, généralement dose dépendant. Ces effets non souhaités, hématologique (anémie, neutropénie, thrombopénie) ou généraux (nausées, vomissements, myalgies, cytolysé hépatique), peuvent nécessiter une adaptation posologique voir un arrêt partiel ou définitif de la molécule concernée.
- ❖ Concernant les autres phases de la maladie, la prise en charge de la phase accélérée est considérée comme proche de la phase chronique à haut risque, de sorte que les ITK restent prioritaires (82).
- ❖ Les stratégies de traitement selon l'ELN de la phase accélérée ou blastique, sont décrites comme suit :
 - Chez un patient diagnostiqué en phase accélérée ou blastique, naïf de tout traitement, les ITK de deuxième génération ou de troisième génération sont en général préférés à l'Imatinib alors que le Nilotinib n'a pas d'indication en phase blastique.

- Les posologies recommandées sont supérieures à celles recommandées en phase chronique :
 - Imatinib : 400 mg × 2/j.
 - Dasatinib : 70 mg × 2/j ou 140 mg × 1/j.
 - Bosutinib ou Ponatinib : 500 mg × 1/j.

A ce stade, la recherche d'un donneur en vue d'une allogreffe doit être faite, et la greffe doit être envisagée chez tous les patients en phase blastique, et tous les patients en phase accélérée en l'absence d'une réponse optimale.

- Les patients sous ITK en première ligne de traitement avec un diagnostic de novo de phase accélérée ont un pronostic meilleur que ceux qui ont évolué d'une phase chronique à une phase accélérée sous traitement. Le taux de survie est de 6-8 ans chez les patients avec un diagnostic de novo en phase accélérée est de 60 à 80 % Chez les patients en phase accélérée, le traitement par ITK peut être maintenu tant qu'est maintenue une RCyC.
- Pour les patients évoluant vers une phase accélérée ou blastique pendant une thérapie par ITK, l'allogreffe de CSH est recommandée pour les patients éligibles car la réponse à tout traitement ultérieur par ITK sera plus faible et moins durable (82). Chez ces patients en association à l'ITK, une chimiothérapie cytotoxique peut être nécessaire pour retrouver un certain degré de rémission afin de permettre une allogreffe de CSH (82).
- En cas de phase blastique non contrôlé et résistante, l'allogreffe n'est pas recommandée (82).

II.10. Réponses au traitement par les inhibiteurs de la tyrosine kinase :

II.10.1. Objectifs thérapeutiques :

Les recommandations ELN de prise en charge de la LMC permettent de définir les objectifs thérapeutiques et une définition précise des réponses au traitement, La réponse aux ITK est le facteur pronostique le plus important. Les recommandations 2020 indiquent la réponse qui doit être obtenue quel que soit l'ITK utilisé.

Depuis l'avènement des ITK, les objectifs visés pour chaque patient sont :

- Une réponse hématologique complète.
- Une réponse cytogénétique complète.
- Une réponse moléculaire majeure.
- Une survie globale de 100 % avec une qualité de vie normale.
- une préservation de la procréation. (85).

II.10.2. Critères de réponse :

Différents critères de réponse au traitement ont été définis en tenant compte des Caractéristiques cliniques et biologiques de la maladie et surtout de son marqueur, le chromosome Philadelphie et son équivalent moléculaire (82 ,83). Ces différents critères sont résumés dans les Tableau et représenté par la figure.

II.10.2.1. Réponse hématologique complète (RHC) :

La numération globulaire est redevenue normale. Les tests sanguins ne montrent aucun globule blanc immature. De même, si la rate était initialement enflée, elle a retrouvé sa taille normale (85).

Tableau 8 : Définitions des réponses hématologiques.

| Type de réponse | Définitions |
|-----------------------|---|
| Réponse hématologique | <ul style="list-style-type: none"> • Complète (RHC) : - Plaquettes < 450 G/L - Leucocytes < 10 G/L - Absence de myélémie - basophiles < 5% - Absence de splénomégalie |

II.10.2.2. Réponse cytogénétique complète (RCyC) :

L’analyse cytogénétique des cellules de la moelle osseuse ne montre pas des cellules portant le chromosome de Philadelphie dans au moins 20 métaphases (la métaphase est une phase du processus de division cellulaire) (85).

Tableau 9 : Définitions de réponse cytogénétique.

| Type de réponse | Définitions |
|--|--|
| Réponses cytogénétiques (% de métaphases Ph1+) | <ul style="list-style-type: none"> • Complète (RCyC) : Ph1+ = 0% • Majeure (RCyM) : Ph1+ ≤ 35% • Partielle (RCyP) : Ph1+ = 1-35% • Mineure (RCym) : Ph1+ = 36-65% • Minime : Ph1+ = 66-95% • Absence : Ph1+ > 95% |

II.10.2.3. Réponse moléculaire :

❖ **Réponse moléculaire majeure (RMM) :**

Le test PCR quantitative peut détecter la présence du BCR-ABL, mais à un niveau inférieur (au-dessous de 0,1%). Ce qui est considéré comme une excellente réponse(85).

❖ **Réponse moléculaire profonde (RM⁴ ou RM^{4.5}) :**

Le test PCR quantitative peut encore détecter le BCR-ABL, mais à un niveau très faible, proche de la limite de détection la plus basse (BCR-ABL inférieur à 0,01% pour la RM⁴ et inférieur à 0,0032% pour la RM^{4.5}) (85).

Tableau 10 : Définitions de réponse moléculaires.

| Type de réponse | Définitions |
|---|--|
| Réponses moléculaires (ratio <i>BCR-ABL1/ABL1</i>) | <ul style="list-style-type: none"> • Majeure (RMM) : $\leq 0,1\%$ (SI) • RM⁴ : $\leq 0,01\%$ (SI) ou un transcrit indétectable avec 10 000 copies <i>ABL1</i> totales • RM^{4,5} : $\leq 0,0032\%$ (SI) ou un transcrit indétectable avec 32 000 copies <i>ABL1</i> totales • RM⁵ : $\leq 0,001\%$ (SI) ou un transcrit indétectable avec 100 000 copies <i>ABL1</i> totales |

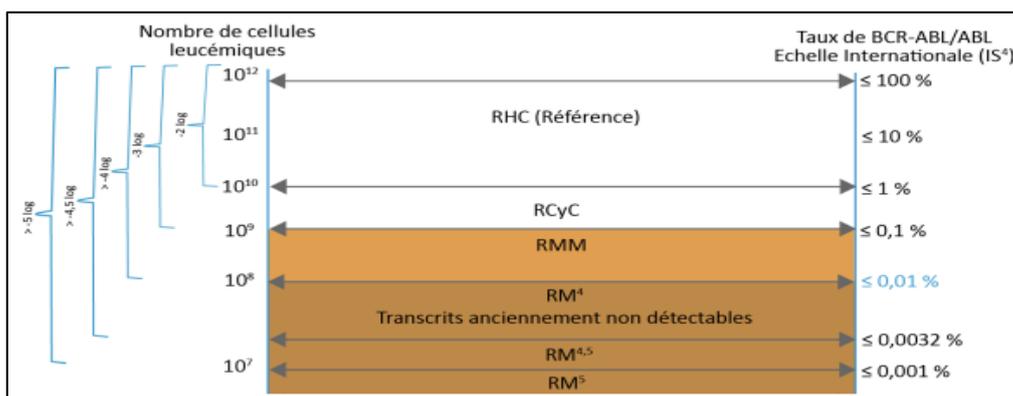


Figure 15: Schéma récapitulatif des réponses souhaitées.

IS : International Scale

II.10.3. Types de réponses au traitement par les inhibiteurs de tyrosine kinase :

L'ELN a défini en fonction du temps, différents niveaux de réponses à atteindre pour être en réponse optimale, en alerte ou en échec (85).

- ❖ **En première ligne de traitement par ITK**, la réponse optimale indique qu'il ne faut pas changer de traitement car est associée à des résultats à long terme équivalant à une survie globale similaire à la population générale. Lorsque les critères de réponses se situent dans la réponse dite en alerte, une surveillance plus particulière est préconisée afin de permettre des changements rapides dans la thérapie en cas d'échec au traitement. La notion d'échec thérapeutique implique une adaptation posologique ou un changement d'ITK (85). (Tableau 11).

Tableau 11 : Définition des critères de réponse aux ITK de 1ère ligne de traitement ELN2020.

| Echéance/Réponse | Optimale | Alerte | Echec |
|--------------------------------|---|--|---|
| A l'instauration du traitement | NA | Risque élevé s'il existe des anomalies cytogénétiques additionnelles | NA |
| A 3 mois | <i>BCR-ABL1</i> (SI) ≤ 10 % et/ou Ph1+ ≤ 35 % | <i>BCR-ABL1</i> (SI) ≥ 10 % et/ou Ph1+ = 36-95 % | Absence de RHC et/ou Ph1+ > 95 % |
| A 6 mois | <i>BCR-ABL1</i> (SI) ≤ 1 % et/ou Ph1+ = 0 % | <i>BCR-ABL1</i> (SI) 1-10 % et/ou Ph1+ = 1 - 35 % | <i>BCR-ABL1</i> (SI) > 10 % et/ou Ph1+ > 35 % |
| A 12 mois | <i>BCR-ABL1</i> (SI) ≤ 0,1% (RMM) | <i>BCR-ABL1</i> (SI) > 0,1 – 1 % | <i>BCR-ABL1</i> (SI) > 1 % et/ou Ph1+ > 0 % |
| Ultérieurement | RMM | Anomalies cytogénétiques additionnelles (ACA)/Ph1- | Perte de RHC ou RCC, perte de RMM, mutation, anomalies cytogénétiques additionnelles (ACA)/Ph1+ |

❖ Pour les patients en seconde ligne de traitement, après échec de l'Imatinib, des critères de réponses ont également été définis (Tableau 12).

Tableau 12 : Définition de la réponse au traitement de 2ème ligne après échec de l'Imatinib. ELN.

| Echéance/Réponse | Optimale | Alerte | Echec |
|--------------------------------|--|---|---|
| A l'instauration du traitement | NA | Absence de RHC ou perte de RHC sous Imatinib ou absence de RCC sous ITK 1ère ligne ou haut risque | NA |
| A 3 mois | <i>BCR-ABL1</i> (SI) ≤ 10 % et/ou Ph1+ < 65 % | <i>BCR-ABL1</i> (SI) > 10 % et/ou Ph1+ = 66 - 95 % | Absence de RHC ou Ph1+ > 95 % ou nouvelles mutations . |
| A 6 mois | <i>BCR-ABL1</i> (SI) ≤ 1 % et/ou Ph1+ < 35 % | Ph1+ = 36-65 % | <i>BCR-ABL1</i> (SI) > 10 % et/ou Ph1+ > 65 % et/ou nouvelles mutations |
| A 12 mois | <i>BCR-ABL1</i> (SI) ≤ 1 % et/ou absence de Ph1+ | <i>BCR-ABL1</i> (SI) = 1 – 10% et/ou Ph+ = 1-35 % | <i>BCR-ABL1</i> (SI) > 10 % et/ou Ph1+ > 35 % et/ou nouvelles mutations |
| Ultérieurement | <i>BCR-ABL1</i> (SI) < 0,1 % (RMM) | Anomalies cytogénétiques additionnelles (ACA)/Ph1- ou <i>BCR-ABL1</i> > 0,1 % | Perte de RHC ou perte de RCC ou RCyP, perte confirmée de RMM, nouvelles mutations, anomalies cytogénétiques additionnelles (ACA)/Ph1+ . |

II.11. Suivi des patients traités par les ITK :

II.11.1. Suivi clinique :

État général, douleur, pesée régulière pour contrôler toute prise de poids due à une rétention hydrique (86).

II.11.2. Suivi biologique :

- ❖ NFS : toutes les semaines le premier mois du traitement par Imatinib, puis tous les 15 jours le deuxième mois, puis mensuellement, (86) En cas de neutropénie ou de thrombopénie sévères, le traitement sera adapté en fonction de la NFS (87).
- ❖ Bilan hépatique : (transaminases phosphatases alcalines [PAL], bilirubine) toutes les semaines le premier mois, puis une fois par mois (86).
- ❖ Surveillance de la thyroïde mensuelle en début de traitement (86).

II.11.3. Suivi moléculaire :

- ❖ La quantification des ARNm BCR-ABL s'est largement standardisé. Afin de gagner encore en sensibilité, de nouvelles technologies sont en cours de développement comme la PCR digitale.
- ❖ La recherche de mutations du domaine kinase de BCR-ABL permet d'objectiver une résistance à un ITK et d'adapter le traitement de façon optimale. L'utilisation du séquençage haut débit (NGS) devrait faciliter la détection et le suivi des clones mutés.

II.11.3.1. La RQ-PCR :

Est la méthode de référence pour le suivi des patients atteints de LMC.

Cependant, elle ne semble pas optimale pour le suivi de la maladie résiduelle en raison de sa limite inférieure de détection estimée à 0.01% et de quantification, ce qui peut être insuffisant pour surveiller la RMM au moment et pendant l'arrêt du traitement (88).

II.11.3.2. La RT-PCR digitale :

La PCR digitale (ou numérique) permet la quantification absolue des acides nucléiques sans avoir recours à une courbe standard.

La RT-PCR digitale pourrait constituer un nouvel outil moléculaire non seulement pour la quantification des transcrits BCR-ABL et le suivi de la maladie résiduelle mais également pour l'identification des patients à risque plus élevé de rechute moléculaire pour inefficacité (55).

II.11.3.3. Détection des mutations par le séquençage de nouvelle génération NGS :

Le séquençage de nouvelle génération (NGS) permet de détecter des mutations de bas niveau du domaine de la kinase BCR-ABL ainsi que des mutations de résistance dans des gènes autres que BCR-ABL qui peuvent conférer une résistance aux ITK ou laisser présager une maladie progression (55).

II.12. La rémission :

Les patients qui ont bien répondu au traitement avec les ITK et qui ont maintenu une réponse moléculaire profonde sur une longue période peuvent ne plus avoir besoin du traitement par ITK.

Conformément aux recommandations de l'ELN, les critères suivants doivent être remplis avant l'arrêt du traitement :

- Le patient est en première phase chronique de la LMC.
- Le patient souhaite arrêter le traitement et communique bien.

- Le patient a accès à une PCR quantitative de grande qualité avec des résultats de tests rapidement disponibles.
- Le patient accepte un suivi plus fréquent après l'arrêt du traitement. Cela signifie, mensuellement pendant les 6 premiers mois ; tous les 2 pendant les mois 6 – 12 mois, et ensuite tous les 3 mois.

Par ailleurs, avant l'arrêt du traitement, les critères minimum suivants doivent être remplis :

- Le patient prend l'ITK actuel en première intention ou en deuxième intention si l'intolérance était la seule raison de changer d'ITK.
- Le patient a des transcriptions atypiques du BCR-ABL.
- Le patient a reçu un ITK pendant plus de 5 ans (ou plus de 4 ans avec un ITK de deuxième génération).
- Le patient a été en réponse moléculaire profonde (MR⁴ ou mieux) pendant plus de 2 ans.
- Le patient n'a pas eu un échec à un traitement antérieur.

Les critères supplémentaires de l'arrêt du traitement sont considérés comme optimaux si :

- Le patient a reçu un traitement par ITK pendant plus de 5 ans.
- Le patient a été en réponse moléculaire profonde pendant plus de 3 ans si MR⁴.
- Le patient a été en réponse moléculaire profonde pendant plus de 2 ans si MR^{4.5}.

Dans les études cliniques, la maladie revient chez 50% des patients après l'arrêt de l'ITK. Cela se produit en particulier dans les 6 à 8 mois. C'est pourquoi des tests moléculaires fréquents sont très importants pendant la première année de l'arrêt du traitement.

Les patients devraient, par conséquent, être suivis tous les 3 mois à vie pour éviter que la progression de la maladie passe inaperçue. Les patients à récurrence moléculaire peuvent en générale recommencer le traitement par ITK. La plupart de ces patients (90% - 95%) atteignent alors à nouveau des niveaux indétectables de maladie (85).

II.13. La résistance aux ITK :

La résistance aux ITK représente l'une des principales limites dans la prise en charge thérapeutique de la LMC. Les causes de résistance sont multifactorielles. C'est avec l'Imatinib qu'elles ont été le plus étudiées. On peut distinguer deux grands types de mécanismes :

❖ mécanismes BCR-ABL dépendants :

- Surexpression du gène BCR-ABL.
- Mutations du domaine ABL-kinase interférant avec la liaison de l'ITK.

❖ mécanismes BCR-ABL1 indépendants :

- mauvaise observance.

- interactions médicamenteuses.
- modification de la pharmacocinétique conduisant à une sous-exposition : faible absorption intestinale, taux de transporteurs réduits (hOCT1), taux de transporteurs d'efflux augmentés (ABCB1, ABCG2).
- modifications biologiques : hétérogénéité des cellules LMC, cellules souches quiescentes, évolution clonale, surexpression des SRC.

Les mutations représentent la cause la plus fréquente de résistance aux ITK, elles sont détectées chez pratiquement 50 % des patients en échec ou en progression.

Plus de 100 mutations fausses sens ont été impliquées dans des résistances plus ou moins importantes à l'Imatinib. Les ITK de deuxième génération (Dasatinib, Nilotinib, Bosutinib) sont en général actifs sur les clones Imatinib-résistants et justifient leur intérêt en deuxième ligne. Seule la mutation T315I confère une résistance à l'ensemble des ITK à l'exception du Ponatinib (85).

DEUXIEME PARTIE : PRATIQUE

I. Matériel et méthode :**I.1. Les patients :** (Annexe 1)

Il s'agit d'une étude rétrospective de type descriptif conduit sur les dossiers de 13 patients atteints de la leucémie myéloïde chronique suivi au niveau de service d'hématologie et le laboratoire centrale de l'établissement hospitalier spécialisé en lutte contre le cancer Blida (EHS CAC Blida). Les patients inclus ont été sélectionnée selon les critères suivants :

- tous les patients avec une LMC confirmé en phase chronique quelle que soit l'âge et le sexe.
- Les patients chez qui le test PCR est positif au moment de diagnostic ou au monitoring.

On a exclus tous les malades leur test PCR est négatif.

I.2. Matériel :**I.2.1. Les automates :** Nous avons utilisé : (Annexe 2)**❖ Analyseurs de numération formule sanguine FNS (SYSMEX XT-4000i) :**

Un automate qui effectue une analyse qualitative et quantitative sur les trois types de cellules composant le sang : les globules rouges (érythrocytes), les globules blancs (leucocytes) et les plaquettes (thrombocytes). Certains paramètres liés à ces éléments sont mesurés (taux d'hémoglobine, volume globulaire moyen = VGM) et d'autres sont calculés (hématocrite, teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine = TCMH, concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine = CCMH).

❖ Spectrophotomètre (SpectraMax® Quick Drop™) :

Le spectrophotomètre à microvolume permet de quantifiée de très petites quantités d'ARN, il permet de mesurer des volumes de 0,5 µL d'échantillon, il possède une plage d'absorbance (190 nm – 1100 nm). La concentration d'ARN est déterminée en mesurant leur absorbance, elle est mesurée à 260nm.

❖ Le système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™:

Le système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™ (système StepOne™) s'appuie sur le principe de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Il utilise des réactifs PCR basés sur le principe de la fluorescence. Cet automate permet l'identification et la quantification du type de transcrit des patients.

Pendant la PCR, le système StepOne collecte les données de fluorescence brutes en plusieurs points, chaque point de collecte de données ou lecture comporte trois phases :

1. Excitation : L'instrument StepOne™ illumine tous les puits de la plaque, ce qui excite les fluorophores dans chaque réaction.

2. Émission : L'optique de l'instrument StepOne collecte la fluorescence résiduelle émise par les puits de la plaque de PCR. L'image résultante, recueillie par le dispositif, est uniquement composée de la lumière correspondant à l'intervalle des longueurs d'ondes d'émission.

3. Collecte : L'instrument StepOne crée une représentation numérique de la fluorescence résiduelle recueillie sur une période déterminée. Le logiciel StepOne™ conserve l'image fluorescente brute en vue de l'analyse.

Après une réaction de PCR, le logiciel StepOne utilise les données de calibration (spatiale, spectrale et du bruit de fond) pour déterminer l'emplacement et l'intensité des signaux fluorescents à chaque lecture, le fluorophore associé à chaque signal fluorescent et l'amplitude du signal.

Autre :

- agitateur rotatoire.
- centrifugeuses.
- Les micropipettes.
- Microscope optique.
- Embouts bleus et jaunes.
- Eppendorfs.
- Gants stériles.
- Portoirs.

I.3. Méthode :

On a suivi les étapes suivantes :

I.3.1. Récolte de l'échantillon :

• **Prélèvement sanguin :**

Des prélèvements sanguins de 4 ml sont réalisés dans des conditions stériles sur des tubes EDTA.

I.3.2. Traitement des échantillons :

Au début, nous avons effectué :

▪ **Une formule de numération sanguine FNS :**

Est un examen qui consiste à prélever un échantillon de sang, permet d'analyser les cellules sanguines d'une manière quantitative et qualitative.

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

Frottis sanguins : Cet examen sanguin permet d'évaluer l'aspect (forme, taille, couleur) et le nombre des cellules sanguines à partir d'un échantillon de sang prélevé.

➤ **Réalisation du frottis sanguin :**

- Prélever un échantillon de sang à partir d'une pique sur le doigt (ou par prélèvement sanguin sur tube EDTA).
- Déposer une goutte de sang à 1 cm de l'extrémité de la lame.
- Faire glisser la seconde lame à étalement incliné de 45° la goutte de sang jusqu'à la toucher.
- Laisser s'étaler la goutte de sang le long de l'arrêt de la lame à étalement.
- Laisser sécher le frottis.
- La coloration du frottis sanguin :
 1. Coloration au May Grunwald.
 2. Coloration au Giemsa.
 3. Rinçage par l'eau distillée et séchage à l'air au moins 5 min.

➤ **Etude microscopique du frottis sanguin :** réaliser par un microscope optique.

▪ **La RT-PCR :** (Annexe 3)

1. Extraction de l'ARN : l'extraction des ARN totaux à partir des globules blancs.

2. REVERS TRANSCRIPTION : la transformation de l'ARN en son ADN complémentaire (ADNc) grâce à une transcriptase inverse.

3. PCR qualitative : l'amplification par PCR de l'ADNc.

4. Analysez les résultats :

L'analyse des données des tests d'expression génique:

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

I.3.3. Collecte des données :

Une fiche de renseignement a été remplie pour chaque patient par le médecin traitant incluant les informations suivantes : (Annexe 4)

- Renseignement de patient (nom, prénom, date de naissance, l'âge, sexe, région d'origine).
- Les antécédents personnels, médicaux, chirurgicaux, cancer familial.

- Circonstance de découvertes, délai de diagnostic.
- Les différentes manifestations cliniques, biologiques et biochimiques.
- L'examen demandé (recherche les transcrit BCR-ABL).
- Bilan préthérapeutique (phase de la maladie, score pronostique, traitement)
- Evaluation de la maladie (3 mois, 6 mois, 12 mois...).

I.3.4. Répartition de la population :

Au cours de notre étude nous avons subdivisé notre population en 2 groupes d'individus selon leur types de transcrit :

- ❖ 1^{er} groupe : les patients possèdent les types de transcrit suivants :
 - B2a2 seul.
 - B2a2 + b3a2.
- ❖ 2^{ème} groupe : les patients possèdent les types de transcrit suivants :
 - B2a2 seul.
 - B2a2 + e1a2.

I.3.5. traitement statistique des résultats :

- ❖ Le traitement des résultats et la réalisation des graphiques s'est fait par SPSS.20 et Excel.
- ❖ Les caractéristiques des patients ont été décrites sous forme de pourcentage, moyenne et écart type.
- ❖ Pour toutes les analyses, $p \leq 0,05$ a été considéré comme statistiquement significatif :
 - Pour les variables quantitatives : on a utilisé test de student.

Résultats

II. Résultats :

II.1. Description de la population :

Nous avons consulté au totale 13 dossiers de patients suivi au niveau de service d'hématologie de l'établissement hospitalier spécialisé en lutte contre le cancer Blida (EHS CAC Blida).ces patients ont réalisé la RT-PCR au niveau de laboratoire centrale, dont 7 patients ont fait leurs test PCR au moment de diagnostic et 6 malades ont fait leurs test PCR au monitoring .

II.1.1. Répartition des patients en fonction de l'âge:

L'âge moyen était de 51,62 ans avec un écart type de 11,66 ans ($51,62 \pm 11,66$) et des extrêmes allant de 20 à 64 ans. Un maximum de fréquence était observé dans la tranche d'âge comprise entre 30 et 60 ans (62%).

❖ Répartition des patients selon la tranche d'âge :

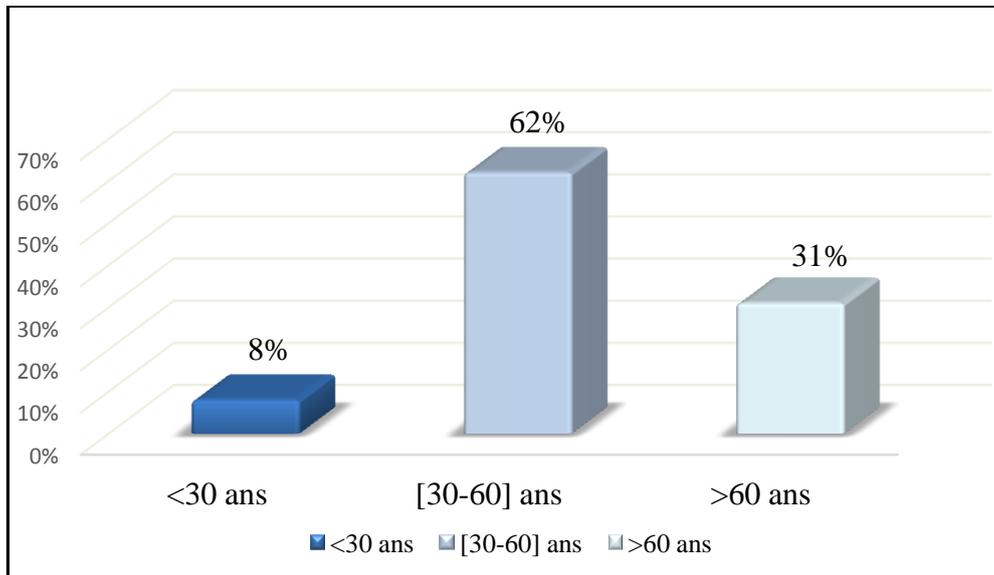


Figure 16 : Répartition des patients selon la tranche d'âge.

II.1.2. Répartition des patients en fonction de sexe :

Sur les 13 patients étudiés, Les patients de sexe féminin étaient majoritaires avec 9 patients (69%) et les patients de sexe masculin ont représenté 4 patients (31%) soit un sexe ratio (F/H) de 2,25.

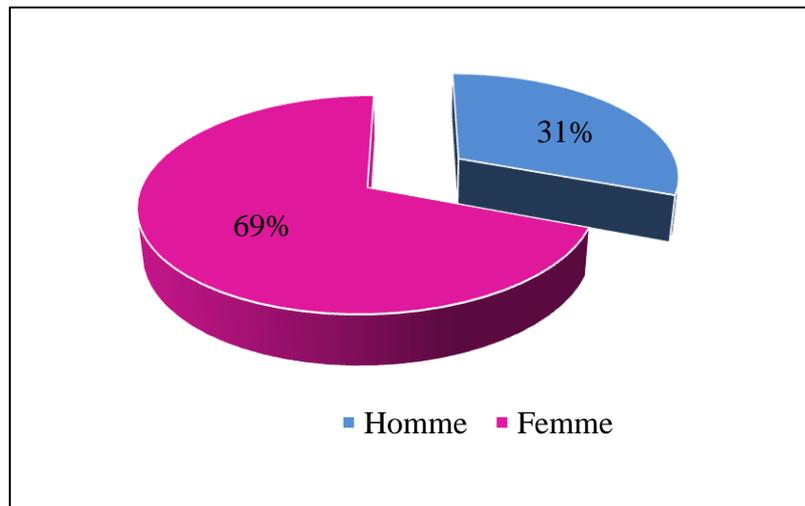


Figure 17 : Répartition des patients en fonction de sexe.

II.1.3. Origine :

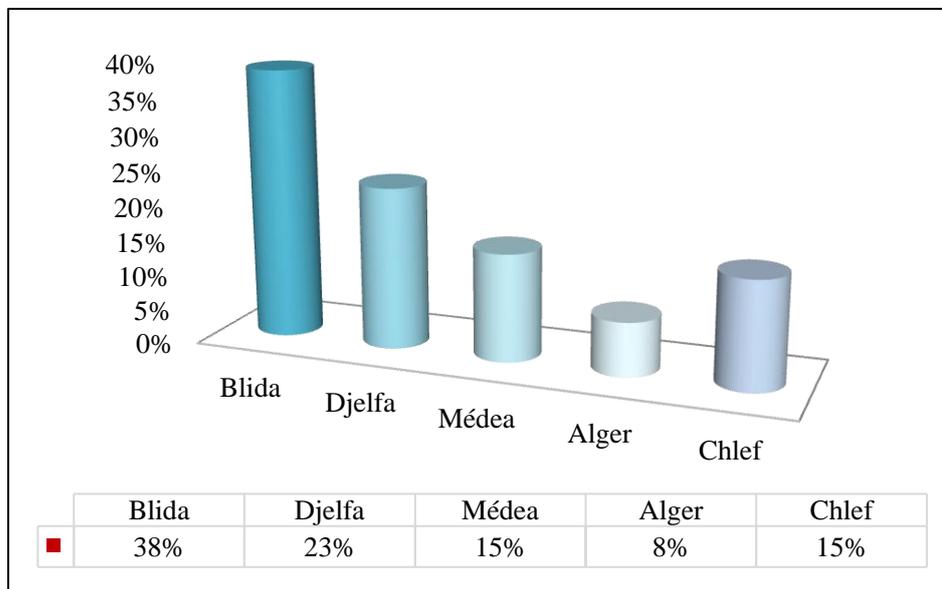


Figure 18 : Répartition des patients selon leur origine.

Les wilayas les plus touchées étaient : Blida (38%), Djelfa (23%).

II.2. Résultats clinico-biologiques au moment de diagnostic :

II.2.1. Circonstances de découverte :

Dans notre échantillon, parmi les circonstances de découverte :

La présence de la splénomégalie (SPM) chez 85% des cas, syndrome anémique présente chez 54% des cas, une hyperleucocytose chez 31% des cas, l'asthénie chez 23%.

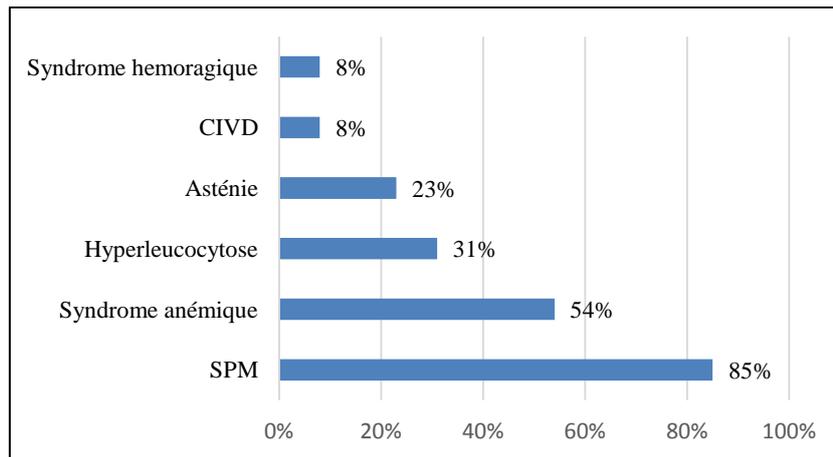


Figure 19 : Répartition des patients selon les circonstances de découverte.

II.2.2. Les antécédents médicaux :

Plus de 50 % des malades de notre série avaient des antécédents pathologiques dont :

- Une hypertension artérielle (HTA) présente chez 5 patients (38%).
- Le diabète présente chez 2 patients (15%).
- Néoplasie de sein présente chez 1 patient (8%).
- Une allergie présente chez 1 patient (8%).
- Goitre présente chez 1 patient (8%).
- Une cardiopathie présente chez 1 patient (8%).
- Une asthénie présente chez 1 patient (8%).

II.2.4. Hémogramme au moment de diagnostic :

II.2.4.1. FNS :

❖ Les leucocytes :

Hyperleucocytose a été observée chez tous nos patients au moment de diagnostic avec un taux moyen $198,75 \cdot 10^3 \text{ élém/mm}^3$ ($\pm 168,71 \cdot 10^3$) et des extrêmes allant de $16,23 \cdot 10^3$ à $499,61 \cdot 10^3 \text{ élément/mm}^3$.

❖ Les globules rouges :

Chez nos patients le nombre moyen des globules rouges était de $3,59 \cdot 10^6/\mu\text{l}$ ($\pm 0,68$) avec des extrêmes allant de $4,30$ à $2,40 \cdot 10^6/\mu\text{l}$.

Tableau 13 : Répartition des patients en fonction du nombre de GB et GR.

| | Effectifs | Moyenne | Écart type | Max | Min |
|---|-----------|---------|------------|--------|-------|
| GB 10 ³ élém/mm ³ | 13 | 198,75 | 168,71 | 499,61 | 16,23 |
| GR 10 ⁶ /μl | 13 | 3,59 | 0,68 | 4,30 | 2,40 |

❖ **Le taux des plaquettes :****Tableau 14** : Répartition des patients selon le taux de plaquettes au moment de diagnostic.

| Taux de plaquettes (élém/mm ³) | <100.000 | [100.000-450.000] | > 450.000 |
|---|----------|-------------------|-----------|
| Effectifs | 0 | 11 | 2 |
| Pourcentages % | 0 | 84.61 | 15.38 |

Notre série présente un taux moyen de plaquettes de 296346,15 élément/l (\pm 172798,94) et des extrêmes allant de 757000 à 117500 élément/l dont :

84,61 % des patients ont eu un taux de plaquettes normales, 15,38 % ont présenté une thrombocytose et aucun patient n'a présenté une thrombopénie.

❖ **L'hémoglobine :**

Chez nos patients le taux moyen d'hémoglobine était de 10,54 g/dl (\pm 1,82) avec des extrêmes allant de 12,60 à 7,10 gr/dl. D'après le taux d'hémoglobine de nos patients :

8 patients (51,5%) ont eu une anémie et 5 patients (38,5%) présentent l'absence d'une anémie.

II.2.4.2. Frottis sanguin :

L'analyse du frottis sanguin a montré chez nos patients une myélémie avec un taux moyen de 36 % avec des extrêmes allant de (23 à 55 %).

❖ **Blastes :**

Chez nos patients le taux moyen des blastes étaient de 2 % (\pm 1,87) avec des extrêmes allant de (0 à 5%) dont : 11 patients avaient un taux de blastes inférieur à 5 % et 2 patients avaient un taux de blastes égale à 5%.

❖ **Phase de la maladie :**

Tous les 13 (100%) patients de notre étude, ont été diagnostiqués en phase chronique.

II.2.5. Score pronostique :

Selon la classification de Sokal : 38 % des patients ont eu un faible risque, 46 % ont eu un risque intermédiaire et 15 % ont eu un haut risque.

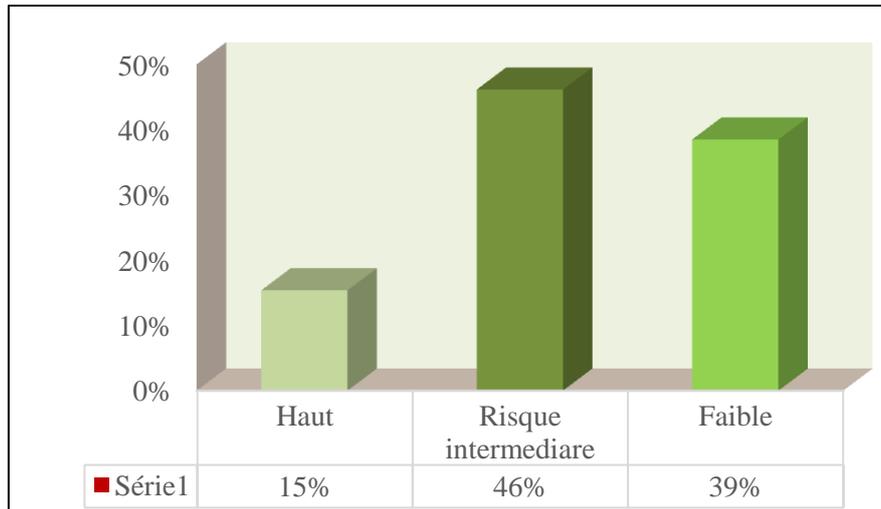


Figure 20 : Répartition des patients selon la classification pronostique de Sokal.

II.2.6. Résultats de la cytogénétique :**II.2.6.1. Fish / caryotype :**

- Le test caryotype était réalisé systématiquement chez les 12 patients, qui a confirmé la présence de la translocation (9,22) (q34, q11) chez 4 patients (30,77%).
- Le test cytogénétique Fish était réalisé pour 8 patients (61,54%), qui a confirmé la présence du signal de fusion BCR-ABL.
- Aucun des deux tests n'était réalisé chez un seul patient (7,69 %).

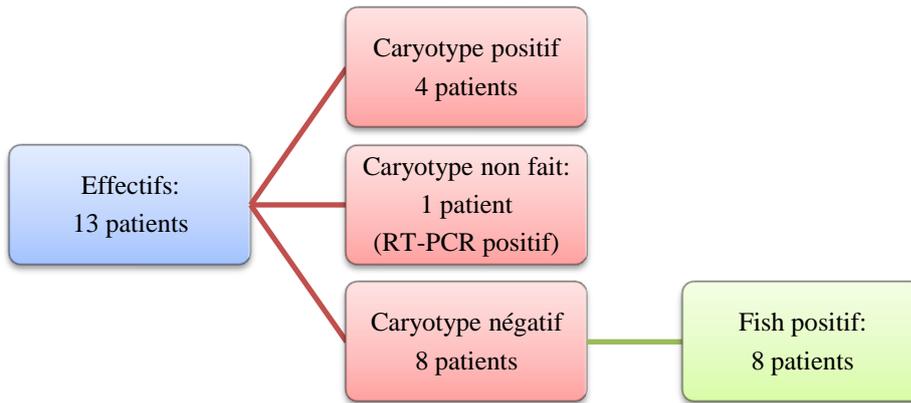


Figure 21 : Répartition des patients selon les résultats de caryotype et Fish.

II.2.7. Résultats de la biologie moléculaire :

II.2.7.1. RT-PCR :

Dans notre population 7 (53,85%) patients qui ont fait leurs tests PCR au moment de diagnostic et 6 (46,15%) qui ont fait leurs tests PCR au monitoring.

Tableau 15 : Répartition des patients selon le moment de réalisation de la RT-PCR.

| Moment de réalisation de la RT-PCR. | | |
|-------------------------------------|---------------|---------------|
| | Au diagnostic | Au monitoring |
| Effectifs | 7 | 6 |
| Pourcentages % | 53,85 | 46,15 |

II.2.7.1.1. Type de transcrit :

La RT-PCR réalise pour les patients de notre population a donné les résultats suivantes selon la région de rupture BCR :

- 9 patients (69,23%) possèdent le transcrits M BCR-ABL majoritaire.
- 4 patients (30,77%) possèdent le transcrits M BCR-ABL + m BCR-ABL.
- Aucun patient n'a présenté le type μ BCR-ABL.

Tableau 16 : Répartition des patients selon type de transcrit.

| | Type de transcrit | | |
|----------------|-------------------|-----------------------|---------------|
| | M BCR-ABL | M BCR-ABL + m BCR-ABL | μ BCR-ABL |
| Effectifs | 9 | 4 | 0 |
| Pourcentages % | 69,23 | 30,77 | 0 |

II.2.7.1.2. les variants de transcriptions:

la RT-PCR a permis d'identifier les types de transcrit des patients dont :

- 5 patients (38,47%) possèdent le type b2a2 prédominance.
- 4 patients (30,77%) possèdent le type b2a2+ b3a2.
- 2 patients (15,38%) possèdent le type b2a2 + e1a2.
- 2 patients (15,38%) possèdent le type b2a2+ b3a2+ e1a2.

Tableau 17 : Répartition des patients selon les variants de transcriptions.

| | Type de transcrit | | | |
|---------------|-------------------|-------------|-------------|--------------------|
| | b2a2 | b2a2 + b3a2 | b2a2 + e1a2 | b2a2 + b3a2 + e1a2 |
| Effectifs | 5 | 4 | 2 | 2 |
| Pourcentage % | 38,47 | 30,77 | 15,38 | 15,38 |

II.3. Corrélation des différents types de transcrit avec les paramètres de l'hémogramme au moment de diagnostic :

✚ Pour le 1^{er} groupe (b2a2/ b2a2+b3a2) :

Tableau 18 : Corrélation des différents types de transcrit avec les paramètres de l'hémogramme au moment de diagnostic pour le 1^{er} groupe (b2a2/ b2a2+b3a2).

| | Moyenne ± Ecart type | | |
|--|----------------------|-----------------|--|
| | b2a2 | b2a2+b3a2 | P |
| Effectifs | 7 | 6 | |
| Leucocytes 10 ³ élém/mm ³ | 196,01 ± 199,31 | 201,96 ± 143,59 | P= 0,95 Différence non Significative |
| Plaquettes 10 ³ élém/μl | 261,21 ± 126,86 | 337,33 ± 220,46 | P= 0,45 Différence non Significative |
| Hémoglobine g/dl | 10,54 ± 2,31 | 10,53 ± 1,21 | P= 0,99 Différence non Significative |
| GR 10 ⁶ / μl | 3,69 ± 0,74 | 3,47 ± 0,63 | P= 0,57 Différence non Significative |

❖ Les leucocytes :

On n'a pas trouvé une corrélation entre le type de transcrit et le nombre de GB au moment de diagnostic pour le 1^{er} groupe (b2a2/ b2a2+b3a2), p=0,95 dont :

La moyenne des GB au moment de diagnostic était respectivement $196,01 \cdot 10^3$ élém/mm³ ($\pm 199,31 \cdot 10^3$) pour le type de transcrit b2a2 seul et $201,96 \cdot 10^3$ élém/mm³ ($\pm 143,59 \cdot 10^3$) pour b2a2+b3a2.

❖ Le taux des plaquettes :

On n'a pas trouvé une corrélation entre type de transcrit et le taux de plaquettes au moment de diagnostic pour 1^{er} groupe (b2a2 / b2a2+b3a2), p=0,45 dont :

La moyenne le taux de plaquettes au moment de diagnostic était respectivement $261,21 \cdot 10^3$ élém/ μ l ($\pm 126,86 \cdot 10^3$) pour le type de transcrit b2a2 seul et $337,33 \cdot 10^3$ élém/ μ l ($\pm 220,46 \cdot 10^3$) pour b2a2+b3a2.

❖ L'hémoglobine :

On n'a pas trouvé une Corrélation entre type de transcrit et taux d'hémoglobine au moment de diagnostic pour 1^{er} (b2a2 / b2a2+b3a2), p=0,45 dont :

La moyenne le taux d'hémoglobine au moment de diagnostic était respectivement 10,54 g/dl ($\pm 2,31$) pour le type de transcrit b2a2 seul et 10,53 g/dl ($\pm 1,21$) pour b2a2+b3a2.

❖ Les globules rouges :

On n'a pas trouvé une corrélation entre le type de transcrit et le nombre de GR au moment de diagnostic pour le 1^{er} groupe (b2a2/ b2a2+b3a2), p=0,57 dont :

La moyenne des GR au moment de diagnostic était respectivement $3,69 \cdot 10^6$ / μ l ($\pm 0,74$) pour le type de transcrit b2a2 seul et $3,47 \cdot 10^6$ ($\pm 0,63$) pour b2a2+b3a2.

✚ Pour le 2^{ème} groupe (b2a2/ b2a2+e1a2) :

Tableau 19 : Corrélation des différents types de transcrit avec les paramètres de l'hémogramme au moment de diagnostic pour le 2^{ème} groupe (b2a2/ b2a2+e1a2).

| | Moyenne ± Ecart type | | |
|--|----------------------|-----------------|--|
| | b2a2 | b2a2+e1a2 | P |
| Effectifs | 9 | 4 | |
| Leucocytes 10³ élém/mm³ | 158,89 ± 179,52 | 227,71 ± 162,17 | P= 0,69 Différence non Significative |
| Plaquettes 10³ élém/μl | 334 ± 184,87 | 211,62 ± 120,29 | P= 0,25 Différence non Significative |
| Hémoglobine g/dl | 10,16 ± 1,90 | 11,37 ± 1,47 | P= 0,28 Différence non Significative |
| GR 10⁶/ μl | 3,61 ± 0,65 | 3,54 ± 0,82 | P= 0,68 Différence non Significative |

❖ **Les leucocytes :**

On n'a pas trouvé une corrélation entre le type de transcrit et le nombre de GB au moment de diagnostic pour le 2^{ème} groupe (b2a2/ b2a2+e1a2), p=0,69 dont :

La moyenne des GB au moment de diagnostic était respectivement $158,89 \cdot 10^3$ élém/mm³ ($\pm 179,52 \cdot 10^3$) pour le type de transcrit b2a2 seul et $227,71 \cdot 10^3$ élém/mm³ ($\pm 162,17 \cdot 10^3$) pour b2a2+e1a2.

❖ **Le taux des plaquettes :**

On n'a pas trouvé une corrélation entre type de transcrit et le taux de plaquettes au moment de diagnostic pour 2^{ème} groupe (b2a2 / b2a2+e1a2), p=0,25 dont :

La moyenne le taux de plaquettes au moment de diagnostic était respectivement $334 \cdot 10^3$ élém/μl ($\pm 184,87 \cdot 10^3$) pour le type de transcrit b2a2 seul et $211,62 \cdot 10^3$ élém/μl ($\pm 120,29 \cdot 10^3$) pour b2a2+e1a2.

❖ L'hémoglobine :

On n'a pas trouvé une Corrélation entre type de transcrit et taux d'hémoglobine au moment de diagnostic pour 2^{ème} groupe (b2a2 / b2a2+e1a2), $p=0,28$ dont :

La moyenne le taux d'hémoglobine au moment de diagnostic était respectivement 10,16 g/dl ($\pm 1,90$) pour le type de transcrit b2a2 seul et 11,37 g/dl ($\pm 1,21$) pour b2a2+e1a2.

❖ Les globules rouges :

On n'a pas trouvé une corrélation entre le type de transcrit et le nombre de GR au moment de diagnostic pour le 2^{ème} groupe (b2a2/ b2a2+e1a2), $p=0.57$ dont :

La moyenne des GR au moment de diagnostic était respectivement $3,61.10^6 / \mu\text{l}$ ($\pm 0,65$) pour le type de transcrit b2a2 seul et $3,47.10^6$ ($\pm 0,82$) pour b2a2+e1a2.

II.4. Traitement :

II.4.1. Traitement ciblé :

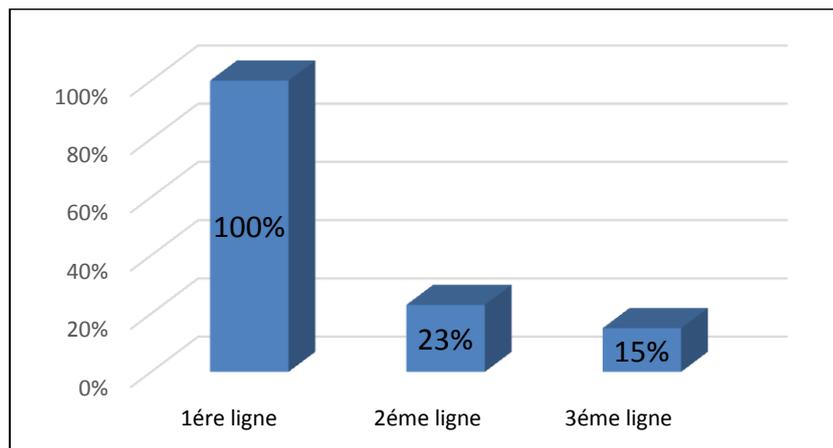


Figure 22 : Répartition des patients selon le traitement.

ITK de première ligne :

La totalité des patients dans notre étude (100%) ont été mis initialement sous Imatinib 400mg pour une durée moyenne de 37 mois et des extrêmes allant de 3 à 151 mois pour 12 patients et une durée de 20 jours pour un seul patient qu'on a considéré comme un cas particulier.

ITK de deuxième ligne :

Le passage au traitement par Nilotinib avec une dose de 800mg a été effectué chez 3 patients (23%), pour une intolérance à l'Imatinib chez 1 patient et suite à un échec thérapeutique chez 2 patients. La durée moyenne de mise sous Nilotinib était de 9 mois chez 2 patients avec des extrêmes allant de 6 à 12 mois et une durée de 7 jours pour le même patient (le cas particulier).

ITK de troisième ligne :

Suite à un échec du Nilotinib, 2 patients ont été mis sous Dasatinib à une dose de 50 mg pour une durée de 40 mois pour le premier patient, Nous avons noté une bonne observance thérapeutique chez le deuxième patient avec le Dasatinib (le cas particulier).

II.4.2. Arrêt du traitement :

Dans notre série, 2 patients ont été bénéficié d'un arrêt de traitement.

II.5. Corrélation des paramètres de l'hémogramme avec les différents types de transcrit après traitement :❖ **Les leucocytes :**✚ **Pour le 1^{er} groupe (b2a2/ b2a2+b3a2) :****Tableau 20 :** Corrélation entre le type de transcrit et le nombre de GB pour 1^{er} groupe.

| | Effectif | Moyenne 10 ³ élém/mm ³ | Ecart type 10 ³ | P |
|------------------------------|----------|---|-------------------------------|---|
| b2a2 | | | | |
| GB diagnostic GB de 3mois | 6 | 152,01 6,29 | 177,22 36,54 | P=0,1 différence non significative |
| GB de 3mois GB de 6mois | 5 | 6,89 6,52 | 3,74 2,68 | P=0,68 différence non significative |
| GB de 6mois GB de 12mois | 3 | 5,61 6,67 | 2,61 2,46 | P=0,008 différence significative |
| b2a2 + b3a2 | | | | |
| GB diagnostic GB de 3mois | 6 | 201,96 4,85 | 143,59 1,42 | P=0,2 différence non significative |
| GB de 3mois GB de 6mois | 6 | 4,85 5,61 | 1,42 2,25 | P=0,24 différence non significative |
| GB de 6mois GB de 12mois | 4 | 6,79 6,54 | 1,65 1,69 | P=0,71 Différence non significative |

Le nombre de GB est diminué après traitement par Imatinib pour les patient de 1^{er} groupe (la réponse moléculaire précoce de 3mois) dont :

- La moyenne des GB au diagnostic était $152,01 \cdot 10^3$ élém/mm³ et la moyenne après traitement était $6,29 \cdot 10^3$ élém/mm³ (b2a2).
- La moyenne des GB au diagnostic était $201,96 \cdot 10^3$ élém/mm³ et la moyenne après traitement était $4,85 \cdot 10^3$ élém/mm³ (b2a2 + b3a2).

✚ Pour le 2^{ème} groupe (b2a2/ b2a2+e1a2) :

Tableau 21 : Corrélation entre le type de transcrit et le nombre de GB pour 2^{ème} groupe.

| | Effectif | Moyenne 10 ³ élém/mm ³ | Ecart type 10 ³ | P |
|------------------------------|----------|---|-------------------------------|---|
| b2a2 | | | | |
| GB diagnostic GB de 3mois | 8 | 151,62 6,12 | 157,34 3,15 | P=0,35 différence non significative |
| GB de 3mois GB de 6mois | 7 | 6,53 6,54 | 3,17 2,84 | P=0,98 différence non significative |
| GB de 6mois GB de 12mois | 5 | 6,60 6,72 | 2,36 2,26 | P=0,85 Différence non significative |
| b2a2 + e1a2 | | | | |
| GB diagnostic GB de 3mois | 4 | 227,71 4,47 | 162,17 1,40 | P=0,07 Différence non significative |
| GB de 3mois GB de 6mois | 2 | 4,47 5,12 | 1,40 0,97 | P=0,08 Différence non Significative |
| GB de 6mois GB de 12mois | 2 | 5,50 6,30 | 0,35 0 | P=0,19 Différence non significative |

Le nombre de GB est diminué après traitement par Imatinib pour les patient de 2^{ème} groupe (la réponse moléculaire précoce de 3mois) dont :

- La moyenne des GB au diagnostic était $151,62 \cdot 10^3$ élém/mm³ et la moyenne après traitement était $6,12 \cdot 10^3$ élém/mm³ (b2a2).
- La moyenne des GB au diagnostic était $227,71 \cdot 10^3$ élém/mm³ et la moyenne après traitement était $4,47 \cdot 10^3$ élém/mm³ (b2a2 + e1a2).

❖ **Le taux des plaquettes :**

✚ **Pour le 1^{er} groupe (b2a2/ b2a2+b3a2) :**

Tableau 22: Corrélation entre le type de transcrit et le taux des plaquettes pour 1^{er} groupe.

| | Effectif | Moyenne 10^3 élém/mm ³ | Ecart type 10^3 | P |
|--------------------------------|----------|--|----------------------|---|
| b2a2 | | | | |
| Plq diagnostic Plq de 3mois | 7 | 261,21 190,28 | 126,86 67,04 | P=0,31 différence non significative |
| Plq de 3mois Plq de 6mois | 5 | 121,2 201,4 | 50,60 76,05 | P=0,16 différence non significative |
| Plq de 6mois Plq de 12mois | 3 | 172,66 213,33 | 63,634 79,764 | P=0,11 Différence non significative |
| b2a2 + b3a2 | | | | |
| Plq diagnostic Plq de 3mois | 6 | 337,33 193,5 | 220,46 476,39 | P=0,2 différence non significative |
| Plq de 3mois Plq de 6mois | 6 | 193,5 171,66 | 476,39 881,40 | P=0,6 différence non significative |
| Plq de 6mois Plq de 12mois | 4 | 136,5 207,5 | 835,88 104,27 | P=0,4 Différence non significative |

✚ Pour le 2^{ème} groupe (b2a2/ b2a2+e1a2) :

Tableau 23: Corrélation entre le type de transcrit et le taux des plaquettes pour le 2^{ème} groupe.

| | Effectif | Moyenne 10 ³ élém/mm ³ | Ecart type 10 ³ | P |
|--------------------------------|----------|---|-------------------------------|---|
| b2a2 | | | | |
| Plq diagnostic Plq de 3mois | 9 | 334 192,11 | 184,87 52,92 | P=0,08 Différence non significative |
| Plq de 3mois Plq de 6mois | 7 | 214,71 180,57 | 32,43 83,33 | P=0,29 différence non significative |
| Plq de 6mois Plq de 12mois | 5 | 161 239,80 | 86,11 74,66 | P=0,20 Différence non significative |
| b2a2 + e1a2 | | | | |
| Plq diagnostic Plq de 3mois | 4 | 211,62 191 | 120,29 72,89 | P=0,81 différence non significative |
| Plq de 3mois Plq de 6mois | 4 | 191 193,25 | 72,89 86,233 | P=0,94 différence non significative |
| Plq de 6mois Plq de 12mois | 2 | 129,50 135,50 | 14,84 86,97 | P=0,92 Différence non significative |

✚ le taux des plaquettes au diagnostic est diminué après traitement par Imatinib pour les patients de 1^{er} groupe et de 2^{ème} groupe (la réponse moléculaire précoce de 3mois).

✚ On n'a pas trouvé une corrélation entre le type de transcrit et le taux des plaquettes après traitement par Imatinib pour les deux groupes.

II.6. Corrélation de la réponse moléculaire à l'Imatinib avec les différents types de transcrit après traitements :

Nous avons analysé la réponse moléculaire à l'Imatinib pour 12 patients :

II.6.1. Les réponse de 3 mois :

La réponse au traitement par Imatinib était optimale pour les 12 patients, aucun patient n'a changé sans traitement.

II.6.2. Les réponse de 6 mois :

Tableau 24 : Corrélation entre le type de transcrit et la réponse au traitement pour 1^{er} groupe.

| Type de transcrit | Réponses moléculaires de 6 mois | | Total | P |
|-------------------|---------------------------------|-------|-------|--------------------------------------|
| | Réponse | Echec | | |
| b2a2 | 5 | 1 | 6 | P= 1 Différence non significative |
| b2a2+b3a2 | 5 | 1 | 6 | |
| Total | 10 | 2 | 12 | |

On n'a pas trouvé une corrélation entre la réponse à l'Imatinib avec les types de transcrit pour le 1^{er} groupe dont :

- 2 patients (16,66%) ayant échoué à l'Imatinib et aux quels un traitement par un ITK de 2^{ème} génération a été administré, dont un patient possède le transcrit b2a2 seul et l'autre possède le transcrit b2a2+b2a3.
- 5 patients (41,66%) possèdent le transcrit b2a2, 5 patients (41,66%) possèdent le transcrit b2a2+b2a3, ces patient ont répondu au traitement.

Tableau 25 : Corrélation entre le type de transcrit et la réponse au traitement pour 2^{ème} groupe.

| Type de transcrit | Réponses moléculaires de 6 mois | | Total | P |
|-------------------|---------------------------------|-------|-------|-------------------------------------|
| | Réponse | Echec | | |
| b2a2 | 8 | 0 | 8 | P= 0,02 Différence significative |
| b2a2+e1a2 | 2 | 2 | 4 | |
| Total | 10 | 2 | 12 | |

On a trouvé une corrélation entre la réponse à l'Imatinib avec les types de transcrit pour le 2^{ème} groupe dont :

2 patients (16,66%) ayant échoué à l'Imatinib et aux quels un traitement par un ITK de 2^{ème} génération a été administré, les deux patients possèdent le transcrit b2a2+e1a2.

Discussion

III.DISCUSSION :

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

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

L'objectif de notre étude était de décrire les différents types de transcrits observés chez les patients atteints de l' LMC et leurs influences sur les principaux paramètres de l'hémogramme lors du diagnostic de la maladie et sur la réponse moléculaire après traitement par les ITKs.

Notre étude était une étude rétrospective de type descriptif conduit sur les dossiers de 13 patients atteints de la leucémie myéloïde chronique suivi au niveau de service d'hématologie et de laboratoire centrale EHS CAC Blida.

Notre série a présenté un âge moyen au diagnostic de 51.62 ans, avec un écart type de 11,66 ans ($51,62 \pm 11,66$) avec un maximum de fréquence entre 30 et 60 ans (adultes).

Une étude algérienne a révélé, chez les sujets atteints de LMC, un âge moyen, au diagnostic, de 43,5 ans, avec un pic de fréquence dans la tranche allant de 36 à 45 ans, faisant de la LMC une affection de l'adulte jeune.

Les patients de sexe féminin étaient majoritaires avec 9 patients (69%) et les patients de sexe masculin ont représenté 4 patients (31%) soit un sexe ratio (F/H) de 2,25. ces résultat est proche de celui constaté au niveau de EPH mascara ; Algérie.

En outre, la répartition en fonction du sexe, montre une légère prédominance masculine en Algérie, Un sex-ratio H/F de 1,2 a été retrouvée dans une étude algéro-tunisienne, réalisée entre 2010 et 2014.

La découverte de la maladie chez nos patients était par la présence de la splénomégalie (SPM) chez 85% des cas, syndrome anémique présent chez 54% des cas, une hyperleucocytose chez 31% des cas, l'asthénie chez 23%, le syndrome hémorragique chez 8 %, CIVD chez 8 % des cas.

Ces résultats sont en concordance avec celle de la littérature ; le mode lent de développement de la maladie fait qu'elle s'installe de façon insidieuse, le plus souvent le diagnostic est porté de manière fortuite à l'occasion d'une numération formule sanguine (NFS) de routine. La maladie peut aussi se révéler par son symptôme cardinal, la splénomégalie.

En effet, la leucémie myéloïde chronique est une hémopathie maligne appartenant au groupe des syndromes myéloprolifératifs chroniques, se développe lorsqu'une cellule-souche progénitrice pluripotente anormale initie une production excessive de toutes les cellules de la lignée myéloïde, principalement dans la moelle osseuse, mais aussi dans des sites extramédullaires comme la rate.

Une hyperleucocytose était observée chez tous nos patients au moment de diagnostic avec un taux moyen $198,75 \times 10^3$ élém/mm³ ($\pm 168,71 \times 10^3$) et des extrêmes allant de $16,23 \times 10^3$ à $499,61 \times 10^3$ élément/l ce qui concorde avec celui de **Leguay T., F-X. Mahon**, car nous avons parlé d'un syndrome myéloprolifératif où la multiplication anormale des cellules de la moelle osseuse.

Notre série a présenté un taux moyen de plaquettes de $296,346 \times 10^3$ élément/ μ l ($\pm 172798,94$). Ces résultats concordent avec ceux retrouvés par **DJOUADI et al** à l'échelle nationale.

84,61 % des patients ont eu un taux de plaquettes normales, 15,38 % ont présenté une thrombocytose et aucun patient n'a présenté une thrombopénie. La thrombocytose peut être expliquée par l'activation constitutive de la voie JAK/STAT qui l'une des voies déclenchées par le BCR-ABL et qui est une voie responsable de la production des plaquettes et des mégacaryocytes.

Chez nos patients le taux moyen d'hémoglobine était de 10,54 g/dl ($\pm 1,82$) avec des extrêmes allant de 7,10 gr/dl à 12,60. De plus, l'anémie était diagnostiquée chez 8 patients (51,5%) contre 05 patients (38,5%) sans anémie.

Chez nos patients le nombre moyen des globules rouges était de $3,59 \times 10^6$ / μ l ($\pm 0,68$) avec des extrêmes allant de 2,40 à $4,30 \times 10^6$ / μ l.

L'examen de frottis sanguin permet de déterminer le taux de blastes et de myélémie dans le sang. Chez nos patients le taux moyen des blastes était de 2 % ($\pm 1,87$) avec des extrêmes allant de (0 à 5%) dont : 11 patients avaient un taux de blastes inférieur à 5 % et 2 patients avaient un taux de blastes égale à 5%. Les résultats qu'on a trouvé concorde avec les données de la littérature qui portent à la connaissance que le taux de blastes sanguins dans le cas d'une LMC en phase chronique est inférieur à 5%.

Le taux moyen des précurseurs de la lignée granuleuse (myélémie) était de 36 % avec des extrêmes allant de (23 à 55 %). La totalité de nos patients (100%) avait un taux supérieur à 20% ce qui confirme les données de la littérature **Leguay T., F-X. Mahon** ; qui informe que le taux de myélémie en cas de LMC doit être supérieur à 20%.

Selon les Résultats de la cytogénétique :

- Le test caryotype était réalisé systématiquement chez les 12 patients, qui a confirmé la présence de la translocation (9,22) (q34, q11) chez 4 patients (30,77%).
- Le test cytogénétique Fish était réalisé pour 8 patients (61,54%), qui a confirmé la présence du signal de fusion BCR-ABL.
- Aucun des deux tests n'était réalisé chez un seul patient (7,69 %) car le patient a réalisé RT-PCR qui était positif.

Selon les recommandations ELN 2020 la cytogénétique doit être réalisée au diagnostic :

Le caryotype doit être réalisé systématiquement chez les patients pour confirmer la présence du signal de fusion BCR-ABL, en cas de caryotype négatif une hybridation in situ par fluorescence (FISH) doit être réalisée.

Ces résultats avaient confirmé que la maladie est caractérisée par une anomalie chromosomique acquise touchant les cellules hématopoïétiques.

Dans notre série 7 (53,85%) patients qui ont fait leurs tests PCR au moment de diagnostic et 6 (46,15%) qui ont fait leurs tests PCR au monitoring car la réalisation de la RT-PCR a commencé à partir de 2022.

Selon les recommandations ELN une RT-PCR est obligatoire pour identifier le type de transcrits BCR-ABL qui peut être suivi de manière appropriée lors de l'évaluation de la réponse au traitement par ITK.

La RT-PCR réalisé pour les patients de notre population a donné 9 patients (69,23%) possèdent le transcrits M BCR-ABL, 4 patients (30,77%) possèdent le transcrits M m BCR-ABL, aucun patient n'a présenté le type μ BCR-ABL (rare).

Donc il avait une prédominance de type M BCR-ABL dans notre population, ces résultats concorde avec les résultats de **T.P de Almeida Filho et al** et **Essohana Padaro et al**.

La RT-PCR réalisé a permet d'identifier les variants de transcription, dans notre population il existait une prédominance du transcrit b2a2 dont : 5 patients (38,47%) possèdent ce type.

Selon **Burmeister T,Reinhardt R**, le transcrit b3a2 (e14a2) ou b2a2 (e13a2) sont retrouvés dans plus de 95 % des cas.

Notre résultat n'était pas concordante avec celui de **T.P de Almeida Filho et al** et avec celui de **Essohana Padaro et al** ou il existait une prédominance de transcrite b3-a2 au diagnostic.

Les données de leur études ont montré une fréquence plus élevée du transcrite b3a2, mais d'autre étude ont également rapporté, moins fréquemment, une incidence plus élevée du transcrite b2a2.

Les différentes fréquences trouvées pourraient s'expliquer par une sélection inadéquate des échantillons ou par des composantes génétique associées à l'ethnicité de la population cible.

Tous les malades de notre population ont reçu une dose initiale d'Imatinib de 400 mg/j. Il s'agit des patients diagnostiqués en phase chronique de la maladie. Ceci suit aussi bien les recommandations nationales qui préconisent cette même molécule à ce même dosage que les recommandations internationales (ELN 2020) qui, même si elles permettent l'utilisation du Dasatinib et du Nilotinib, placent l'Imatinib au même pied d'égalité.

Le passage au traitement par Nilotinib avec une dose de 800 mg a été effectué chez 3 patients (23%), pour une intolérance à l'Imatinib chez 1 patient et suite à un échec thérapeutique chez 2 patients.

Suite à un échec au Nilotinib, 2 patients ont été mis sous Dasatinib à une dose de 50 mg.

On n'a pas trouvé une corrélation entre le type de transcrite et le nombre de GB, le taux des plaquettes, le taux d'hémoglobine et le nombre de GR au moment de diagnostic pour 1^{er} groupe (b2a2/ b2a2+b3a2). Ces résultats concorde avec celui de **T.P de Almeida Filho et al**.

Où :

| | b2a2 | b2a2+b3a2 | P |
|-------------------------------|-------------|-------------|------|
| Leucocytes 10 ³ /l | 9,94 ± 1,67 | 9,73 ± 1,45 | 0,16 |
| Plaquettes 10 ³ /l | 152,5 | 188,38 | 0,74 |
| Hb g/dl | 320,65 | 327,05 | 0,88 |

Quant au nombre de plaquette, certaines études ont montré des valeurs plus élevées de ce paramètre chez les patients expriment le transcrite b3a2 **Palmanpallis Set al, Jain P et al, Perego R**.

Dans la littérature, il existe un nombre relativement faible d'étude associant la corrélation de type de transcrite (b2a2/b2a2+b3a2) car la présence du type de transcrite e1a2 est faible.

Dans notre étude on n'a pas trouvé une corrélation entre le type de transcrit pour le 2^{ème} groupe (b2a2/e1a2) et les paramètres de l'hémogramme au moment de diagnostic.

On n'a pas trouvé une corrélation entre la réponse moléculaire à l'Imatinib avec les types de transcrit pour le 1^{er} groupe dans les 6 mois (p=1) dont :

2 patients (16,66%) ayant échoué à l'Imatinib et aux quels un traitement par un ITK de 2^{ème} génération a été administré, dont un patient possède le transcrit b2a2 seul et l'autre possède le transcrit b2a2+b2a3.

5 patients (41,66%) possèdent le transcrit b2a2, 5 patients (41,66%) possèdent le transcrit b2a2+b2a3, ces patient ont répondu au traitement.

L'étude de **Nachi et al** suggèrent que les transcriptions b3a2 et b2a2 peuvent avoir des phénotypes différents.

On n'a pas trouvé une corrélation entre la réponse à l'Imatinib avec les types de transcrit pour le 2^{ème} groupe dont 2 patients (16,66%) ayant échoué à l'Imatinib et aux quels un traitement par un ITK de 2^{ème} génération a été administré, les deux patients possèdent le transcrit b2a2+e1a2.

Selon **Verma d et al**, le type de transcrit e1a2 est associe a un grand risque de progression de la maladie ainsi qua une réponse cytogénétique et moléculaire médiocre au traitement par les ITKs.

Conclusion

Et

Recommandations

Conclusion et recommandations :

Notre étude a montré que le type de transcrit BCR-ABL n'influence pas les paramètres de hémogramme au diagnostic chez les patients atteints de la LMC en phase chronique.

Cependant d'autres études sont nécessaires pour contourner les facteurs d'interférence possible et pour déterminer la contribution réelle des transcrits BCR-ABL au pronostic des patients, si le rôle de ces molécules est confirmé elles pourront être utilisées pour surveiller les patients atteints de LMC à l'avenir.

D'après ce qui précède, nous voulons présenter certaines recommandations :

- ❖ La sensibilisation des citoyens à faire un bilan de santé périodique, incluant impérativement un hémogramme nécessaire à un éventuel diagnostic précoce.
- ❖ Eduquer les patients à la prise régulière et continue du traitement et le respect du calendrier des investigations biomoléculaires ainsi que les rendez-vous des consultations médicales, suggérant ainsi une surveillance rigoureuse des cas à réponse moléculaire sous-optimale ou un échec.
- ❖ Renforcer les capacités techniques des laboratoires pour un diagnostic précoce et précis :
 - Systématisation de la biologie moléculaire pour la recherche et la quantification des transcrits BCR-ABL par RTqPCR, afin d'affiner la surveillance, d'apprécier l'efficacité du traitement par ITK et de mesurer une réponse moléculaire majeure.

ملخص :

ابيضاض الدم النخاعي المزمن هو ورم خبيث في الدم من مجموعة متلازمات التكاثر النقوي. من الناحية الخلوية، يتميز بخلل كروموسومي مكتسب يؤثر على الخلايا المكونة للدم تسمى كروموسوم فيلادلفيا، الناتجة عن النقل المتبادل والمتوازن دون فقدان المادة الوراثية بين الأذرع الطويلة للكروموسومات 9 و 22 (q11, q34) (9,22) t . نتيجة هذا النقل هو تكوين جين اندماج الوهمي والذي يرمز لبروتين خيمري هذا الاخير لديه نشاط إنزيمي تأسيسي قوي من نوع التيروسين كيناز.

يعتمد تشخيص سرطان الدم النخاعي المزمن على التشخيص السريري والبيولوجي والخلوي والجزيئي.

كانت دراستنا عبارة عن دراسة وصفية بأثر رجعي أجريت على سجلات 13 مريضا يعانون من سرطان الدم النخاعي المزمن في قسم أمراض الدم والمختبر المركزي للمستشفى المتخصص في مكافحة سرطان البلية يهدف عملنا إلى وصف الأنواع المختلفة من النصوص التي لوحظت في مرضى سرطان الدم النخاعي المزمن وتأثيراتها على المعلمات الرئيسية لتعداد الدم أثناء تشخيص المرض وبعد العلاج باستخدام TKIs .

حددت دراستنا متوسط عمر التشخيص 51.62 سنة، مع انحراف معياري قدره 11.66 سنة (11.66 ± 51.62) مع أقصى تردد بين 30 و 60 سنة (كبار السن).

كان اكتشاف المرض عند مرضانا من خلال وجود تضخم الطحال في 85 ٪ من الحالات، ومتلازمة فقر الدم الموجودة في 54. ٪ من الحالات، وزيادة عدد الكريات البيضاء في 31 ٪ من الحالات، والوهن في 23 ٪.

فيما يتعلق بمرحلة التشخيص، استفاد جميع مرضانا من تعداد الدم الكامل وتصوير النخاع والنمط النووي لنخاع العظم. تعداد الدم جسد فرط زيادة عدد الكريات البيضاء في 100 ٪ من الحالات، كثرة الصفيحات (15.38٪) وفقر الدم (51.5٪) من الحالات. يحدد فحص لطاخة الدم مستوى الانفجارات (>5 ٪) ونخاع الدم (>20 ٪) في الدم. أظهر تصوير النخاع معدل انفجارات نخاع العظم >10 ٪ عند جميع المرضى، وبالتالي تصنيفهم في المرحلة المزمنة للمرض. أكدت هذه النتائج متلازمة التكاثر النقوي.

وفقا لنتائج علم الوراثة الخلوية تم إجراء اختبار النمط النووي بشكل روتيني لجميع المرضى والذي كان ايجابيا عند 4 مرضى (30.77٪). تم إجراء الاختبار الوراثي الخلوي لـ 8 مرضى (61.54٪)، والذي أكد الإصابة بالمرض. لم يتم إجراء أي من الاختبارين على مريض واحد (7.69٪) لأن المريض أجرى اختبار RT-PCR وكانت النتيجة ايجابية. أكدت هذه النتائج أن المرض يتميز بخلل كروموسومي مكتسب يؤثر على الخلايا المكونة للدم. أما بالنسبة للبيولوجيا الجزيئية، فقد أعطت نتائج RT-PCR التي أجريت غلبة من النوع M BCR-ABL بنسبة 69,23 بالمئة اما 30,77 بالمئة يملكون النوع Mm BCR-ABL . كما حدد RT-PCR الذي تم إجراءه أن 38,47 بالمئة من المرضى يمتلكون النوع b2a2 و 30,77 بالمئة يمتلكون النوع b2a2 + b3a2 كما أن 15,38 بالمئة يمتلكون النوع b2a2 + e1a2 و 15,38 بالمئة يملكون النوع b2a2 + b3a2 + e1a2 .

علاجياً، تلقى جميع المرضى في مجموعتنا (100%) جرعة أولية من Imatinib تبلغ 400 مغ / اليوم. (23%) من المرضى كانوا يعانون من فشل العلاج أو عدم تحمله مما تطلب استخدام علاج الخط الثاني Nilotinib من بين هؤلاء، تم وضع (15%) على Dasatinib كعلاج خط ثالث.

أظهرت دراستنا أن نوع نسخة BCR-ABL لا يؤثر على المعلمات الرئيسية لتعداد الدم أثناء تشخيص المرض عند المرضى الذين يعانون من سرطان الدم النخاعي المزمن في المرحلة المزمنة .

ومع ذلك، هناك حاجة إلى مزيد من الدراسات للتحديد عوامل التداخل المحتملة وتحديد المساهمة الحقيقية لنصوص BCR-ABL في تشخيص المريض ، إذا تم تأكيد دور هذه الجزيئات ، فيمكن استخدامها لمراقبة مرضى سرطان الدم النخاعي المزمن في المستقبل.

الكلمات المفتاحية: ابيضاض الدم النخاعي المزمن، RT-PCR، نوع النض، تعداد الدم ، الاستجابة الجزيئية.

Abstract:

Chronic myeloid leukaemia (CML) is a haematological malignancy belonging to the group of myeloproliferative syndromes (MPS). Cytogenetically, it is characterised by an acquired chromosomal abnormality affecting haematopoietic cells, known as the Philadelphia chromosome, resulting from reciprocal and balanced translocation without loss of genetic material between the long arms of chromosomes 9 and 22 $t(9;22)(q34;q11)$. The consequence of this translocation is the formation of a chimeric BCR-ABL fusion gene, which codes for a chimeric protein. The chimeric protein has a high level of constitutive tyrosine kinase enzyme activity.

The diagnosis of CML is based on clinical, biological, cytological and molecular findings.

Our study was a retrospective descriptive study conducted on the files of 13 patients with chronic myeloid leukaemia followed up in the haematology department and the central laboratory of the hospital specialising in the fight against cancer in Blida (EHS CAC Blida). The aim of our work is to describe the different types of transcripts observed in CML patients and their influence on the main haemogram parameters at diagnosis of the disease and after treatment with TKIs.

Our study showed a mean age of diagnosis of 51.62 years, with a standard deviation of 11.66 years (51.62 ± 11.66), with a maximum frequency between 30 and 60 years (adults).

The discovery of the disease in our patients was by the presence of splenomegaly (SPM) in 85% of cases, anemic syndrome present in 54% of cases, hyperleukocytosis in 31% of cases, asthenia in 23%.

...ome in 54% of cases, the presence of splenomegaly (SPM) in 38% of cases.

At the diagnostic stage, all our patients underwent a haemogram, myelogram and bone marrow karyotype. The blood count showed hyperleukocytosis in 100% of cases, thrombocytosis (15.38%) and anaemia in 51.5% of cases. Blood smear examination determined the level of blasts (<5%) and myeloma (>20%) in the blood. The myelogram showed a marrow blasts rate <10% in all patients, thus classifying them in chronic phase. These results had confirmed the myeloproliferative syndromes (MPS) of the disease.

According to the cytogenetic results:

- Karyotype testing was routinely performed in all 12 patients, which confirmed the

the presence of the translocation (9,22) (q34, q11) in 4 patients (30.77%).

- Fish cytogenetic testing was performed in 8 patients (61.54%), which confirmed the presence of the BCR-ABL fusion signal.
- Neither test was performed in a single patient (7.69%) because the patient performed RT-PCR which was positive.

These results confirmed that the disease is characterised by an acquired chromosomal abnormality affecting haematopoietic cells.

As for molecular biology, the RT-PCR results showed a predominance of the M BCR-ABL type in our population: (69.23%) had the M BCR-ABL transcript, (30.77%) had the Mm BCR-ABL transcript and no patient had the μ BCR-ABL type (rare). RT-PCR was used to identify the transcription variants in our population, of which (38.47%) were predominantly b2a2, (30.77%) b2a2+b3a2, (15.38%) b2a2+e1a2, (15.38%) b2a2+b3a2+e1a2. In our population there was a predominance of the b2a2 transcript.

In terms of treatment, all patients in our population (100%) received an initial dose of Imatinib of 400 mg/d. Of these, 23% experienced therapeutic failure or intolerance, necessitating recourse to second-line treatment with Nilotinib. Of these, (15%) were started on Dasatinib as third-line treatment.

Our study showed that the type of BCR-ABL transcript does not influence hematological parameters at time of diagnosis in patients with chronic phase CML.

However, further studies are needed to circumvent possible interfering factors and to determine the actual contribution of BCR-ABL transcripts to patient prognosis. If the role of these molecules is confirmed, they could be used to monitor CML patients in the future.

Key words: chronic myeloid leukaemia, RT-PCR, transcript type, haemogram, molecular response.

Résumé :

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une hémopathie maligne du groupe des syndromes myéloprolifératifs (SMP). Sur le plan cytogénétique, elle est caractérisée par une anomalie chromosomique acquise touchant les cellules hématopoïétiques dénommée chromosome Philadelphie, résultant de la translocation réciproque et équilibrée sans perte du matériel génétique entre les bras longs des chromosomes 9 et 22 t (9;22) (q34 ; q11). La conséquence de cette translocation est la formation d'un gène de fusion chimérique BCR-ABL, qui code pour une protéine chimérique. Cette dernière possède une forte activité enzymatique constitutive de type tyrosine kinase.

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

Notre étude était une étude rétrospective de type descriptif conduit sur les dossiers de 13 patients atteints de la leucémie myéloïde chronique suivi au niveau de service d'hématologie et le laboratoire centrale de l'établissement hospitalier spécialisé en lutte contre le cancer Blida (EHS CAC Blida). Notre travail a pour objectif de décrire les différents types de transcrits observés chez les patients atteint de l' LMC et leurs influences sur les principaux paramètres de l'hémogramme lors du diagnostic de la maladie et après traitement par les ITKs.

Notre étude a objectivé un âge moyen de diagnostic de 51.62 ans, avec un écart type de 11,66 ans ($51,62 \pm 11,66$) avec un maximum de fréquence entre 30 et 60 ans (adultes).

La découverte de la maladie chez nos patients était par la présence de la splénomégalie (SPM) chez 85% des cas, syndrome anémique présente chez 54% des cas, une hyperleucocytose chez 31% des cas, l'asthénie chez 23%.

En ce qui concerne l'étape du diagnostic, la totalité de nos patients ont bénéficié d'un hémogramme, d'un myélogramme et d'un caryotype médullaire. L'hémogramme a objectivé une hyperleucocytose dans 100% des cas, une thrombocytose (15,38 %) et une anémie dans (51,5%) des cas. L'examen de frottis sanguin permet de déterminer le taux de blastes (<5%) et de myélémie (>20%) dans le sang. Le myélogramme a mis en évidence un taux de blastes médullaires <10% chez tous les patients, les classant ainsi en phase chronique.ces résultats avaient confirmé le syndrome myéloprolifératifs (SMP) de la maladie.

Selon les Résultats de la cytogénétique :

-
- Le test caryotype était réalisé systématiquement chez les 12 patients, qui a confirmé la présence de la translocation (9,22) (q34, q11) chez 4 patients (30,77%).
 - Le test cytogénétique Fish était réalisé pour 8 patients (61,54%), qui a confirmé la présence du signal de fusion BCR-ABL.
 - Aucun des deux tests n'était réalisé chez un seul patient (7,69 %) car le patient a réalisé RT-PCR qui était positif.

Ces résultats avaient confirmé que la maladie est caractérisée par une anomalie chromosomique acquise touchant les cellules hématopoïétiques.

Quant à la biologie moléculaire, les résultats de la RT-PCR réalisé a donné une prédominance de type M BCR-ABL dans notre population dont (69,23%) possèdent le transcrits M BCR-ABL, (30,77%) possèdent le transcrits Mm BCR-ABL et aucun patient a présenté le type μ BCR-ABL (rare). La RT-PCR réalisé a permet d'identifier les variants de transcription, dans notre population dont (38,47%) possèdent le type b2a2 (prédominance), (30,77%) possèdent le type b2a2 b3a2, (15,38%) possèdent le type b2a2 e1a2, (15,38%) possèdent le type b2a2 b3a2 e1a2. Dans notre population il existait une prédominance de transcrit b2a2.

Sur le plan thérapeutique, tous les malades de notre population (100%) ont reçu une dose initiale d'Imatinib de 400 mg/j. dont (23%) ont eu un échec thérapeutique ou une intolérance nécessitant le recours au traitement de deuxième ligne par Nilotinib. Parmi ces derniers, (15%) ont été mis sous Dasatinib comme traitement de troisième ligne.

Notre étude a montré que le type de transcrit BCR-ABL n'influence pas les paramètres De l'hémogramme au diagnostic chez les patients atteints de la LMC en phase chronique.

Cependant d'autre étude sont nécessaire pour contourner les facteurs d'interférence possible et pour déterminer la contribution réelle des transcrit BCR-ABL au pronostic des patients, si le rôle de ces molécule est confirmé elles pourront être utilisées pour surveiller les patients atteints de LMC à l'avenir.

Mots clés : leucémie myéloïde chronique, RT-PCR, type de transcrit, hémogramme, réponse moléculaire.

Références bibliographique:

1. Bennett JH. Case of Hypertrophy of the Spleen and Liver: In which Death Took Place From Suppuration of the Blood: Stark and Comp.; 1845.
2. Tefferi A. The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. *Leukaemia*. 2008; 22(1):3-13.
3. DAMESHEK W. Editorial: some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*. 1951; 6(4):372-5.
4. Nowell PC. A minute chromosome in human granulocytic leukaemia. *Science*. 1960; 132:1497-501.
5. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. 1973.
6. Heisterkamp N, Stephenson JR, Groffen J, Hansen PF, de Klein A, Bartram CR, et al. Localization of the c-abl oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. 1983.
7. Heisterkamp N, Stam K, Groffen J, de Klein A, Grosveld G. Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph'translocation. *Nature*. 1984;315(6022):758-61.
8. Konopka JB, Watanabe SM, Witte ON. An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell*. 1984; 37(3):1035-42.
9. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, et al. Effects of a Selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nature Medicine*. 1996; 2(5):561-6.
10. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, et al. Efficacy and Safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl j Med*. 2001 ; 2001(344) :1031-7.
11. Dreyfus B. *Hématologie. Médecine-sciences*, Flammarion, 1994 : 8-124.
12. Bouscary D, Chrétien S, Lacombe C. *Actualités pédiatriques en hématopoïèse. Médecine Thérapeutique, Pédiatrie*, 2000 ; 3 : 56-62.
13. Ferrant A. *Sang et hématopoïèse Hématologie. Université Catholique de Louvain*, 2000 ; I : 5-23.
14. Amélie Boillot. *Facteurs de croissance hématopoïétiques au cours des thérapies anti-cancéreuses : Effets indésirables et précautions lors de leur dispensation à l'officine. Sciences pharmaceutiques*. 2010.

-
15. Praloran V .Hématopoïèse. Cours Hématologie, 2007 ; 2 : 1-45.
 16. Choquet S. Hématologie, Ellipse, 2000 : 5-20.
 17. Jacques Diebolda, Thierry Molinaa , Agnès Le Tourneaua , Josée Audouina. Hémopathies malignes : définition et différentes variétés selon la classification de l'OMS 2001,2007.
 18. Audouin J., Delacretaz .F, Diebold J., Dumont J., Le Tourneau A., Meugé-Moraw C., Biopsie médullaire osseuse en pratique quotidienne, 1 vol., Collection : Le Pathologiste, Elsevier Masson, 2004.
 19. Jaffe E.S., Harris N.L., Stein H., Vardiman J.W. (Eds), World health organization classification of tumours, Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, IARC Press, Lyon, 2001.
 20. Feller A.C., Diebold J., Histopathology of nodal and extra nodal non Hodgkin's lymphomas, based on the WHO classification, Third, Completely revised and updated Edition, 1 vol., Springer Verlag, 2004.
 21. Ben-Neriah Y, Daley GQ, Mes-Masson A-M, Witte ON, Baltimore D. The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. Science. 1986; 233 (4760):212-4.
 22. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood. 2000;96(10):3343-56.
 23. Leguay T., F-X. Mahon. Leucémie myéloïde chronique. EMC (Elsevier SAS Paris), Hématologie, 13-011-B-10, 2005, p. 1-13.
 24. Djouadi-Lahlou K. Etude épidémiologique nationale de la Leucémie Myéloïde Chronique en Algérie : travail coopératif et multicentrique sur une période de 16 ans. A propos de 1927 cas (1994 - 2009). Revue Algérienne d'Hématologie. N° 3, Septembre 2010, p. 6-10.
 25. Djouadi K., Abdennebi A., Harieche F. et al. Approche Epidémiologique de la Leucémie Myéloïde Chronique : Etude Algéro-Tunisienne à propose de 1195 cas sur 05 ans (2010 à 2014). Revue Algérienne d'Hématologie, N° 13/14, Décembre 2017, p. 7-13.
 26. Lee Goldman, Pierre L. Masson . Cecil Medicine Cancérologie, 2015, chapitre 9: leucemie chronique,p 83.
 27. ESMO. Leucémie myéloïde chronique - Guide pour les patients. V.2013.1. [Internet]. <https://www.esmo.org/content/download/6600/115001/file/FR-LMC-Guide-pour-les-Patients.pdf>.
 28. Nicolini .FE, Gonon-demoulian.R, Goldman .JM, historique de la leucémie myéloïde chronique : un paradigme de traitement du cancer, Bulletin du Cancer vol. 101, N° 1, janvier 2014, p : 56-67.

-
29. Dine .G, Rehn .Y, Brahimia .S, Ali Ammara .N, Gaillarda .B, Bocqa. Y, Fumagallia .G, maladie résiduelle et leucémie myéloïde chronique, *Immuno-analyse et biologie spécialisée* (2013), p : 201—206.
 30. Bardin cv. *Leucémies chroniques : Traitement de la leucémie myéloïde chronique. Pharmacie clinique pratique en oncologie.* Elsevier Masson, 2016, p. 247-266.
 31. Haute Autorité de Santé. Évaluation de l'acte de recherche ou de quantification du gène de fusion BCR-ABL par RT-PCR dans le diagnostic et le suivi thérapeutique des leucémies myéloïdes chroniques et des leucémies lymphoblastiques aiguës, Novembre 2017.
 32. Zhou T., Medeiros L. J., Hu S. « Chronic Myeloid Leukemia: Beyond BCR-ABL1 », *Curr Hematol Malig Rep*, vol. 13, no6, p. 435-445, déc. 2018.
 33. Leguay T. et Mahon F.-X. « Leucémie myéloïde chronique », *EMC - Hématologie*, vol. 2, no 3, p. 187-205, sept. 2005.
 34. Panigrahi S. « Apoptin and its derivatives as molecular clues towards the development of novel tyrosine kinase inhibitors », *Thèse Doctorat Physiologie*, Winnipeg, 2008.
 35. Chardin P. « Domaines SH2 et SH3 : un nouveau paradigme pour la transmission du signal. », *Med Sci (Paris)*, vol. 10, no 6-7, p. 709, 1994.
 36. Turhan A. « Biologie de la protéine de fusion BCR-ABL : progrès récents », *Hématologie*, vol. 8, no 1, p. 35-45, mars 2002.
 37. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med* 2003; 349: 1451-64.
 38. Melo JV. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* 1996 ; 88:2375-84.
 39. Pane F, Frigeri F, Sindona M, Luciano L, Ferrara F, Cimino R, et al. Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood* 1996 ; 88:2410-4.
 40. Leguay T., Mahon F.-X. *Leucémie myéloïde chronique.* EMC (Elsevier SAS, Paris), *Hématologie*, 13-011-B-10, 2005.
 41. Deininger M. W., Goldman J. M., Melo J. V. « The molecular biology of chronic myeloid leukemia », *Blood*, vol. 96, no 10, p. 3343-3356, nov. 2000.
 42. Faderl S., Talpaz M., Estrov Z., O'Brien S., Kurzrock R., Kantarjian H. M. « The Biology of Chronic Myeloid Leukemia », *N Engl J Med*, vol. 341, no 3, p. 164-172, juill. 1999.
 43. Rea D, Cayuela J-M.. *Leucémie myéloïde chronique.* EMC *Hématologie*. Volume 9, N°4, Novembre 2014, p. 1-12.

-
44. Konopka JB, Watanabe SM, Witte ON. An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell*. 1984 ; 37(3):1035-4.
 45. Leguay T., F-X. Mahon. Leucémie myéloïde chronique. EMC (Elsevier SAS Paris), Hématologie, 13-011-B-10, 2005, p. 6.
 46. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 8 août 2013; 122(6):872-84.
 47. Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J, et al. Chronic Myeloid Leukemia: An Update of Concepts and Management Recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol*. 10 déc 2009;27(35):6041-51.
 48. N.Nachi , D.Guelaa ,B.Bensoltane,et autre, recherche des différents transcrits de fusion BCR-ABL1 par RT-PCR qualitative multiplexe : Intérêts diagnostiques et de suivi chez les patients atteints de Leucémie Myéloïde Chronique. *Revue Algérienne d'Hématologie*. N° 13-14, Décembre 2017.
 49. Weerkamp, F., Dekking, E., Ng, Y. Y., Van der Velden, V. H. J., Wai, H., Böttcher, S., ... & Van Poecke, N. (2009). Flow cytometric immunobead assay for the detection of BCR-ABL fusion proteins in leukemia patients. *Leukemia*, 23(6), 1106.
 50. Bengueraichi, F. (2014) . Analyse mutationnelle du gène JAK2 V617F et son association potentielle à la translocation BCR-ABL dans la leucémie myéloïde chronique . Université Mohamed Khider Biskra.
 51. C. Bardin. Traitement de la leucémie myéloïde chronique.pharmacie clinique pratique en oncologie,2016,Elsevier Masson SAS.
 52. Harieche, N.Toukal, N.Abdennebi, F.Boukhemia, W.Assouak, R.Belhimeur, F.Zerhouni, R.M.Hamladji, R.Ahmed-Nacer .Evaluation d'une méthode Automatisée de Quantification du Transcrit BCR-ABL dans la LMC : CepheidXpert Monitor AssayTM. F. Laboratoire de biologie moléculaire ; Service d'hématologie CPMC Alger.
 53. Machova Polakova K, Kulvait V, Benesova A, et al. Next-generation deep sequencing improves detection of BCR-ABL1 kinase domain mutations emerging under tyrosine kinase inhibitor treatment of chronic myeloid leukemia patients in chronic phase. *J Cancer Res Clin Oncol*2015; 141(5):887-99.
 54. Kastner R, Zopf A, Preuner S, et al. Rapid identification of compound mutations in patients with Philadelphia-positive leukaemias by long-range next generation sequencing. *Eur J Cancer* 2014 ; 50(4):793-800.

-
55. Jean-Claude Chomela, Biologie moléculaire de la leucémie myéloïde chronique : dernières avancées Revue Francophone Des Laboratoires - Mai 2017 - N°492, p37.
56. Bardin cv. Leucémies chroniques : Traitement de la leucémie myéloïde chronique. Pharmacie clinique pratique en oncologie. Elsevier Masson, 2016, p. 247-266.
57. Treuil P. La leucémie myéloïde chronique et son traitement par l'imatinib. Actualités Pharmaceutiques. N° 473, Avril 2008, p. 25-30.
58. Rea D, Cayuela J-M.. Leucémie myéloïde chronique. EMC Hématologie. Volume 9, N°4, Novembre 2014, p. 1-12.
59. Michallet M, Sobh M. Modèle de la thérapie ciblée en Onco-Hématologie par les inhibiteurs de tyrosine kinase Michallet 2017 LMC en 2017. Revue Algérienne d'Hématologie, N° 13/14, Décembre 2017, p. 52-59.
60. GAT-LMC, Société Algérienne d'Hématologie et de Transfusion Sanguine. Prise en charge des patients atteints de leucémie myéloïde chronique en Algérie. Mise à jour des recommandations nationales. 5ème réunion, Workshop, 18 janvier 2018, Hôtel Mercure, Alger.
61. Rea D, Cayuela J-M.. Leucémie myéloïde chronique. EMC Hématologie. Volume 9, N°4, Novembre 2014, p. 1-12.
62. Ledoux M-P., Natarajan-Ame S. Leucémie myéloïde chronique : des questions et des réponses. Médecine Thérapeutique, 2013, Volume 9, N°2, p. 128-138.
63. La leucémie myéloïde chronique (suite), Fédération Leucémie Espoir *Association de patients* : (mars 2009).
64. Djouadi-Lahlou. K, Prise en charge des patients atteints de Leucémie myéloïde Chronique en Algérie, 5ème Réunion, Workshop, du GAT – LMC, Mise à jour des recommandations Nationales : Janvier 2018.
65. Hochhaus. A., Baccarani M., Silve RT., et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronicmyeloid leukemia. *Leukemia* (2020) 34, p.966-984.
66. Revue Algérienne d'Hématologie N° 3, leucémie myéloïde chronique, Aspects épidémiologique, diagnostique et thérapeutique en Algérie, Sept 2010, pages : 1-41.
67. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al.
68. Apperley JF. Chronic myeloid leukaemia. *The Lancet*. 2015; 385(9976):1447-59.
69. Hehlmann R, Berger U, Pfirrmann M, Hochhaus A, Metzgeroth G, Maywald O, et al. Randomized comparison of interferon α and hydroxyurea with hydroxyurea monotherapy in Chronic myeloid leukemia (CML-study II): prolongation of survival by the combination of Interferon α and hydroxyurea. *Leukemia*. 2003; 17(8):1529-37.

-
70. Hochhaus A, O'Brien S, Guilhot F, Druker B, Branford S, Foroni L, et al. Six-year Follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2010; 24(5):1102.
71. Bardin.Ch, Tafzia.N, Decleves. X, Huet .E, Chast.F, Pharmacocinétique des inhibiteurs de tyrosine kinase dans la leucémie myéloïde chronique, nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques en hématologie, revu francophone des laboratoires, septembre, octobre 2007, N°395, pages : 31-35.
72. Djouadi–Lahlou. K, Prise en charge des patients atteints de Leucémie myéloïde Chronique en Algérie, 5ème Réunion, Workshop, du GAT – LMC, Mise à jour des recommandations Nationales : Janvier 2018.
73. Delbaldo. C, Pharmacocinétique(PK) et pharmacodynamie(PD) de l'imatinib (Glivec), *Thérapie* 2007 Mars-Avril, pages : 87-90.
74. Merlin J.L, Les inhibiteurs de tyrosine kinase en oncologie, *La Lettre du Pharmacologue* - vol. 22 - n° 2 - avril-mai-juin 2008.pages :51-62.
75. Nasr.R, Bazarbachi. A, Leucémie myéloïde chronique : « archétype » de l'impact des traitements ciblés *Cancérologie : cibles et traitements ciblés*,. *Pathologie Biologie* 60 (2012) pages : 239–245.
- 76.Jacot. W, Les Thérapies Ciblées les plus utilisées dans les Traitements Anticancéreux, *Oncologue Médical* , institut régional du cancer . www.e-cancer.fr.consulté le janvier 2019.
77. Buchdunger, E., Cioffi, C. L., Law, N., Stover, D., Ohno-Jones, S., Druker, B. J., & Lydon, N. B. (2000). Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 295(1), 139-145.
78. Bréchet.j -M Place des thérapeutiques ciblées : les inhibiteurs des récepteurs tyrosine kinases, *revue . pneumol. clin.*, 2004, 60, 5-pages 68-71.
- 79.Demarquet. M, Wallet. H L, Virelizier.EN, Nicolini .F-E, Une innovation thérapeutique : les inhibiteurs de tyrosine kinase de deuxième génération (ITK 2) dans le traitement de la LMC, *Bulletin du Cancer* vol. 98 N° 8 août 2011, pages : 859-869.
- 80.Deslandresa.M, Sibaudb.V, Chevreaua. C, Delorda. J-P, Effets secondaires cutanés des nouvelles molécules anticancéreuses: focus sur les molécules ciblant les récepteurs tyrosine kinase et le récepteur à l'EGF, *Annales de dermatologie* (2008), pages : 16-21.
81. Weisberg E, Manley PW, Breitenstein W, Brügger J, Cowan-Jacob SW, Ray A, et al. Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer cell*. 2005; 7(2):129-41.

-
82. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 8 août 2013; 122(6):872-84.
83. Bardin. C, Traitement de la leucémie myéloïde Chronique, *Leucémies chroniques* (2016), pages : 247-266.
84. *J Natl Compr Canc Netw (NCCN)* 2020; 18(10):1385–1415 doi: 10.6004/jnccn.2020.0047
85. European Leukemia Net 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia
86. Couic-marinier. F, pillonb François. *Actualité pharmaceutique, Traitement d'une leucémie myéloïde chronique*, Elsevier Masson SAS. n° 547, juin 2015, Pages 12-14.
87. Treuil Pascal, la leucémie myéloïde chronique et son traitement par l'Imatinib, *actualités pharmaceutiques*, n° 473, avril 2008. pages :25-30.
88. Nachi Mourad et al , la PCR digitale en gouttelettes , une nouvelle approche du suivi de la maladie résiduelle dans la leucémie myéloïde chronique .*journal Algérien de biochimie et de génétique médicales* Numero1/Décembre 2021.

Annexes

Matériel et méthode :

Annexe 1 :



Annexe 2 : Les automates

❖ Analyseurs de numération formule sanguine FNS (SYSMEX XT-4000i) :

Analyseurs de numération formule sanguine utilisent diverses technologies. Lorsque les échantillons de sang EDTA sont aspirés par l'analyseur, le sang est aliquoté (séparé en petites portions avant d'être utilisé dans les différents canaux) et traité avec différents réactifs pour révéler les propriétés spécifiques des cellules.

Les globules rouges et les plaquettes sont mesurés simultanément au niveau d'un orifice de comptage par la technique de l'impédance combinée à la focalisation hydrodynamique. Un réactif sans cyanure est utilisé pour mesurer l'hémoglobine par photométrie.

L'analyseur utilise la fluoro-cytométrie en flux comme principale méthode de détection pour la formule leucocytaire, la numération des réticulocytes et des érythroblastes.



Analyseurs de numération formule sanguine FNS (SYSMEX).

❖ **Spectrophotomètre (SpectraMax® Quick Drop™) :**

Le spectrophotomètre à microvolume permet de quantifier de très petites quantités d'ADN, d'ARN, d'oligos et de protéines. Il permet de mesurer des volumes de 0,5 µL d'échantillon, il possède un large plage d'absorbance (190 nm – 1100 nm).

La spectrophotométrie est une méthode qui consiste à mesurer l'absorbance, généralement en solution afin de déterminer la concentration de l'espèce colorée. Plus l'échantillon est concentré, plus il absorbe de lumière dans les limites de proportionnalité fixées par la loi de Beer-Lambert. Les analyses sont effectuées dans l'ultraviolet et le visible.



Spectrophotomètre (SpectraMax® Quick Drop™).

❖ **Le système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™:**

Le système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™ (système StepOne™) s'appuie sur le principe de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Il utilise des réactifs PCR basés sur le principe de la fluorescence pour assurer :

- La détection quantitative des séquences cible d'acide nucléique (cibles) par une analyse en temps réel.
- La détection qualitative des séquences cible d'acide nucléique (cibles) par une analyse en point final et une analyse de la courbe de fusion.

Pendant la PCR, le système StepOne collecte les données de fluorescence brutes en plusieurs points selon le type d'application :

| Type d'application | Point de collecte de données | Type d'application | Point de collecte de données |
|-------------------------------|---|---|------------------------------|
| Analyses en temps réel | Quantification absolue par les courbes standard | L'instrument collecte les données après chaque étape d'extension de la PCR. | |
| | Quantification relative par les courbes standard | | |
| | Comparaison des valeurs de CT ($\Delta\Delta CT$) | | |

Indépendamment du type d'application, chaque point de collecte de données ou lecture comporte trois phases :

- 1. Excitation :** L'instrument StepOne™ illumine tous les puits de la plaque, ce qui excite les fluorophores dans chaque réaction.
- 2. Émission :** L'optique de l'instrument StepOne collecte la fluorescence résiduelle émise par les puits de la plaque de PCR. L'image résultante, recueillie par le dispositif, est uniquement composée de la lumière correspondant à l'intervalle des longueurs d'ondes d'émission.
- 3. Collecte :** L'instrument StepOne crée une représentation numérique de la fluorescence résiduelle recueillie sur une période déterminée. Le logiciel StepOne™ conserve l'image fluorescente brute en vue de l'analyse.

Après une réaction de PCR, le logiciel StepOne utilise les données de calibration (spatiale, spectrale et du bruit de fond) pour déterminer l'emplacement et l'intensité des signaux fluorescents à chaque lecture, le fluorophore associé à chaque signal fluorescent et l'amplitude du signal.



Le système de PCR en temps réel Applied Biosystems StepOne™.

Autre :

- agitateur rotatoire. (1)
- centrifugeuses. (2)
- Les micropipettes. (3)
- Microscope optique. (4)



Annexe 3 : La RT-PCR :

1. Extraction de L'ARN :

Le kit "Pure Link™ Total RNA Blood kit" est optimisé pour une utilisation avec le sang total humain pour la stabilisation et l'extraction d'ARN.

A-Dans un tube stérile (Eppendorf) ajouter 100µl du sang frais + 500 µl de lysis buffer (L5).

B- incubation 10 min sur glace (vortex 2-3 times).

C-centrifuger à 4°C pendant 10 min à 400g.

D- éliminer le surnageant.

E- resuspendre le culot (leucocytes) dans 200 µl de (L5) + vortex.

F- centrifuger à 4°C pendant 5min à 400 g.

G-éliminer le surnageant. (Si le culot est encore rouge refaire l'étape pour avoir un culot blanc).

H- resuspendre le culot en 350 µl de lysis Buffer (L3) + vortex.

I- ajouter 350 µl de l'éthanol à 70% + vortex

J- préparer le filtre spin cartilage + collection tube et transféré le lysat de l'étape I.

K- centrifuger à 8000 g pendant 1min à t° ambiante.

L- recharger le tube collecteur.

M- ajouter 700 µl de Wash buffer (W4).

N- centrifuger à 8000 g pendant 30 sec à t° ambiante.

O- ajouter 500 µl de Wash buffer (W5).

P- centrifuger 8000 g pendant 30 sec à t° ambiante.

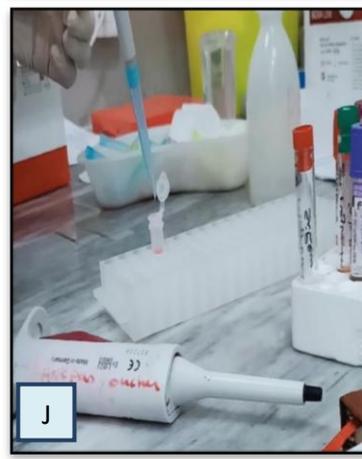
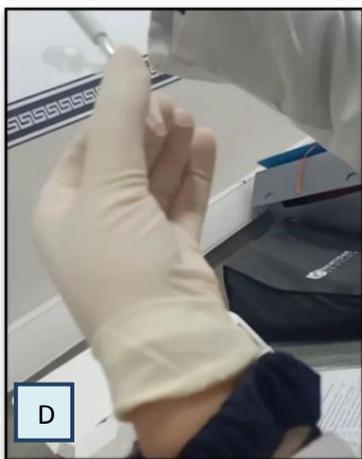
Q- ajouter 30-100 µl RNase – Free water au filtre dans un Eppendorf.

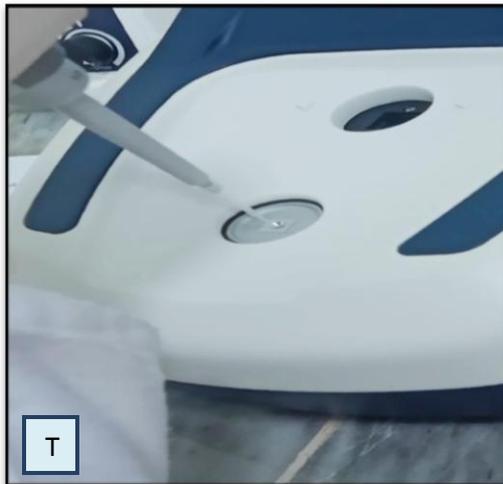
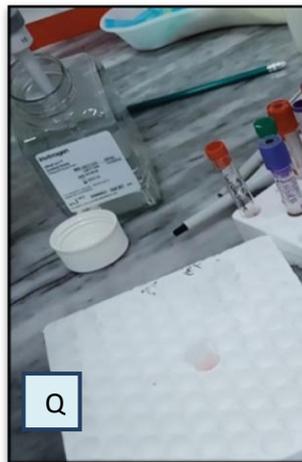
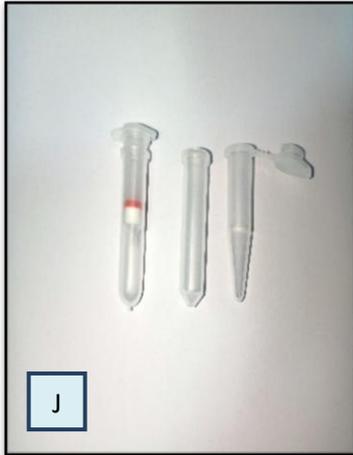
R- incubation 1min à t° ambiante.

S- centrifuger 8000g 1min A T ° ambiante.

T-la quantité d'ARN a été mesurée à l'aide d'un appareil de spectrométrie.

V-conservation de l'ARN dans une température -80 °C.





Les différentes étapes d'extraction de l'ARN.

2. REVERS TRANSCRIPTION :

Mode opératoire :

Le volume final à préparer est de 20 μ L.

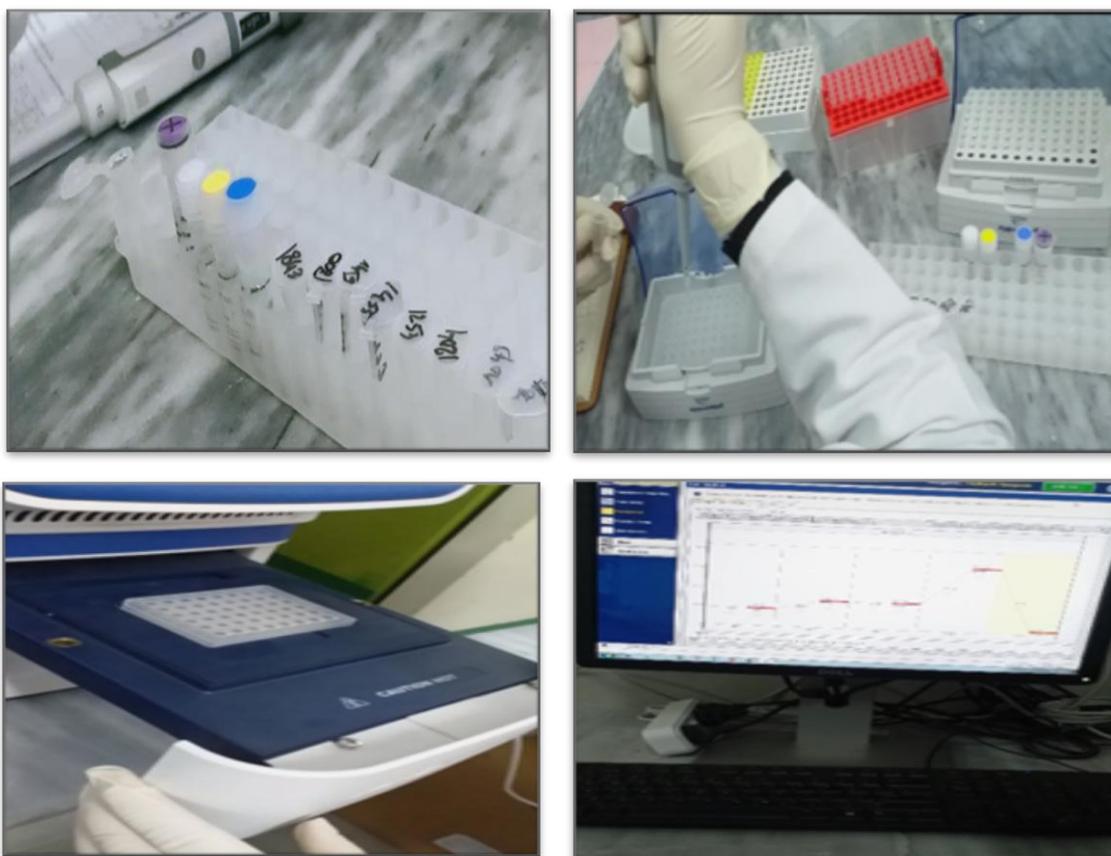
- 1) Laisser le composant du kit décongelé sur la glace.
- 2) Préparer le RT master mix dans un bain de glace selon le protocole ci –dessous :

| Composition (without RNase Inhibitor) | Volume |
|--|--------------|
| RT buffer | 2.0 μ L |
| dNTP Mix (100mM) | 0.8 μ L |
| RT Random primers | 2.0 μ L |
| Multscribes Revers Transcriptase | 1.0 μ L |
| Nuclease-free H ₂ O | 4.2 μ L |
| Totale per reaction | 10.0 μ L |

- 3) Placer le master mix 2X RT sur de la glace et mélanger doucement.
- 4) Mettre 10 ml de 2X RT master mix dans chaque puits.
- 5) Puis ajouter 10 ml de l'RNA des patients dans chaque puits.
- 6) Seller les puits avec un film adhésif.
- 7) Bien mélanger afin d'éliminer éventuelles bulles d'airs.
- 8) Placer la plaque dans le thermo cycler.
- 9) Régler le Template selon le schéma suivant :

| Settings | Step1 | Step2 | Step3 | Step4 |
|----------|-----------|------------|----------|-------|
| Temp | 25°C | 37°C | 85°C | 4°C |
| Time | 10minutes | 120minutes | 5minutes | 5min |

- 10) conservation de l'ADN complémentaire pendant 4h dans une température -20°C



Les différentes étapes de la reverse transcription.

3. PCR qualitative :

Le kit « TaqMAN® Universal PCR Master Mix » est utilisé pour la détection des mutations de gène BCR-ABL.

Protocole :**❖ Préparer le mélange réactionnel et charger la plaque :**

A- Décongeler sur de la glace et remettre complètement en suspension en agitant doucement au vortex puis centrifuger brièvement pour amener le liquide au fond du tube des :

- Taq Man gène expression assay (20X).
- échantillon d'ADNc.

B- Mélanger le réactif master mix en faisant doucement tourner le flacon.

C- Calculez le nombre de réactions dont vous avez besoin pour chaque dosage.

Assurez-vous d'inclure pour chaque échantillon d'ADNc :

- TaqMan gene expression assay (FAM)
- Control endogène (FAM)
- Control négatif

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

| PCR réaction MIX | Component Volume per 20- μ L réaction |
|-----------------------------------|---|
| TaqMan gène expression Assay | 1.0 μ l |
| TaqMan gène expression Master Mix | 10.0 μ l |
| cDNC patients | 4.0 μ l |
| RNase –free water | 5.0 μ l |

Contrôle positif :

| PCR réaction mix | Component Volume per 20- μ L réaction |
|-----------------------------------|---|
| Control endogène | 1.0 μ l |
| TaqMan gène expression Master Mix | 10.0 μ l |
| cDNC patients | 4.0 μ l |
| RNase –free water | 5.0 μ l |

Contrôle négatif :

| PCR réaction mix | Component Volume per 20- μ L réaction |
|-----------------------------------|---|
| RNase-free water | 1.0 μ l |
| TaqMan gène expression Master Mix | 10.0 μ l |
| cDNC patients | 4.0 μ l |
| RNase –free water | 5.0 μ l |

E- Mètre le mélange dans les puits d'une plaque et l'ADNc pour chaque patient.

F- Scellez la plaque avec le film adhésif.

G- Centrifuger brièvement la plaque.

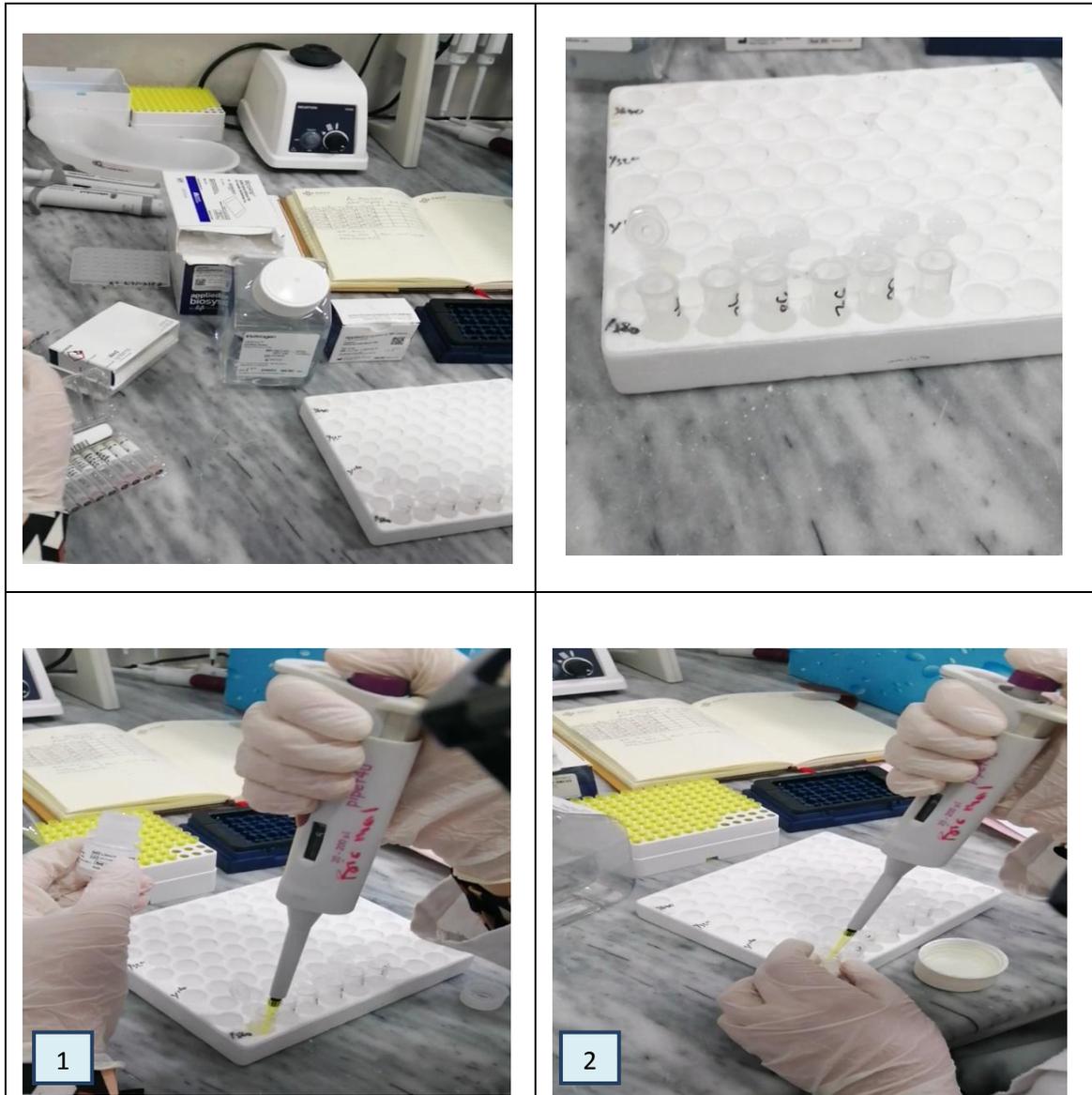
H- Charge la plaque dans l'instrument.

❖ **Crées un Template et exécuter la réaction :**

1. Créez un Template en utilisant le programme correspondant à la courbe standard relative ou la méthode CT comparative et les données suivant :

| | | | stage | T°C | Time Min :ss |
|----------|------------|--|-------|-----|-----------------|
| Standard | 48 Well | <ul style="list-style-type: none"> Rxn.volume :20 µl Ramp speed : Standard | Hold | 50 | 02 : 00 |
| | | | Hold | 95 | 10 : 00 |
| | | | Cycle | 95 | 00 : 15 |
| | | | | 60 | 01 : 00 |

2. Exécutez la plaque.



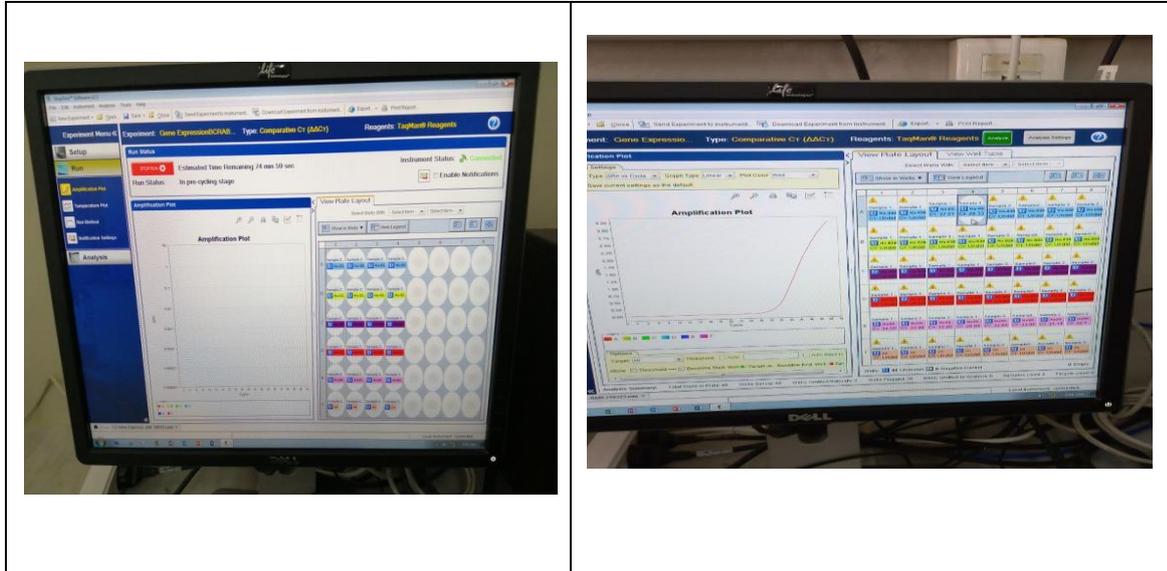


Les différentes étapes de la détection des mutations BCR-ABL.

4. Analysez les résultats :

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

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



Les tracés d'amplification pour l'ensemble de la plaque.