



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique
جامعة البليدة 1
Université Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologies

Laboratoire de recherche sur les hémopathies malignes et les
hémoglobinopathies

Faculté de médecine

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme d'un Master Académique

Option

Biotechnologie et Pathologies Moléculaires

Thème

**Les anomalies « major route » au diagnostic d'une leucémie
myéloïde chronique (LMC)**

Présenté par : M^{me} DRAI YASMINE RABEA

Devant le Jury :

M ^{me} AÏSSANI-EL FERTAS R.	MCB	SNV, Blida 1	Présidente
M ^{me} GUESAIBIA N.	MCA	SNV, Blida 1	Examinatrice
M ^{me} TAOUSSI S.	Prof	EHS-CAC, Blida	Promotrice
M ^{me} RAHIM I.	MCB	SNV, Blida 1	Co-Promotrice
M ^{me} BOUCHAKOUR A.	MCA	EHS-CAC, Blida	Invitée

Session 2019/ 2020

Remerciements

La rédaction de ce manuscrit venant clore l'aventure que constitue un mémoire, je tiens donc à exprimer mes sincères remerciements à tous ceux qui ont joué un rôle dans sa concrétisation.

Je remercie ma promotrice **Professeur Taoussi Souad**, d'avoir accepté de m'encadrer, pour son soutien, pour son suivi et les connaissances qu'elle m'a permis d'acquérir en cytogénétique. Qu'elle trouve ici mes sentiments de gratitude et l'expression de ma vive reconnaissance.

Je remercie ma Co promotrice **Docteur Rahim Ibtissem**, pour sa patience, sa disponibilité et ses conseils qui m'ont aidé à élaborer ce travail.

J'adresse mes plus sincères remerciements à l'ensemble du jury d'avoir accepté de juger mon travail et d'y apporter un regard critique. Mes vifs remerciements vont à la présidente du jury le **Docteur Aissani El Fertas Radia**, qui nous a fait l'honneur d'avoir accepté de présider le jury. Mes remerciements vont également au **Docteur Guessaibia Nadia** qui a accepté d'examiner ce modeste travail.

Je tiens aussi à remercier le **Professeur Bouchakour Amina** pour son orientation, son aide précieuse et les conseils qu'elle m'a prodigué tout au long de mon stage pratique.

Je remercie chaleureusement le **Professeur Bradai Mohamed** chef de service d'hématologie du Centre Anti Cancer (CAC) de Blida, ainsi que tout son personnel médical et paramédical, en particulier l'équipe du laboratoire de cytogénétique qui m'a permis d'apprendre et qui m'a soutenue.

J'adresse mes plus profonds remerciements à mes chers parents de m'avoir toujours poussée de l'avant, car sans eux je ne serais pas où je suis aujourd'hui. Ainsi que ma grande famille paternelle et maternelle, mes amis et toutes les personnes qui m'ont encouragé.

Enfin, je remercie tous les enseignants de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie présents au cours de mon cursus universitaire, spécialement les enseignants de ma spécialité en master d'avoir été à la hauteur et à leur Tête **Professeur Djazouli-Alim Zahra**, qui veille sur notre confort et qui est judicieuse avec ses étudiants.

Introduction.....	1
Chapitre I. Données bibliographiques	
I. 1. Leucémie myéloïde chronique.....	2
I.1.1. Définition.....	2
I.1.2. Historique.....	3
I.1.3. Epidémiologie de la LMC.....	4
I.1.4. Facteurs Etiologiques de la LMC	4
I.1.5. Diagnostic de la LMC.....	5
I.1.6.Évolution de la LMC.....	6
I.1.7. Facteurs pronostics.....	7
I.2. Physiopathologie de la LMC « Leucémogénèse ».....	8
I.3. Les anomalies chromosomiques additionnelles ACA.....	13
I.4. Traitements de la LMC.....	16
Chapitre II. Matériel et méthodes	
II.1. Matériel.....	20
II. 2. Méthodes.....	21
II.2.1. Prélèvement et mise en culture.....	23
II.2.2. Caryotype standard.....	25
II.2.3. Hybridation <i>In Situ</i> Par Fluorescence « FISH ».....	28
Chapitre III. Résultats et discussion	
III.1. Résultats épidémiologiques.....	29
III.2. Résultats clinico-biologiques.....	32
III.3. Résultats des données cytogénétiques au diagnostic.....	39
III.4. Anomalies cytogénétiques additionnelles (ACA).....	43
Conclusion.....	48
Références bibliographiques.....	51

Annexe

Liste des figures

Figure 1. Représentation schématique de la translocation chromosomique t (9 ; 22) et la formation d'un gène de fusion chimérique BCR-ABL.....	1
Figure 2. Représentation schématique de l'hématopoïèse normale et leucémique.....	7
Figure 3. Schéma représentant des parties des deux gènes BCR et ABL impliqués dans la formation du chromosome Philadelphia t(9, 22).....	9
Figure 4: Représentation schématique de la voie moléculaire activée par le BCR-ABL.....	10
Figure 5. Répartition des ACA sur 2013 patients.....	15
Figure 6. Diagramme récapitulatif des étapes de la culture cellulaire.....	21
Figure 7. Etalement du culot cellulaire sur lames pour le caryotype.....	23
Figure 8. Etapes de dénaturation et de coloration au Giemsa.....	24
Figure 9. Observation microscopique des résultats du caryotype d'un patient atteint de LMC mettant en évidence le chromosome de Philadelphie.....	24
Figure 10. Diagramme récapitulatif des étapes de la technique de FISH. 2SCC : Saline-sodium citrate buffer.....	27
Figure 11. Lecture microscopique d'une lame d'un patient atteint de LMC diagnostiqué par FISH de diagnostic.....	27
Figure 12. Répartition des patients selon le sexe.....	29
Figure 13. Répartition des patients selon l'âge et le sexe.....	30
Figure 14. Répartition des patients selon l'origine géographique.....	32
Figure 15. Représentation de circonstances symptomatologiques orientant au diagnostic de la LMC.	33
Figure 16. Délais de diagnostic par mois pour le nombre total des patients.....	35
Figure 17. Frottis d'un patient atteint de LMC montrant une hyperleucocytose, polynucléose neutrophile et myélémie. Coloration MGG A :Gx40.....	37
Figure 19. Statut des patients (phases de la LMC) dans notre cohorte.....	39
Figure 20. Caryotype humain normal (A) et caryotype typique d'une LMC montrant une translocation t(9 ;22) (q34 ;q11.2).....	41
Figure 21. FISH sur chromosomes.....	42
Figure 22. Caryotype de LMC montrant des ACA majeures	44
Figure 23. FISH : LMC : BCR-ABL dupliqué.....	44

Liste des tableaux

Tableau I. Récapitulatif des circonstances de découverte de la LMC	6
Tableau II. Avantages et inconvénients du caryotype.....	25
Tableau III : représentant les avantages et les inconvénients de la FISH.....	28
Tableau IV. Répartition des patients suspectés de LMC selon l'âge.....	30
Tableau V. Résultats de l'hémogramme chez les patients suspectés de LMC.....	36
Tableau VI. Résultats de la FISH et du caryotype.....	40
Tableau VII. Caractéristiques des patients présentant des ACA majeures	45

Liste des abréviations

ACA	Anomalies Chromosomiques Additionnelles.
CAC	Centre Anti Cancer
CSH	Cellules souches hématopoïétique
FISH	Hybridation in situ par fluorescence.
FNS	Numération formule sanguine
ITK	Inhibiteur de tyrosine kinase.
LA	Leucémie aigue.
LAM	Leucémie myéloïde aiguë.
LMC	Leucémie myéloïde chronique.
MO	Moelle osseuse.
PCR	Réaction en chaine polymérase
Ph	Chromosome de Philadelphie.
PLC	Progéniteurs lymphoïdes communs
PMC	Progéniteurs myéloïdes communs
RQ-PCR	Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction.
RT-PCR	Real-Time Polymerase Chain Reaction.
9q	Bras long du chromosome 9.
22q	Bras long du chromosome 22.

Glossaire

Adénopathies : c'est une hypertrophie des ganglions du système immunitaire appelés les nœuds lymphatiques en réponse à des infections, l'atteinte de plusieurs nœuds peut indiquer la présence d'un cancer (**Alana, 2018**)

Blastose : C'est la présence de cellules immatures indifférenciées de la moelle osseuse appelées blastes dans le sang ou dans la moelle osseuse. C'est cellules ne sont pas présentes normalement dans le corps et elles sont spécifique aux cas leucémiques (**American cancer society, 2020**)

Chloromes des tissus mous : c'est une tumeur verdâtre rare et cancéreuse des tissus conjonctifs et mous qui se développe en présence d'une leucémie myéloïde, elle apparait dans les os, la peau, les ganglions, les seins et plusieurs d'autres organes du corps.

Débord splénique (DS): est un calcul de la distance entre le rebord costale et le bord inférieur de la rate lors de l'examen clinique.

ELN (*European Leukemia Net*) : c'est une base de recherche par excellence sponsorisée et publique. Son objectif est de traiter les leucémies par l'intégration de la recherche européenne sur la leucémie (**ELN, 2018**)

Néoplasies myéloprolifératives (NMP) : sont un groupe d'hémopathies acquises, formés lors d'une production excessive de globules blancs ou rouges ou des plaquettes par la moelle osseuse. Il existe six types de néoplasmes myéloproliférative dont la leucémie myéloïde chronique (LMC) (**Cancer Support Community, 2020**).

Réponse cytogénétique complète (RCyC) : est définie par l'incapacité à détecter le chromosome de Philadelphie dans la moelle osseuse selon l'«étude cytogénétique (**European society for medical oncology ESMO., 2013 ; Leukemia and lymphoma society, 2018**).

Réponse moléculaire complète (RMC) : signifie qu'environ 0,0032 % des cellules (1 sur 32 000) contiennent le gène BCR-ABL1. Pour conclure à ce type de réponse, il est nécessaire de faire appel à un laboratoire ayant la capacité de détecter une réduction logarithmique d'au moins 4,5. Les patients qui obtiennent et réussissent à maintenir une réponse moléculaire profonde pendant au moins deux ans peuvent envisager l'arrêt du traitement médicamenteux. (**Leukemia and lymphoma society, 2018**)

Réponse moléculaire majeure (RMM) : correspond à un BCR-ABL1 < 0,1 %. Autrement dit, 1 cellule sur 1 000 porte le gène BCR-ABL1. C'est ce que l'on appelle une « réduction logarithmique de 3 » (**Leukemia and lymphoma society, 2018**).

Réponse moléculaire précoce (RMP) : correspond à des taux de BCR ABL <10% (réduction logarithmique de 1) 3 et 6 mois après le début du traitement. Cette mesure permet de prédire la probabilité de réponse du patient à long terme (**Leukemia and lymphoma society, 2018**)

Single nucléotide polymorphisms (SNP) : sont des variations génétiques uniques et très communes, chaque SNP représente une différence dans un seul nucléotide. Ils peuvent survenir normalement dans un ADN et on peut retrouver environ 4 à 5 millions de SNP dans un seul génome dont la majorité ne présente aucun effet sur la santé et le développement. (**US. National Library of Medicine, 2020**)

Treatment Free Remission (TFR) : On parle de rémission sans traitement (RST) lorsqu'un patient qui arrête le traitement par les inhibiteurs de tyrosines kinases ITK arrive à maintenir une réponse moléculaire majeure (RMM) sans devoir reprendre le traitement. (**Leukemia and lymphoma society, 2018**)

Résumé

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une hémopathie maligne chronique actuellement bien prise en charge par les inhibiteurs de tyrosine kinases (ITK).

Cependant, du fait de l'existence chez certains patients d'anomalies cytogénétiques additionnelles (ACA) surajoutées, le pronostic de cette maladie peut être modifié.

L'objectif de notre étude est d'évaluer la répartition des ACA dans une population de la région Centre-Ouest de l'Algérie sur une cohorte de 34 patients atteints de Leucémie myéloïde chronique (LMC), nous avons conduit une étude rétrospective par caryotype en bandes R et hybridation fluorescente *In Situ* (FISH).

Il s'agit de 23 hommes et 11 femmes (sexe ratio : H/F = 2,1) dont l'âge médian était de 46,8 ans (21-85). Parmi ces patients deux étaient exposés à des facteurs de risque (benzène). Le délai diagnostique était supérieur à 3 mois dans un tiers des cas. La splénomégalie, souvent très volumineuse a été le signe clinique le plus probant (85% des cas).

Sur le plan biologique, l'anémie était quasi constante dans les deux sexes. L'hyperleucocytose, hormis un cas, a été retrouvée chez tous les autres patients, elle est souvent majeure. La myélémie était constante, supérieure à 20% chez 85% des patients. La pratique d'un myélogramme nous a permis de classer nos patients en phase chronique dans 88% des cas, en phase accélérée dans 4% des cas et en phase acutisée (ou blastique) dans 8% des cas. Ces faits traduisent une évolution défavorable de certains patients avant même l'institution d'un traitement.

Deux méthodologies diagnostiques génétiques ont été appliquées aux patients de notre étude : le caryotype en bandes R et la FISH. En plus de la confirmation du diagnostic de la LMC par ces deux procédures, des anomalies cytogénétiques additionnelles ACA majeures ont été retrouvées dans 8,8% des cas, rejoignant ce qui est décrit dans la littérature. Ces ACA ont eu un impact pronostique défavorable chez les patients qui les ont présentées.

Mots clés : LMC, ACA, Cytogénétique, Caryotype en bandes R, FISH

Abstract

Chronic myeloid leukemia (CML) is a chronic hematologic malignancy that is currently well managed by anti-tyrosine kinases (ITK).

However, due to the existence in some patients of additional cytogenetic abnormalities (ACA) added the prognosis, this disease may be altered.

To assess the distribution of ACA in a population of the Center-West region of Algeria on a cohort of 34 patients with chronic myeloid leukemia (CML), we conducted a retrospective study by R banding karyotype and fluorescent *In Situ* hybridization (FISH).

There are 23 men and 11 women (sex ratio = 2.1) with a median age of 46.8 years (21-85). Among these patients, two were exposed to risk factors (benzene). The diagnostic delay was greater than 3 months in a third of the cases. Splenomegaly, often very large, was the most convincing clinical sign (85% of cases).

Biologically, anemia was almost constant in both sexes. Hyperleukocytosis, except one case, was found in all other patients, often major. Myeemia was constant, greater than 20% in 85% of patients. The practice of a myelogram allowed us to classify our patients as chronic phase in 88% of cases, accelerated phase in 4% of cases and acute phase (or blast) in 8% of cases. These facts reflect an unfavorable outcome for some patients even before the initiation of treatment.

Two genetic diagnostic methodologies were applied to the patients in our study: R banding karyotype and FISH. In addition to the confirmation of the diagnosis of CML by these two procedures, additional major cytogenetic abnormalities were found in 8.8% of cases, consistent with what is described in the literature. These ACAs had an unfavorable prognostic impact in patients who presented them.

Keywords: CML, ACA, Cytogenetics, R banding Karyotype,

ملخص

ابيضاض الدم النقوي المزمن (CML) هو ورم دموي خبيث مزمن يتم إدارته بشكل جيد حاليًا عن طريق علاج بواسطة مضادات التيروزين كيناز (TKIs) مع ذلك ، نظرًا لوجود شذوذ خلوي إضافي (ACA) في بعض المرضى ، قد يتغير تشخيص هذا المرض.

لتقييم توزيع ACA في مجموعة من سكان منطقة الوسط الغربي بالجزائر متكونة من 34 مريضًا يعانون من سرطان الدم النخاعي المزمن (CML) ، أجرينا دراسة بأثر رجعي عن طريق النمط النووي (caryotype) والتهجين الفلوري في الموقع (FISH).

لدينا 23 رجلاً و 11 امرأة (نسبة الجنس = 2.1) بمتوسط عمر 46.8 سنة (21-85). من بين هؤلاء المرضى تعرض اثنان لعوامل الخطر (البنزين). كان التأخير في التشخيص أكثر من 3 أشهر في ثلث الحالات. كان تضخم الطحال ، الذي غالبًا ما يكون كبيرًا جدًا ، هو العلامة السريرية الأكثر إقناعًا (85 ٪ من الحالات). من الناحية البيولوجية ، كان فقر الدم ثابتًا تقريبًا في كلا الجنسين. تم العثور على إفراط في الكريات البيض، باستثناء حالة واحدة في جميع المرضى الآخرين وغالبًا ما تكون كبيرة. كان نقاء الدم ثابتًا في أكثر من 20٪ في 85٪ من المرضى. سمحت لنا ممارسة تصوير النخاع بتصنيف مرضانا كمرحلة مزمنة في 88٪ من الحالات ، ومرحلة متسارعة في 4٪ من الحالات ومرحلة حادة (أو انفجار) في 8٪ من الحالات. تعكس هذه الحقائق نتائج غير مواتية لبعض المرضى حتى قبل بدء العلاج.

تم تطبيق طريقتين للتشخيص الجيني للمرضى في دراستنا: النمط النووي و FISH بالإضافة إلى تأكيد تشخيص سرطان الدم النخاعي المزمن من خلال هذين الإجراءين ، تم العثور على شذوذ خلوي رئيسي إضافي ACA في 8.8 ٪ من الحالات ، الذي يتوافق مع ما هو موصوف في الأدبيات. كالشذوذ الخلوي ACA عند المرضى الذين يتعالجون بمضادات التيروزين كيناز ITK تأثير سلبي.

Introduction

Introduction

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une hémopathie maligne du groupe des syndromes myéloprolifératifs. C'est une maladie de la cellule souche hématopoïétique caractérisée par une prolifération médullaire de cellules granuleuses matures et immatures avec passage en bloc vers le sang périphérique (**Cumano, 2007**).

Les cellules de la LMC sont porteuses d'une anomalie chromosomique structurale acquise, le chromosome Philadelphie (Ph1), résultat d'une translocation réciproque équilibrée entre les chromosomes 9 et 22 [t(9 ;22)] aboutissant à un transcrite de fusion BCR-ABL au niveau moléculaire (**Bonnet, 1997 ; Zhou et Xu., 2015**).

Dans cette affection d'évolution chronique, en plus du chromosome Ph1, des anomalies cytogénétiques additionnelles (ACA) peuvent exister au moment du diagnostic de la maladie.

L'impact de ces ACA sur l'évolution de la maladie est diversement apprécié ; pour certains, la présence d'ACA majeures est corrélée à une évolution défavorable ; pour d'autres, avec l'avènement des thérapies ciblées, les antis tyrosine kinase, cet impact péjoratif est gommé (**Roche-Lestienne et al., 2016**).

Le but de notre étude rétrospective est d'évaluer la fréquence des ACA majeures (« major route ») et leurs impact sur le pronostic d'une population de LMC diagnostiquées et suivies au service d'Hématologie du Centre Anti Cancer (CAC) de Blida.

Pour ce faire, nous avons recherché les ACA majeures (« major route ») chez 34 cas de LMC à l'aide de techniques de cytogénétique, caryotype en bandes R et Hybridation *In Situ* Fluorescente (FISH) avec des sondes BCR ABL.

Chapitre I. Données Bibliographiques

I. Données bibliographiques

I. 1. Leucémie myéloïde chronique

I.1.1.Définition

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une hémopathie maligne rare appartenant au groupe des Néoplasies myéloprolifératives (NMP) chroniques. Il s'agit d'un syndrome myéloprolifératif clonal chronique à prédominance granuleuse, caractérisé par une prolifération myéloïde clonale affectant la Cellule Souche Hématopoïétique (CSH) pluripotente et conduisant à l'expansion clonale des cellules différenciées de la lignée myéloïde dans la moelle osseuse et le sang (**Roche-Lestienne et al., 2016**).

Sur le plan cytogénétique, la LMC est caractérisée par une anomalie chromosomique acquise unique dénommée « chromosome Philadelphie (Ch-Ph I) » (retrouvée dans 95% des cas) qui correspond à un chromosome 22 raccourci résultant de la translocation réciproque (sans perte du matériel génétique) entre les bras longs des chromosomes 9 et 22 $t(9;22)(q34;q11)$ (**Goldman et al., 2003**)(**Figure 1**). La conséquence de cette translocation est la formation d'un gène de fusion chimérique BCR-ABL1, qui code pour une protéine chimérique, la protéine p210 BCR-ABL1 de 210 kDa qui est le plus fréquemment retrouvée chez les patients atteints de LMC. 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 (**Figure 1**)(**Dine et al., 2013 ;Dorfman et al., 2018**).

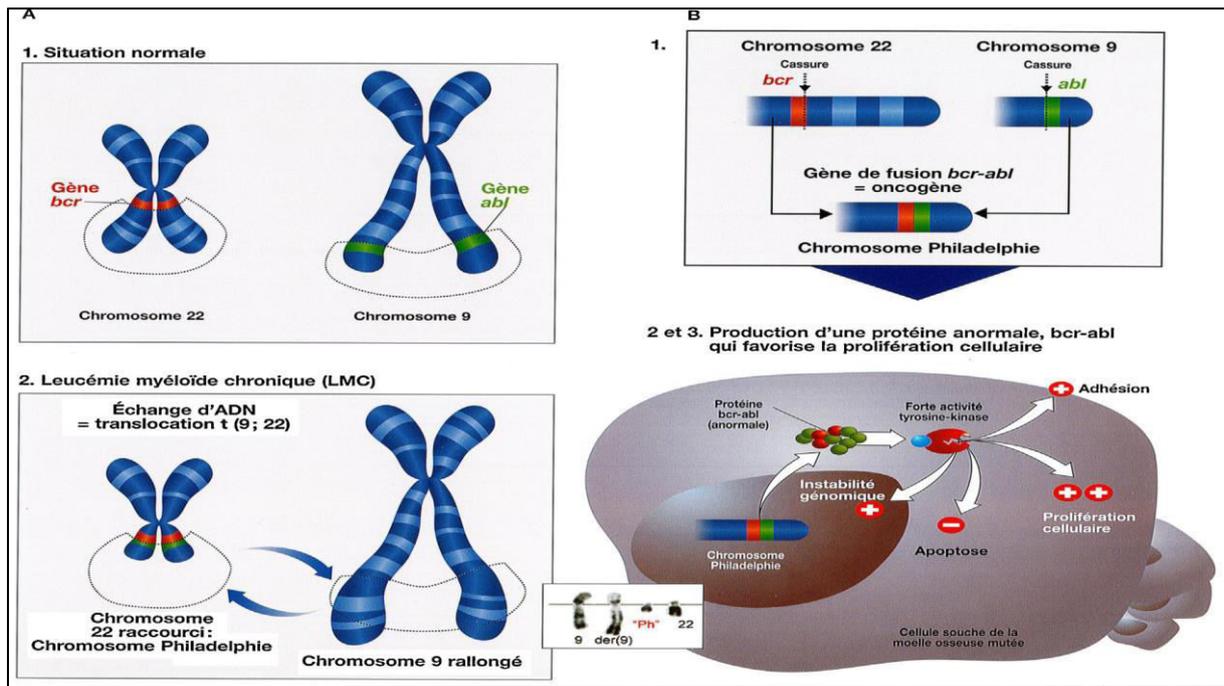


Figure 1. Représentation schématique de la translocation chromosomique t(9 ; 22) et la formation d'un gène de fusion chimérique BCR-ABL. A : échange d'ADN entre deux chromosomes 9 et 22 dans les cellules souches de la moelle osseuse ; B : apparition du gène de fusion anormal BCR-ABL qui code pour une protéique chimérique (**Dine et al., 2013**).

I.1.2. Historique

En 1845 Bennet décrit pour la première fois la LMC devant l'association d'une splénomégalie, d'une anémie et d'une granulocytose massive (**Gonon-Demoulian et al., 2014**).

En 1878, Neumann en a déduit que la maladie avait son origine dans la moelle osseuse et l'a appelé "leucémie myéloïde (**Deininger, 2008**).

En 1960, Nowel et Hungerford identifient un petit chromosome présent dans la LMC nommé chromosome de Philadelphie (ville où il a été découvert) (**Nowel et Hungerford., 1960**).

En 1973, Janet Rowley découvre que le chromosome Ph1 est le résultat d'une translocation réciproque entre les bras longs des chromosomes 9 et 22 (**Rowley, 1973**).

En 1982, De Klein et *al* montrent que l'oncogène Abelson (ABL) est transloqué du chromosome 9 au chromosome 22 pour former le chromosome Ph1 (**De Klein et al., 1982**).

En 1984, Prakash et Yunis, ont situé les points de rupture dans la LMC aux sous-bandes 22q11.21 et 9q34.1 (**Prakash et Yunis., 1984**).

En 1985, Shtivelman et *al* découvrent qu'un ARN de 8 kb spécifique à la LMC est une transcription fusionnée des 2 gènes BCR et ABL. La protéine fusionnée est vraisemblablement impliquée dans le processus malin (**Shtivelman et al., 1985**).

I.1.3. Epidémiologie de la LMC

La LMC est un cancer rare, représentant 2 à 5% des leucémies de l'enfant (**leguay et Mahon., 2005**) et environ 15 % des leucémies de l'adulte (**American cancer society, 2020**). Elle affecte les deux sexes, avec une légère prédominance masculine, le sex-ratio Homme/Femme est estimé à 1,3(**Hughes et al., 2014**).

Son incidence est relativement faible, estimée entre 1 et 1,5/100 000 habitants. Cependant sa prévalence est en augmentation en raison des progrès observés en terme de survie après l'introduction des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) (**Hughes et al., 2014**).

Elle augmente avec l'âge, passant d'un cas pour 1 million d'enfants de moins de 10 ans, à plus de 30 pour 1 million d'individus après 60 ans. L'âge médian au moment du diagnostic est variable selon les séries et se situe entre 30 et 60 ans (**Castagnetti et al., 2015**).

L'incidence globale en Algérie est de 0,53/100 000 habitants. Cette incidence est restée relativement stable de 2010 à 2014. L'âge médian au diagnostic est de 48 ans et on décrit une atteinte préférentiellement masculine avec un sex-ratio Homme/Femme de 1,2 (**Djouadi et al., 2017**)

Le taux de survie est actuellement estimé à 80%, et le taux de survie sans progression de la maladie est estimé à 86% depuis l'avènement de la thérapie par les anti-tyrosines kinases (**Roche-Lestienne et al., 2016 ; Dorfman et al., 2018**)

I.1.4. Facteurs Etiologiques de la LMC

L'étiologie de la leucémie myéloïde chronique LMC est méconnue. Cependant, elle est inscrite au tableau des maladies professionnelles (no 6 du régime général et no 20 de la régime agricole). Sa fréquence est corrélée à certaines expositions environnementales comme

l'exposition aux radiations ionisantes étant le seul facteur de risque prédisposant de LMC (**Deininger et al., 1998 ; American Society of Clinical Oncology, 2016**). En effet, le rôle des **radiations ionisantes** dans l'apparition des leucémies a été le premier à être décrit, à partir de la cohorte des survivants de Hiroshima et Nagasaki, chez lesquels un excès de cas de leucémie a été retrouvé (**Heyssel et al., 1960**).

L'exposition à long terme au **benzène** est un autre facteur de risque faisant de cette affection une maladie professionnelle (**Imbernon, 2003**).

Néanmoins, une méta-analyse portant sur 14 études publiées entre 1984 et 2004 a permis de confirmer une association possible entre une **exposition aux pesticides** (herbicides phénoxyacétiques) et le développement d'une LMC chez les agriculteurs ou fermiers (**Van Maele-Fabry et al., 2008**).

Des **facteurs génétiques** héréditaires ont été incriminés dans la survenue de la translocation. En effet, plusieurs SNP (single nucleotide polymorphisms) ont été identifiés comme pouvant être associés à une prédisposition à développer une LMC (**Huh et al., 2011 ; Bruzzoni-Giovanelli et al., 2015**). (exemple : SNP rs6931104 diminue l'affinité de liaison de TF RFX3 ; il réduit également l'expression de RMND, ce qui suggèrent qu'une réduction des niveaux d'expression du RMND1, qui sert de gène suppresseur de tumeur, est associée à la pathogenèse de la LMC (**Woo et al., 2019**) ; Un modèle d'arbre de classification a identifié cinq SNP appartenant aux gènes PSMB10, TNFRSF10D, PSMB2, PPARD et CYP26B1, qui étaient associés à une prédisposition à la LMC (**Bruzzoni-Giovanelli et al., 2015**).

L'âge et le genre constituent également des facteurs de risque de la LMC qui augmente avec l'âge et semble être plus fréquente chez les hommes que chez les femmes (**American Society of Clinical Oncology, 2016**).

I.1.5. Diagnostic de la LMC

Une leucémie myéloïde chronique peut être suspectée chez des patients en présence de symptômes ou suite aux résultats anormaux d'une prise de sang (frottis/hémogramme), parfois réalisée en l'absence de symptômes (patients asymptomatiques)(**Bennour et al., 2015**).

Les symptômes et les manifestations cliniques peuvent inclure une splénomégalie, une fatigue, des saignements...etc (**Tableau 1**).

Un hémogramme (FNS) et un frottis sanguin sont nécessaires afin d'évaluer les cellules sanguines (Globules blancs, globules rouges et plaquettes) chez les patients symptomatiques (**Bennour et al., 2015**).

Si un diagnostic de LMC est suspecté sur la base des symptômes et de la numération des leucocytes, une biopsie de la moelle osseuse est nécessaire (myélogramme). Dans la majorité des cas, les cellules leucémiques trouvées dans l'hémogramme/myélogramme fournissent une quantité de cellules suffisante pour évaluer la présence du chromosome de Philadelphie.

Le chromosome de Philadelphie, t(9;22) peut être détecté par des méthodes cytogénétiques conventionnelle (caryotype en bandes R) et/ou moléculaires (FISH) (RT-PCR) (**Bennour et al., 2015**).

I.1.6.Évolution de la LMC

En l'absence de traitement, la LMC évolue classiquement en trois phases: une première phase dite «chronique», pauci symptomatique, suivie d'une deuxième phase, caractérisée par une accélération de la maladie, et enfin une troisième phase blastique, appelée « transformation aiguë », prenant l'aspect d'une leucémie aiguë secondaire, résistante ou réfractaire au traitement, conduisant à un décès du patient (**Tableau I**) (**Dine et al., 2013 ; Hochhaus et al., 2020**).

- **La phase chronique** qui peut rester stable durant plusieurs années et qui reste asymptomatique, suspecté devant un hémogramme réalisé à titre systématique (40 % des cas) avec moins de 6 % des cellules du sang ou de la moelle osseuse sont alors anormales donc blastiques (**O'Brien et al., 2003**). Un traitement est proposé dès le stade chronique pour éviter l'évolution de la leucémie myéloïde chronique vers les phases suivantes.
- **Durant la phase accélérée** : Sa durée est de 12 à 18 mois en moyenne, on compte 6 à 30 % de cellules blastiques. Elles commencent à perturber la différenciation des autres cellules du sang. Elle peut être insidieuse ou présente une aggravation de l'anémie, une splénomégalie et une infiltration d'organes. Elle est caractérisée également par une augmentation de la blastose sanguine et médullaire, une thrombopénie et sur le plan cytogénétique, une acquisition d'anomalies cytogénétiques additionnelles (ACA) témoignant d'une instabilité génétique accrue (**Tableau I**).
- **La phase dite « blastique »** de la maladie est une phase d'accutisation. Elle survient avec un délai médian de 4 ans et se définit par la présence de plus de 20% de blastes

Chapitre I. Données bibliographiques

médullaires ou plus de 30 % de blastes et promyélocytes sanguins ou médullaires (**Fondation ARC pour la recherche sur le cancer., 2020**). Elle s'accompagne en général d'une majoration des signes cliniques d'accélération (altération de l'état général, splénomégalie, anémie, thrombopénie, fibrose médullaire) et parfois d'une symptomatologie propre : fièvre, hépatomégalie, adénopathies et douleurs osseuses. Comme toute leucémie aiguë, elle est possiblement accompagnée d'un syndrome tumoral et de signes d'insuffisance médullaire (**Tableau I**). Ce stade, qui évolue rapidement, met en jeu la vie du patient. Des localisations blastiques extra médullaires peuvent également se voir, notamment une atteinte méningée ou des chloromes des tissus mous (**Leguay et Mahon., 2005**).

La distinction entre ces trois phases est une étape déterminante du diagnostic de la LMC, car cela va conditionner les prises en charge thérapeutiques très différentes (**Baccarani et al., 2013**).

Tableau I. Récapitulatif des circonstances de découverte de la LMC (Zerouali, 2019 ; Apperley, 2015).

Fréquent	Moins fréquent
<ul style="list-style-type: none">• Fatigue• Sueurs nocturnes• Malaise et perte de poids• Douleur dans l'hypochondre gauche, gêne, satiété• Splénomégalie	<ul style="list-style-type: none">• Acquisition d'anomalies cytogénétiques en cas du développement de la maladie.• Hémorragies rétiniennes• Thrombose, saignement ou les deux• Douleur osseuse• Hépatomégalie• Lymphadénopathie• Infiltration cutanée• Masse extramédullaire (chlorome).

I.1.7. Facteurs pronostics

Les facteurs pronostics dans la LMC sont déterminés par des scores : le plus utilisé a été décrit par Sokal et *al* en 1984, il classe les patients selon l'âge, la taille de la rate, le pourcentage de blastes sanguins et le nombre de plaquettes. Grâce à des calculs logarithmiques, un indice est établi isolant trois groupes de risque avec des survies différentes : faible risque (score <0,8), risque intermédiaire (score entre 0,8 et 1,2), haut risque (score >1,2) (**Hernandez-Boluda et al., 2009 ; Dupraz, 2014**).

I.2. Physiopathologie de la LMC « Leucémogénèse »

Dans les conditions physiologiques, l'hématopoïèse assure le renouvellement continu de toutes les cellules sanguines (lymphocytes, granulocytes, monocytes, hématies et plaquettes) à partir d'un nombre très restreint de CSH. Ce système hiérarchisé comporte à son sommet les CSH qui donnent naissance aux progéniteurs (myéloïde et lymphoïde), puis aux précurseurs et enfin aux cellules différenciées. Le maintien de l'homéostasie des cellules sanguines fait intervenir des étapes de prolifération, de différenciation et de mort cellulaire. Chacune de ces étapes nécessite la participation d'un réseau complexe de protéines et de voies de régulation dont l'altération peut déclencher ou contribuer au processus de leucémogénèse (**Chomel et al., 2014**)(Figure 2).

Dans les conditions physiopathologique de la LMC, un trouble clonal malin des CSH entraîne une augmentation non seulement des cellules myéloïdes mais aussi des cellules érythroïdes et des plaquettes dans le sang périphérique et une hyperplasie myéloïde marquée dans la moelle osseuse (**Sawyers, 1999**).

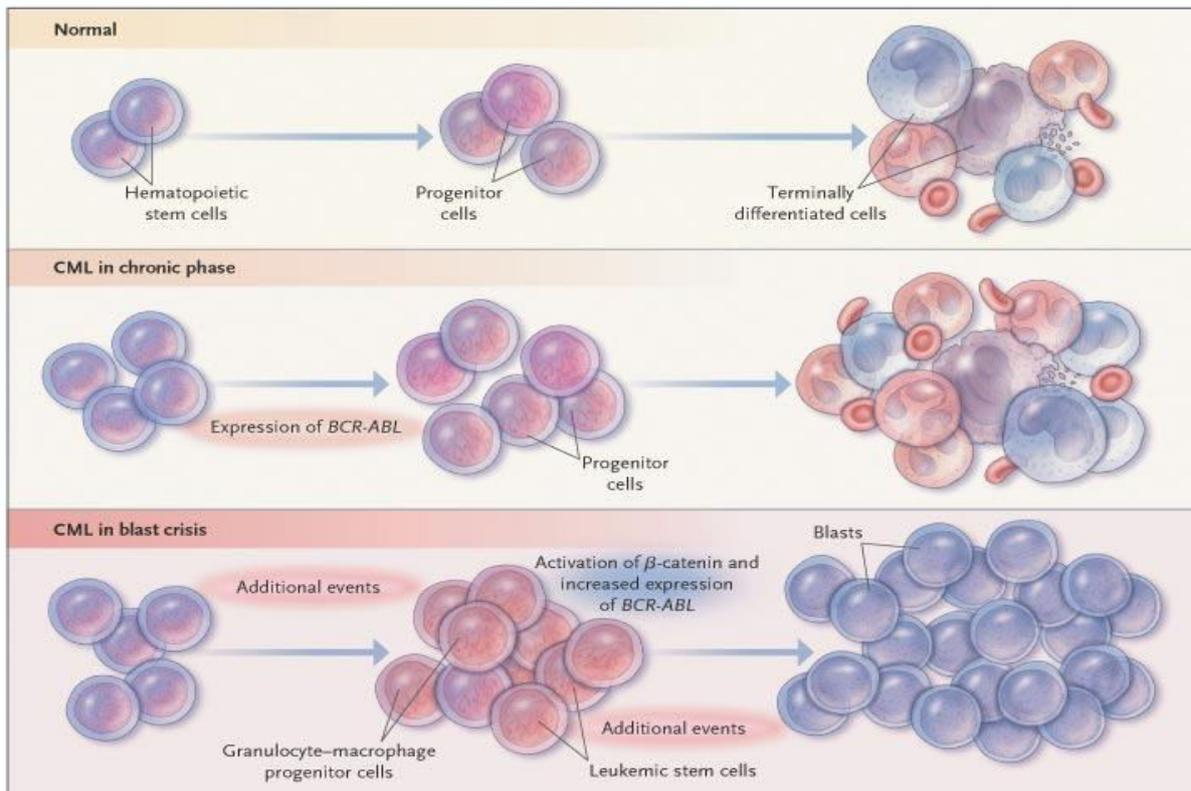


Figure 2. Représentation schématique de l'hématopoïèse normale, de la LMC en phase chronique et de la LMC en crise blastique (**Jamieson *et al.*, 2004**).

I.2.1. Rôle du chromosome Philadelphie dans la leucémogénèse

Le chromosome Philadelphie ou Ph1 qui correspond à la translocation $t(9;22)(q34;q11)$, a été la première anomalie génétique décrite dans une affection maligne et responsable de la pathogénèse de la LMC. Elle est à l'origine de l'oncogène chimérique (transcrit de fusion) BCR-ABL1 (*breakpoint cluster region/Abelson*), qui code pour une protéine de fusion dont l'activité tyrosine kinase (produit du gène ABL1) est dérégulée (**Figure 3**).

Décelable au caryotype dans 95 % des cas de LMC, la translocation peut également exister sous forme de translocation variante $t(9;22;v)$ impliquant plusieurs chromosomes (3 ou plus) ou sous forme d'une insertion. Dans ce dernier cas, la translocation est cryptique en cytogénétique conventionnelle (Ph masqué) mais la fusion issue de la $t(9;22)$ peut être mise en évidence par hybridation *in situ* fluorescente (FISH) en 22q11, ou plus exceptionnellement en 9q34 (**Sessarego *et al.*, 2000**).

Les cellules Ph sont génétiquement instables et peuvent développer des anomalies génomiques résultant en une progression de la phase chronique (CP) à une phase accélérée (AP) puis en phase de blastes (BC, crise blastique) (**Dorfman *et al.*, 2018**).

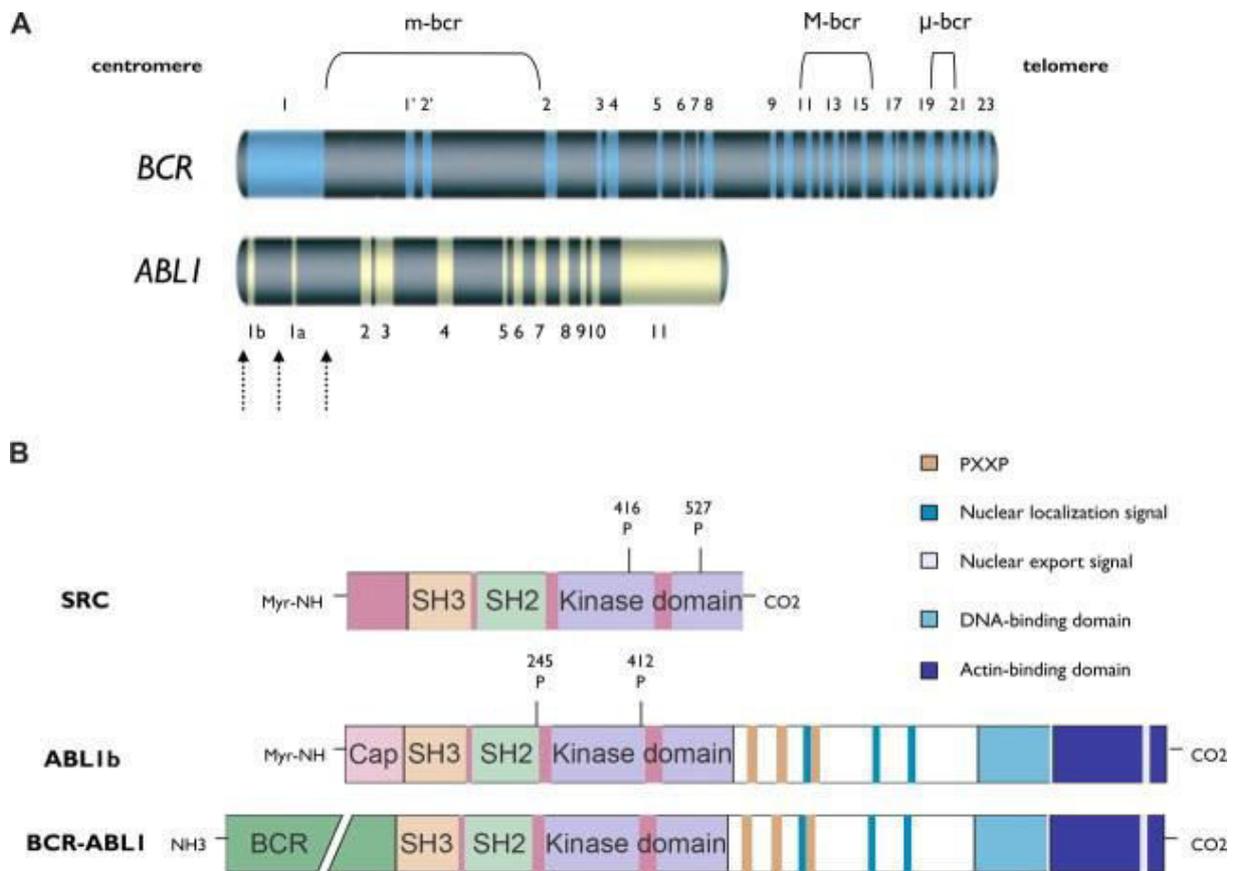


Figure 3. Schéma représentant des parties des deux gènes BCR et ABL impliqués dans la formation du chromosome Philadelphia t(9, 22). A : les 3 régions de cluster breakpoint m-bcr, M-bcr, μ-bcr du BCR sont présentés (Quintás-Cardama et Cortes.,2009).

I.2.2. Rôle de la protéine de fusion BCR-ABL dans la leucémogénèse

La protéine fusionnée BCR-ABL est vraisemblablement impliquée dans le processus malin. Elle possède des informations BCR à son extrémité amine et conserve la plupart mais pas toutes les séquences de protéines ABL normales. Étant donné que le point d'arrêt en 9 peut atteindre 30 ou 40 kb 5' pour ABL, une grande quantité doit être «bouclée» dans le processus de fusion. La protéine de fusion a conservé les domaines d'interactions protéine-protéine, le domaine activité tyrosine kinase et le domaine de liaison à l'ADN (Dupraz, 2014).

La protéine tyrosine kinase Abl physiologique est autorégulée de manière physique, c'est-à-dire par modification conformationnelle. Sa fusion à Bcr modifie cette auto-inhibition et active en permanence la kinase (Leguay et Mahon., 2005).

La phosphorylation d'un nombre très important de substrats est responsable des propriétés de la cellule leucémique, ce qui la distingue d'une cellule normale. En effet, l'auto activation et la perte de la régulation de l'activité tyrosine kinase entraînent l'activation, directe ou indirecte, et le recrutement de voies de signalisation impliquées dans les processus de prolifération, d'apoptose, de différenciation et d'adhésion cellulaire (**Leguay et Mahon., 2005**).

I.2.3. Modulation des voies de signalisation par la protéine BCR-ABL

De très nombreux substrats protéiques ont été indentifiés comme étant directement ou indirectement phosphorylés par l'activité kinase du BCL-ABL1 dont l'implication fonctionnelle dans le processus de leucémogénèse n'est pas encore bien établie.

Les interactions anormales entre l'oncoprotéine BCR-ABL et des molécules cytoplasmiques entraînent la perturbation de processus cellulaires clés. Les principales voies de signalisation dans la leucémogénèse sont les voies Ras/MAPK (*Rat sarcoma/Mitogen Activated Protein Kinase*), JAK/STAT (*Janus kinases/signal transducers and activators of transcription*), et PI3K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*)(**Figure 4**)(**Melo et Deininger., 2004**).

✓ *Activation de signaux mitotiques*

Les séquences du BCR codées dans l'extrémité amine du BCR-ABL contiennent un site tyrosine-phosphorylé qui se lie au domaine SH2 de la protéine d'adaptation GRB2 (**Pendergast et al., 1991**). La phosphorylation de BCR Tyr177 est essentielle pour la leucémogénèse médiée par BCR-ABL (**Zhang et al., 2001**), et sa mutation abolit largement la liaison à GRB2 et diminue l'activation de Ras induite par BCR-ABL (**Pendergast et al., 1991**).

L'interaction du BCR-ABL avec le GRB2 ainsi que d'autres protéines cytoplasmiques, qui fonctionnent comme des molécules adaptatrices, crée des complexes de signalisation multiprotéiques. Le complexe BCR-ABL/GRB2 recrute la protéine SOS active la petite protéine G Ras qui active la cascade MAPK activant ainsi la kinase (ERK)1/2 entraînant une prolifération cellulaire anormale (**Figure 4**) (**Ren, 2005**).

En outre, ce complexe BCR-ABL/GRB2 active également la voie de survie cellulaire PI3K/AKT (**Skorski et al., 1995**) augmentant ainsi la prolifération cellulaire (dégradation de p27 et activation de la mTOR) (**Cilloni et Saglio., 2012**)

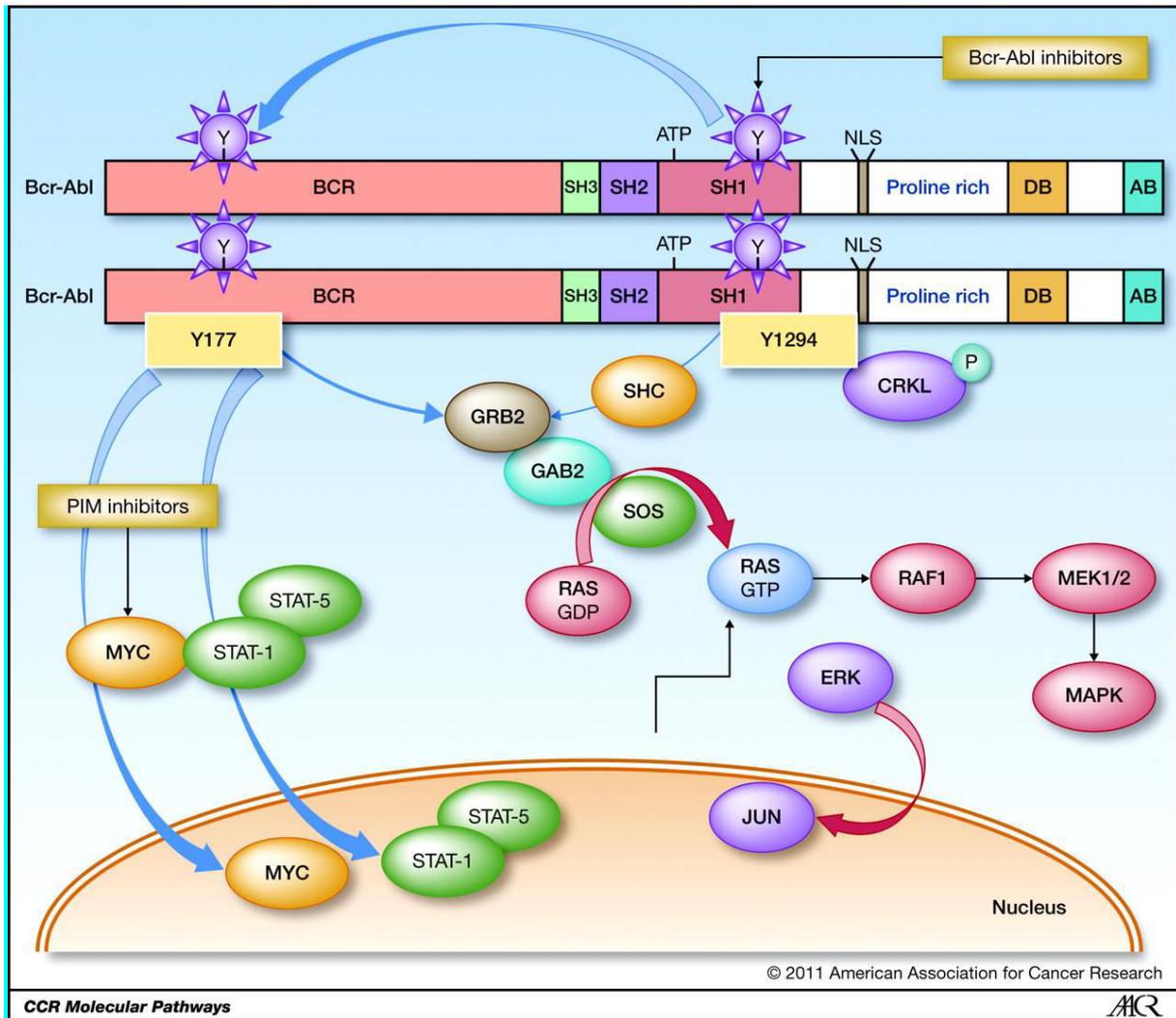


Figure 4: Représentation schématisée des certaines voies moléculaires activée par le BCR-ABL. La phosphorylation de Bcr-Abl de BCR Tyr177 est essentielle pour la leucémogénèse médiée par BCR-ABL. Le complexe BCR-ABL/GRB2 recrute le SOS, qui est associé de manière constitutive au domaine SH3 du GRB2. Le complexe BCR-ABL/GRB2/SOS stimule la conversion de la forme inactive de Ras liée au PIB en son état actif lié au GTP, et l'activation de la GAB2. En conséquence, le complexe GRB2/GAB2/SOS provoque l'activation constitutive de la voie aval de Ras, activant ainsi les protéines MEK1/2 et MAPK et entraînant une prolifération cellulaire anormale. (Cilloni et Saglio., 2012)

✓ *Inhibition de l'apoptose*

Le complexe BCR-ABL/GRB2 active la voie de survie PI3K/AKT qui module d'autres voies de signalisations impliqués dans l'autophagie (mTOR) ou l'apoptose (Bad, caspase 9,

Mdm2..), ce qui entraîne une survie prolongée et l'expansion du clone anormal (**Cilloni et Saglio., 2012**).

Des facteurs de transcription clés sont impliqués dans la signalisation BCR-ABL. Parmi ceux-ci, STAT1 et STAT5 (transducteur de signal et activation de la transcription) jouent un rôle clé. Dans les cellules normales, la translocation nucléaire des STAT se produit exclusivement après la liaison des cytokines aux récepteurs et est médiée par l'activation des kinases JAKs associées aux récepteurs. En revanche, dans la LMC, les STAT semblent être activés de manière indépendante des JAKs par une association directe des domaines SH2 des STAT avec des tyrosines phosphorylés sur le BCR-ABL (**Carlesso et al., 1996**).

D'autres voies de signalisations sont également activées par la protéine BCR-ABL1 telle que la voie NF- κ B (*Nuclear Factor-kappa B*) et la voie Rac (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*). La voie NF- κ B régule plusieurs gènes codant pour des molécules : antiapoptotiques (Bcl2, BclXL), de voies de prolifération cellulaire (cycline D, MYC), des molécules d'adhésion et de motilité cellulaires (ICAM, VCAM), de voies d'inflammation (IL-1, TNF- α , IL-6) et de voies de l'angiogenèse (VEGF)(**Zhou et Xu., 2015 ; Welner et al.,2015 ;Dorfman et al., 2018**). La voie Rac est impliquée dans la survie cellulaire, les modifications de l'adhésivité et la régulation de cytosquelette (**Thomas et al., 2008 ;Dorfman et al., 2018**).

L'activation de STAT5 est au moins partiellement responsable de la protection contre la mort cellulaire programmée par la régulation à la hausse de la molécule anti-apoptotique BCL-xL ainsi que par l'inactivation de la molécule pro apoptotique BAD par la voie PI3K/AKT (**Melo et Deininger., 2004**).

Toutes les voies de signalisation activées signalées convergent vers un point terminal unique : la perte de contrôle de la prolifération et l'expansion du clone leucémique. La définition de la contribution relative de chaque voie de transduction du signal au processus leucémique est un domaine de recherche important car l'association d'un inhibiteur de la tyrosine kinase (TKI) avec un inhibiteur en aval peut s'avérer être une stratégie cliniquement efficace (**Cilloni et Saglio., 2012**).

Malgré l'allongement apparemment sans fin de la liste des voies activées par le BCR-ABL et la complexité croissante qui se révèle dans ces voies, il semble que toutes les fonctions transformatrices du BCR-ABL dépendent de son activité tyrosine kinase (**Lugo et al., 1990**). Cette condition préalable a un potentiel clinique intrinsèque incroyable en ce qui concerne le développement de thérapies ciblées plus sophistiquées.

I.3. Les anomalies chromosomiques additionnelles ACA

Les anomalies chromosomiques additionnelles sont des anomalies génétiques surajoutés à la t(9 ;22) donc au chromosome Philadelphie dans la LMC, mise en évidence par l'analyse cytogénétique permettant d'identifier la présence d'éventuelle d'ACA pouvant avoir un impact sur la qualité de la réponse au traitement (**Roche-Lestienne et al., 2016**).

Ces ACA sont classées en deux types : « major route » et « minor route ». Les anomalies chromosomiques additionnelles « major route » sont associées à un pronostic plus mauvais que les ACA « minor route » ce qui met en évidence le fait que l'impact des altérations cytogénétiques dépend du types des ACA's (**Dorfman et al., 2018**).

Les ACA « major route » les plus fréquentes qui ont été détectées dans la LMC sont : la trisomie 8, trisomie 19, l'isochromosome 17q et un chromosome Phi secondaire (+der (22)), ider (22), (**Dorfman et al., 2018**). Les autres anomalies cytogénétiques telles que la perte du chromosome Y, la trisomie 21 ou la monosomie 7 n'ont pas d'impact pronostique au diagnostic.

Dans une étude publiée en 2011, 1151 patients atteints de LMC ont été étudiés pour la fréquence des ACA au moment du diagnostic de cette pathologie. Sur ces 1151 patients, 1003 (87%) avaient la translocation standard t (9 ; 22) (q34 ; q11) seule et 69 (6,0%) ont montré une translocation sous forme variante t (V; 22) et 79 (6,9%) avait la t(9 ;22) avec ACA, 38 patients (3,3%) avaient -Y, 73 /79 patients ont l'ACA en plus de la t (9; 22) et 6 en plus de la t (v; 22). 25 des 41 patients (2,2% du total) avec ACA sauf Y ont présenté des anomalies mineures comme t (3; 12), t (4; 6), t (2; 16) ou t (1; 21). 16 patients (1,4%) présentaient des anomalies majeures telles que trisomie 8, + der (22) t (9; 22) (q34; q11), ider (22) (q10) t (9; 22) (q34, q11), i(17)(q10) (**Fabarius et al., 2011**).

Chez les patients atteints d'ACA majeures, la trisomie 8 était l'altération la plus fréquente (n= 9), der (22) t (9; 22) (q34; q11) a été observée chez 6 patients, i(17) (q10) chez 5 patients, et ider (22) (q10) t (9; 22) (q34; 11) chez 3 patients et la trisomie 19 était observée chez 2 patients (**Fabarius et al., 2011**).

La signification pronostique liée à la présence d'anomalies ACA est discuté, alors que la répercussion sur la survie inférieure était plus systématiquement associée à la présence d'ACA au moment du diagnostic chez les patients atteints de LMC traités par interféron alpha (IFN α), l'impact pronostique des ACA à l'ère des anti tyrosines est controversé (**Safaei et al., 2018**).

Alors que certains rapports n'ont montré aucune signification pronostique de la présence d'ACA sur la réponse à l'Imatinib en première ligne, d'autres études ont suggéré des taux de réponse plus faibles et une survie globale inférieure chez les patients atteints d'ACA au moment du diagnostic.

Une partie de cette variabilité des résultats rapportés peut être liée aux types d'ACA présents. Il a été récemment rapporté que les patients atteints d'ACA major route avaient une survie inférieure par rapport à ceux sans ACA ou ceux qui présentaient des anomalies mineur route, lorsqu'ils étaient traités par Imatinib (Wang *et al.*, 2016).

L'impact pronostique défavorable des anomalies major route est traduit dans les recommandations de l'ELN 2013 qui incluent la présence de ces anomalies au moment du diagnostic en tant que signe de base «d'alerte».

Wang *et al.* ont proposé un système de stratification des risques (Figure 5) :

- Les ACA de bon pronostic : (trisomie 8, -Y et une copie supplémentaire du chromosome Ph1
- Les ACA de mauvais pronostic : i(17)(q10), -7 / del7q et 3q26.2 réarrangements.

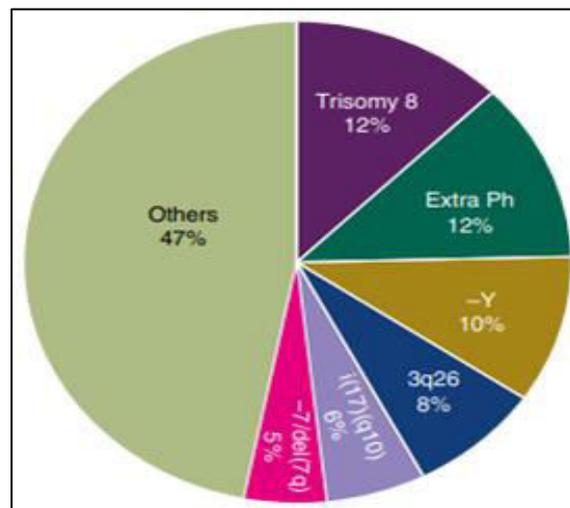


Figure 5. Répartition des ACA sur 2013 patients (Wang *et al.*, 2016).

La présence des ACA au moment du diagnostic peut annoncer la transformation à un stade avancé (accéléré ou blastique) (Crisan *et al.*, 2015)

Les ACA pendant le traitement avec les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) définissent l'échec du traitement et sont associées à une survie plus courte (**Crisan et al., 2015**). Ces altérations interagissent avec la progression de la maladie, et le développement du stade avancé, 30% pour les phases accélérées (PA) et 80% pour les crises blastiques (CB) (**Dorfman et al., 2018**).

Une particularité cytogénétique dans la LMC est la possibilité d'émergence au caryotype et sous ITK d'ACA dans des clones sans chromosome Ph1 (ACA Ph-) dont l'origine et la signification biologique sont encore méconnues. Les ACA Ph- sont essentiellement une perte du chromosome Y, une trisomie 8, une délétion 20q, une monosomie 7 ou une délétion 7q, et n'ont pas d'impact sur la survie globale ni sur la progression (**Terre et al., 2004- Wang et al., 2013**). Cependant, les anomalies du chromosome 7 (-7/del7q) pourraient être en lien avec la présence de signes de dysmyélopoïèse et le risque d'évolution vers le développement d'une leucémie myéloïde aigue (LAM) de novo Ph-, à différencier d'une transformation myéloïde Ph+ (**Zeidan et al., 2007 ; Lauseker et al., 2014 ; Roche-Lestienne et al., 2016**)

Les anomalies cytogénétiques dans les cellules Ph négatif sont présentes chez 5 à 10 % des patients et en absence de dysplasie, ne semblent pas affecter négativement le résultat à l'exception des anomalies du chromosome 7 (monosomie 7 et del (7q) (**Crisan et al., 2015**).

I.4. Traitements 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.

Avant l'ère de la thérapie ciblée, la LMC a bénéficié de plusieurs armes thérapeutiques. L'arsenic au début du 20^{ème} siècle, puis le busulfan et l'hydroxyurée (Hydréa), ont été utilisés mais n'étaient que palliatifs afin d'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 (**Baccarani et al., 2013 ; Hochhaus et al., 2020**).

L'hydroxyurée, inhibiteur de la synthèse de l'ADN, est le plus souvent prescrite. Son action est rapide et sa toxicité est faible. Par ailleurs, selon les dernières recommandations du ELN

(*European Leukemia Net*), l'hydroxyurée peut être utilisée temporairement jusqu'à ce qu'un diagnostic soit établi (**Baccarani et al., 2013 ; Hochhaus et al., 2020**).

Le busulfan (Myleran®) est un agent alkylant qui est également utilisé mais son maniement est plus délicat du fait de sa myélotoxicité (**Sébahoun, 2005**).

Dans les années quatre-vingt, le seul traitement curatif de la LMC reconnu chez les patients jeunes était la greffe ou la transplantation allogénique de CSH (*allogenic stem cell transplantation* « *alloSCT* »). L'allogreffe est devenue ensuite dans les années quatre-vingt-dix, le traitement de première ligne pour tous les patients éligibles en phases chronique et en phase d'accélération précoce (**Apperley, 2015**). 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 (**Baccarani et al., 2013**).

Le traitement par l'IFN- α est devenu 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 Réponse cytogénétique complète « RCyC » et une survie à long terme des patients (**Hehlmann et al., 2003 ; Bennour et al., 2016**). L'INF- α est une cytokine possédant une action antiproliférative sur les cellules normales et tumorales. (**Guilhot, 2004**). A l'heure actuelle, il offre un choix thérapeutique pour des patients intolérants aux ITK sans autres alternative thérapeutique (exemple : les femmes enceintes).

L'IFN- α a été par la suite, attaché au polyéthylène glycol (PEG), qui le protège de la dégradation protéolytique, afin d'améliorer ses caractéristiques pharmacocinétiques. L'IFN α pégylé résultant (PEG-IFN α) induit de meilleurs taux de réponse par rapport à la forme non modifiée avec une meilleure efficacité et tolérabilité (**Talpaz et al., 2013**).

Des recombinaisons de PEG-IFN α avec chimiothérapie «cytarabine » ou ITK « imatinib » ont données des réponses plus profondes et plus rapides dans des essais randomisés, bien qu'aucun avantage de survie à long terme a été démontrée (**Talpaz et al., 2005 ; Preudhomme et al., 2010 ; Simonsson et al., 2011**).

D'autres essais de PEG-IFN α en association avec le nilotinib (ITK) sont en cours. Le but de ses combinaisons est d'augmenter, à l'aide PEG-IFN α , la proportion de patients éligibles au TFR (*Treatment Free Remission*) en raison de son effet immunologique (**Hochhaus et al., 2020**).

Chapitre I. Données bibliographiques

Dans les années deux mille, le pronostic de LMC a été radicalement transformé par l'introduction d'une thérapie ciblée à base d'inhibiteurs de tyrosine kinase « ITK ». Ces molécules sont des inhibiteurs compétitifs de l'ATP et bloquent l'activation de la kinase BCR-ABL 1. Ils ont largement fait la démonstration de leur supériorité en terme de survie, de tolérance et d'efficacité sur tous les autres traitements précédemment décrits (**Hughes et al., 2010**). Ceci est le fruit de décennies de recherche sur le rôle du BCR-ABL1 kinase dans la pathogenèse de la LMC qui ont abouti au développement de nouveaux ITK. Trois générations d'ITK ont été développées pour une prise en charge de la LMC.

Les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) tels que l'imatinib (première génération princeps ou générique), le dasatinib, le nilotinib, le Radotinib, et le Bosutinib (deuxième génération), ou le ponatinib (troisième génération), ont révolutionné le pronostic de la maladie, offrant aux patients une survie comparable dans la plupart des cas à la survie de la population générale (**Hochhaus et al., 2020**).

Néanmoins, à l'heure actuelle des cas d'échec / résistance ou d'intolérance/complications liées au traitement aux ITK concerne 5 à 10 % des patients traités sont enregistrés (**Crisan et al., 2015**. **Roche-Lestienne et al., 2016**). Dans ce cas, le changement de traitement est obligatoire et doit être accompagnée d'une enquête sur des mutations BCR-ABL1 (**Gambacorti-Passerini et al., 2016**; **Smith et al., 2019**).

Le traitement de la LMC selon les recommandations de l'ELN 2006 jusqu'à 2013 indique que l'imatinib première génération est le gold standard de première ligne dans la LMC et les ITK de deuxième génération en cas d'échec ou en cas d'intolérance sont des traitements de deuxième ligne. Actuellement les recommandations de l'ELN (European Leukemia Net) et NCCN (National Comprehensive Cancer Network) indique que le traitement de la LMC pour les faibles risques de Sokal est l'imatinib en première ligne et les ITK de deuxième génération en deuxième ligne, pour l'intermédiaire et haut risque de Sokal, les ITK de première génération ou ITK deuxième génération en première ligne, si il n ya pas de réponse ou la présence d'une intolérance aux ITK, un changement de traitement pour un autre non prescrit au paravent est la seule solution., En Algérie l'imatinib garde toujours le gold standard en première ligne et les ITK de deuxième génération en deuxième ligne.

De nouvelles voies thérapeutiques qui ont pour but de surmonter la résistance et d'éradiquer la maladie résiduelle due à la persistance de cellules souches leucémiques (CSLs)

insensibles à l'inhibition de BCR-ABL 1, par les ITKs ont en cours d'essai préclinique et ont monté *in vitro* leur efficacité, on citera :

Le ciblage des CSLs de la LMC, en ciblant les principales voies de signalisation propres aux CSLs ou par modulation du système immunitaire. A titre d'exemple :

- La modulation de la voie STAT5 par agoniste de PPAR- γ , la pioglitazone, induit l'érosion du pool des CSLs de la LMC (**Rousselot, 2017**).
- La voie de signalisation Hedgehog indispensable à la persistance des cellules souches par la cycloplasmide, cependant l'essai clinique n'a pas été concluant du fait de toxicités sévères (**Irvine et al., 2016**).
- La voie d'auto-renouvellement à savoir la voie b-caténine responsable de la progression de la LMC vers la phase transformée de la maladie (**Suknuntha et al., 2016**).
- En ciblant la survie cellulaire soit en inhibant les gènes anti-apoptotiques de la famille Bcl (Bcl2 et Bcl-XL) (**Carter et al., 2016**).

L'une des options envisagées serait de déloger les CSL résiduelles de la niche afin de les rendre à nouveau sensibles aux ITK. L'utilisation du plérixafor qui permet de diminuer l'adhésion des cellules CD34⁺Ph⁺ au stroma, les rendant donc sensibles aux ITK est l'une des voies de recherche dans la LMC (**Chomel et al., 2014**).

Chapitre II. Matériel et méthodes

Chapitre II. Matériel et Méthodes

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire de cytogénétique du service d'hématologie du Centre Anti Cancer « CAC » de Blida, durant une période de 4 mois du 01 février au 30 Mars et du 01 juin au 30 juillet 2020.

Notre travail a porté sur la recherche des anomalies major route chez les patients Algériens atteints d'une Leucémie Myéloïde Chronique. Cette recherche a été faite à l'aide de deux techniques cytogénétiques : le caryotype en bandes R et la FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*).

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel non biologique

Les appareillages, la verrerie, les réactifs, et les solutions sont mentionnées dans l'annexe 01.

II.1 .2. Matériel Biologique

Notre travail a été réalisé sur des prélèvements de sang et de moelle osseuse des patients atteints de LMC.

II.1.3. Patients

Notre étude a concerné 34 patients (23 hommes et 11 femmes) âgés de 21 à 85 ans, recrutés au niveau du service d'hématologie de l'hôpital Franz Fanon de Blida. Ces patients ont été suspectés d'une LMC sur la base d'arguments cliniques et hématologiques (myélémie > 20%) mais sans preuve cytogénétique et/ou moléculaire. Ils proviennent de différentes Wilayas d'Algérie comme Blida, Medea, Chlef, Djelfa, Tissemsilt, Ain Defla, Tipaza.

Les données épidémiologiques (âge, sexe, origine géographique, profession) et cliniques (circonstance de découverte et délai de diagnostique, hémogramme, myélogramme au moment de diagnostic) ont été obtenues à partir d'un questionnaire dûment rempli par le médecin traitant. Toutes ces données ont été colligées dans une base de données Excel.

Ces patients ont bénéficiés d'un hémogramme et d'un myélogramme au moment du diagnostic.

II. 2.Méthodes

II.2.1. Prélèvement et mise en culture

La moelle osseuse a été prélevée, dans des conditions d’asepsie et sous anesthésie locale, à partir des os plats (sternum, crête des os iliaques). Après ponction à l’aide d’un trocart (tige métallique pointue coulissant à l’intérieur d’une canule), sur lequel est adaptée une seringue préalablement héparinée, la moelle osseuse a été aspirée puis mise dans un tube contenant un milieu de transport (RPMI).

Après comptage, les cellules de la moelle osseuse sont, ensuite, mises en culture à 37°C dans une étuve à CO₂ (24H synchronisation) à raison de 2x10⁶cellules /ml dans milieu de culture RPMI complet. La même culture cellulaire est utilisée dans les deux techniques cytogénétiques : le caryotype en bandes R et/ou la FISH (**Figure 6 ; Annexe 01**).

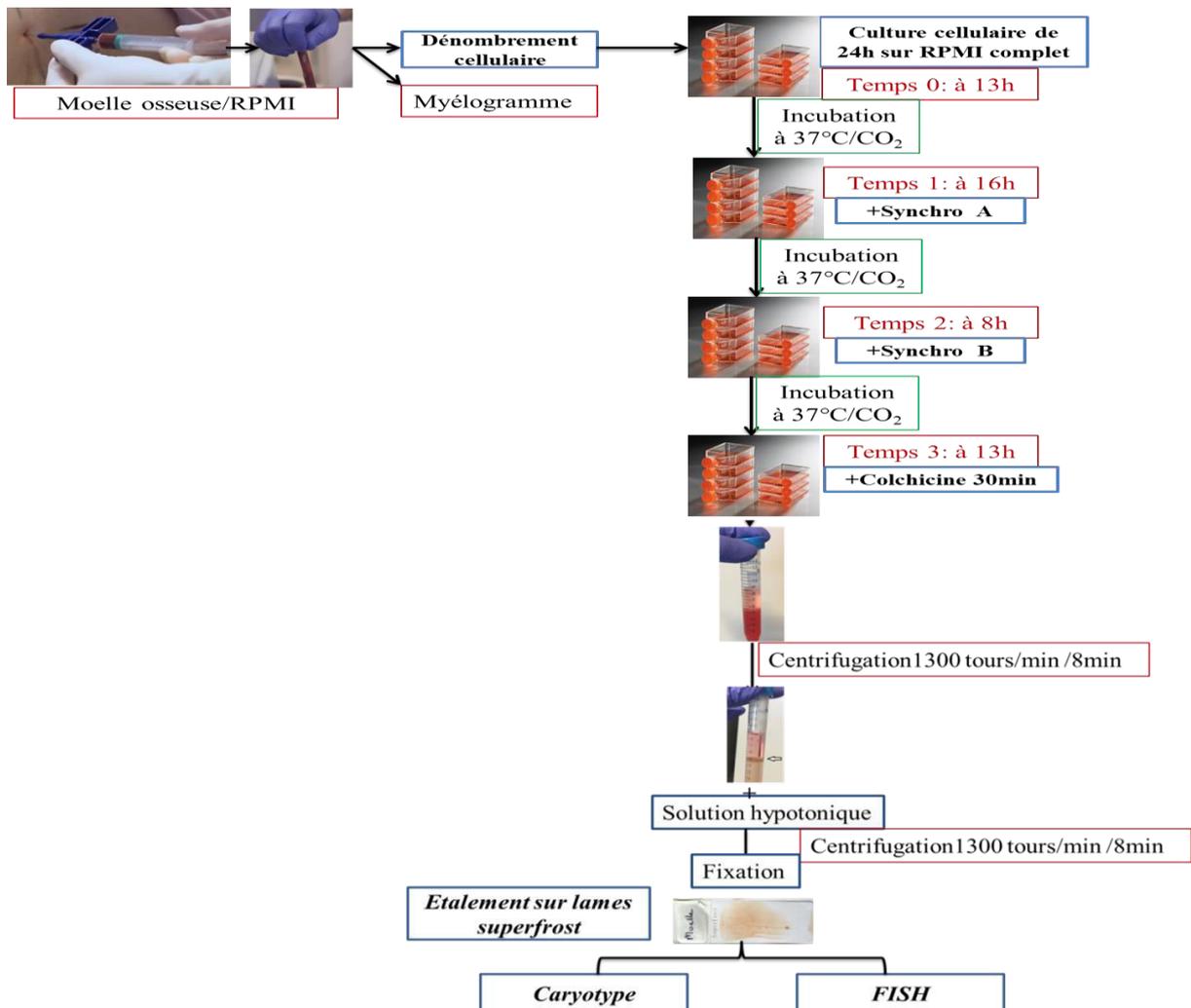


Figure 6. Diagramme récapitulatif des étapes de la culture cellulaire.

60 µL de colchicine sont ajoutés dans chaque flasque 30 minutes avant la fin de l'incubation. La colchicine perturbe les fuseaux mitotiques et bloque les cellules en métaphase de la mitose. Une fois le temps d'action de la colchicine terminé, les flasques sont retirés de l'étuve d'incubation. Les cellules sont centrifugées, dans un tube falcon de 15ml, à 1300 tours/min pendant 8min, le surnageant est par la suite éliminé. Le culot cellulaire restant est mélangé à 15ml de solution hypotonique (KCl), centrifugé à 1300 tours/min pendant 8min, puis séché dans une étuve sèche à 37C° pendant 25 min. La solution hypotonique permet de gonfler les cellules en mitoses (**Annexe 01**).

Le culot cellulaire est ensuite pré-fixé par une solution de carnoy, centrifugé à 1300t/min pendant 8 min puis fixé à l'aide d'un mélange fixateur (1/3 Acide Acétique, 2/3 méthanol) centrifugé une 2^{ème} fois à (1/3 Acide Acétique, 2/3 méthanol) .Cette étape de fixation sera répétée 2 fois pour avoir un culot cellulaire clair(**Annexe 01**).

II.2.2. Caryotype en bandes R standard

Le caryotype correspond à une analyse morphologique (nombre, structure, taille, forme et disposition), au microscope, des chromosomes d'une cellule. Il permet de mettre en évidence des anomalies chromosomiques, comme des trisomies, ou définir certaines caractéristiques de l'individu, comme le sexe génétique à partir des chromosomes sexuels (**Quintás-Cardama et al., 2006**).

Ce test peut être effectué sur le sang périphérique ou circulant lorsque la LMC est diagnostiquée pour la première fois. Cependant, un prélèvement de moelle osseuse est généralement préféré (**Quintás-Cardama et al., 2006**).

Le caryotype permet aussi de révéler d'éventuelles anomalies génétiques, objet de notre étude. Cet examen permet non seulement de confirmer le diagnostic en montrant dans plus de 90% des cas, la translocation classique réciproque t (9 ;22) (q34.1 ; q11.2)spécifique à la LMC, mais également d'identifier dans moins de 10% des cas, les translocations variantes t (9 ; 22 ; v) impliquant plusieurs autres chromosomes partenaires, ou la présence d'éventuelle anomalies cytogénétiques additionnelles (ACA)/(ACA Ph+) dans cette pathologie (**Baccarani et al., 2012**).

Il faut toutefois savoir que ce réarrangement chromosomique n'est pas visible dans environ 5% des cas de LMC atypique (a-LMC) (LMC Ph I négatif), dans ces cas, il faut avoir recours à d'autres techniques de type FISH ou RT-PCR (Baccarani *et al.*, 2012).

L'identification des chromosomes est faite après un marquage en bandes R (Reverse) qui correspond à un marquage des segments non variables (Euchromatine). Le marquage en bandes R est un marquage qui met en évidence des bandes sombres et des bandes claires, principalement basé sur un traitement thermique à 87°C en milieu salin (NaH₂PO₄) et une coloration au Giemsa.

A. Etalement

L'étalement du culot cellulaire appelé également « étalement chromosomique » consiste à étaler la suspension cellulaire fixée sur une lame de verre, en vue d'une observation microscopique. Il est fondé sur la présence d'un taux d'humidité idéale. 2 gouttes distinctes de culot sont étalés sur des lames propres préalablement humidifiées à l'aide de la vapeur du bain marie. Les lames sont ensuite égouttées puis séchées à l'air libre (Figure 7 ; Annexe 01).

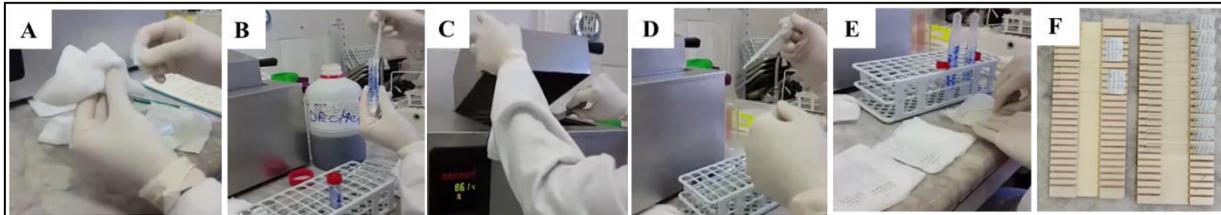


Figure 7. Etalement du culot cellulaire sur lames pour le caryotype. **A:** nettoyage de lames; **B:** préparation des culots cellulaires; **C:** humidification des lames sur la vapeur du bain-marie; **D:** étalement de deux gouttes distinctes du culot cellulaire; **E:** égoutter la lame; **F:** laisser sécher à l'air libre pendant 30 à 45 min.

B. Dénaturation et coloration au Giemsa

Les lames sont d'abord réhydratées par incubation dans de l'eau distillée pendant 5min. La dénaturation se fait par incubation des lames au bain marie à 87°C dans une solution de NaH₂PO₄ pendant une durée bien déterminée selon le climat extérieur. La dénaturation est arrêtée par incubation des lames dans de l'eau distillée à 18°C (choc thermique). Les lames sont ensuite colorées par une solution de Giemsa pendant 5 min puis séchées et observées au microscope (Figure 8 ; Annexe 01)

La coloration de Giemsa entraîne l'apparition de bandes sombres et claires alternées sur les chromosomes métaphasiques: le « G-banding ». La topographie des bandes est caractéristique d'un chromosome et permet de l'identifier (les deux chromosomes d'une même paire ont la même topographie de bandes).

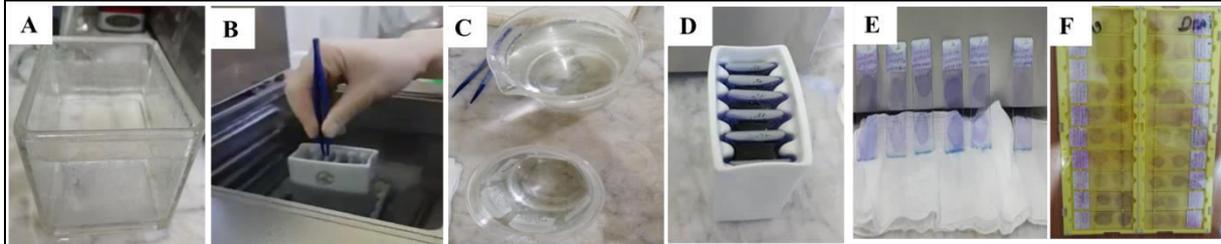


Figure 8. Etapes de dénaturation et de coloration au Giemsa. **A:** Réhydratation par l'eau distillée à T° ambiante pendant 5 min; **B:** Dénaturation par NaH_2PO_4 au bain marie à 87°C; **C:** refroidissement des lames dans de l'eau distillée à 18°C pendant quelques secondes; **D:** coloration des lames par Giemsa pendant 5min; **E:** Laisser sécher les lames à l'air libre; **F:** conserver les lames jusqu'à observation.

C. Analyse microscopique et classement

Une lecture microscopique est faite après coloration des lames par Giemsa. Le caryotype (caryogramme) obtenu est traité par un logiciel (IKAROS dans notre cas) qui permet de classer les chromosomes (**Figure 9**).

Plusieurs cas peuvent être rencontrés lors d'une étude cytogénétique par caryotype:

- ✓ **Au diagnostic** : il est nécessaire d'analyser (comptage et identification des chromosomes) au moins 20 mitoses comme le cas de notre étude sur la LMC.
- ✓ **En cas d'anomalie non clonale** : il est souhaitable de confirmer ou d'infirmer une éventuelle clonalité soit en analysant plus de mitoses ou de réaliser une étude en cytogénétique moléculaire FISH (cas des **Anomalies chromosomiques additionnelles**).
- ✓ **En cas de maladie résiduelle** : Pour la recherche d'une anomalie préalablement décelée, il est recommandé d'analyser au moins 30 mitoses ou de réaliser une analyse ciblée en cytogénétique moléculaire, d'emblée ou en complément d'une analyse conventionnelle de 20 mitoses qui n'a pas mis en évidence l'anomalie recherchée (exemple : suivi de LMC sous anti tyrosines kinases).

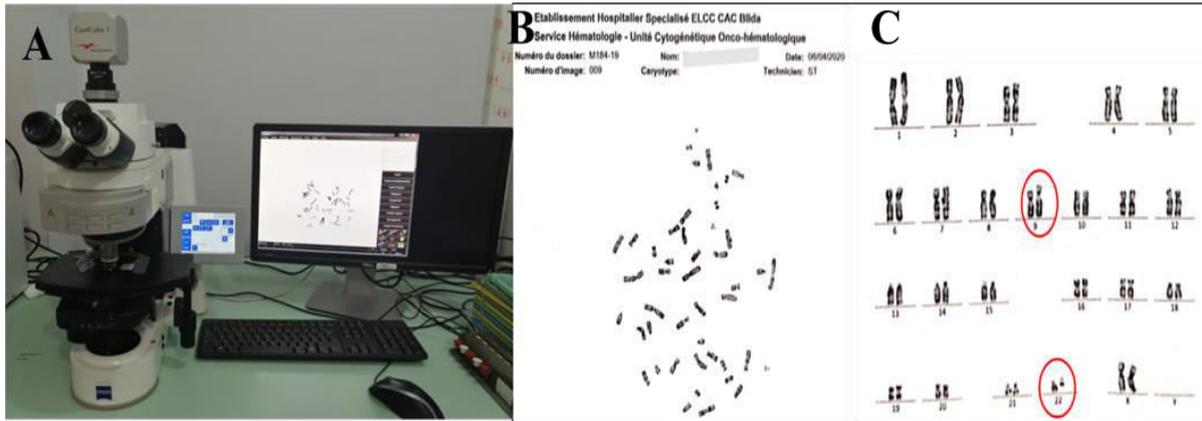


Figure 9. Observation microscopique des résultats du caryotype d'un patient atteint de LMC mettant en évidence le chromosome de Philadelphie. A : Chromosomes photographiés à l'aide du microscope ZEISS et le logiciel IKAROS. B : Chromosomes disposés selon la mitose prise. C : Chromosomes classés par paire selon la taille et le banding.

D. Avantages et inconvénients du caryotype

Le tableau II résume les avantages et les inconvénients/limites de la technique du caryotype.

Tableau II. Avantages et inconvénients du caryotype métaphasique (Taoussi., 2020).

Avantages	<ul style="list-style-type: none"> - Permet d'étudier tout le génome ; - Permet de détecter les anomalies de nombre (polydiploïdie, hypodiploïdie ...) et de structures (translocations, délétions, inversions, insertions, additions, ring).
Inconvénients et limites	<ul style="list-style-type: none"> - Une résolution maximale de 5 millions de paires de bases (5Mpb) ; - Difficulté de caractérisation de certaines anomalies dites cryptiques ; - Une nécessité d'avoir des mitoses en nombre suffisant et de bonne qualité ; - Une nécessité absolue d'avoir des réactifs de bonne qualité ; - L'humidité et la température sont des facteurs essentiels pour un bon étalement et qui dépendent d'un climat favorable, ce qui rend l'étalement parfois très difficile à réaliser. - Le climat influence aussi le temps de dénaturation qui varie de 12 min à 14 min selon le climat. - Chronophage : la saisie et l'analyse de 20 mitoses pour un seul caryotype se fait au minimum un jour après la dénaturation.

II.2.3. Hybridation *In Situ* Par Fluorescence « FISH »

La FISH est une technique cytogénétique qui se réalise par hybridation de sondes génomiques fluorescentes complémentaires des gènes BCR (sonde verte) et ABL1 (sonde rouge) (**Annexe 02**). Elle permet de visualiser directement la fusion sur des métaphases ou des noyaux cellulaires en interphases. La FISH permet de mettre en évidence des séquences complémentaires sur les chromosomes par une méthode de fluorescence. Ainsi la fusion BCR-ABL1 est visualisée sous forme d'un signal ou spot jaune résultant de la fusion des deux couleurs. Elle permet donc d'identifier que les anomalies ciblées après suspicion de leurs présences sur caryotype. Elle aurait une sensibilité supérieure au caryotype en bandes R conventionnel dans le suivi de la réponse thérapeutique : définition de la réponse cytogénétique complète (RCC). Elle aurait une meilleure corrélation avec la réponse moléculaire (**Testoni et al., 2009**).

La FISH est réalisée en 6 étapes successives. D'abord le culot cellulaire est étalé sur lame de la même manière que le caryotype sauf que dans la FISH on étale seulement une goutte au lieu de deux (**Figure 7 ; Annexe 01**).

Les lames sont ensuite prétraitées avant d'appliquer les sondes. Le prétraitement des lames commence par une solution tampon 2xSCC (*Saline-sodium citrate buffer*) utilisée suivie de bains d'alcool éthylique de degrés croissants (70%, 85% et 100%). Le SCC est utilisé comme tampon d'hybridation, pour contrôler la stringence des étapes de lavage et aide à maintenir la structure cellulaire (membranes et cytoplasme) pour que les cellules puissent tolérer une température élevée. Les lames sont déshydratées dans les bains d'ordre croissant (70%, 85% et 100%) pendant 2 min chacun, puis séchées à l'air libre.

Les sondes Cytocell à double sondes BCR (sonde verte) et ABL1 (sonde rouge) sont ensuite appliquées à raison de 10 µl par lame (**Annexe 02**). Les lames sont ensuite couvertes par lamelles.

L'hybridation des sondes se fait dans le ThermoBrite, un système adaptable et programmable qui automatise les étapes de dénaturation et d'hybridation dans les procédures basées sur des lames FISH.

Le programme de ThermoBrite commence par une première étape de dénaturation effectuée à 65-70°C pendant 5 min. La température est ensuite réduite progressivement jusqu'à 37°C et l'hybridation se fait à 37°C dans un récipient humide et étanche à la lumière pendant une nuit.

Un lavage post-hybridation est réalisé par des solutions salines d'IGEPAL à 0,1 M et à 0,3M pendant 2 minutes suivi d'un lavage par une solution de Tween-20% (pH 7,0) à température ambiante pendant 30 secondes. Les lames sont ensuite déshydratées par passage dans des bains d'alcool éthylique de degrés croissants pendant 1 min chacun (70%, 85% et 100%)(Annexe 01).

10 µl du fluorochrome DAPI sont appliqués à l'obscurité pour chaque lame, le DAPI se lie fortement aux bases adénine (A) et thymine (T) de l'ADN et émet une fluorescence bleu brillante à une longueur d'onde allant de 450 à 490 nm, ce qui permet de détecter l'ADN au microscope à fluorescence (Figure 10, Annexe 01).

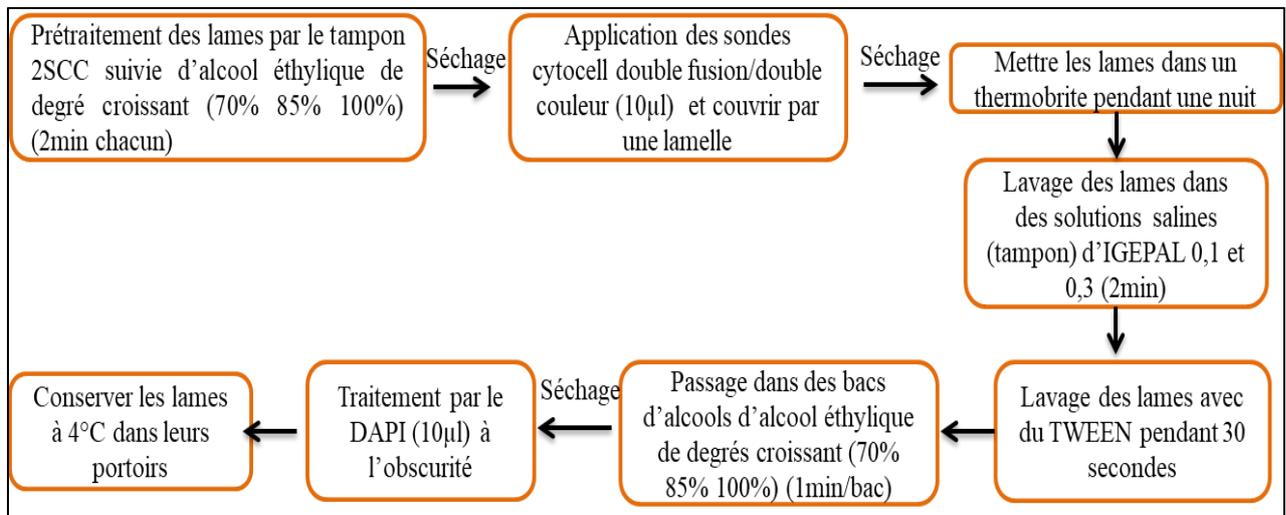


Figure10.Diagramme récapitulatif des étapes de la technique de FISH. 2SCC : Saline-sodium citrate buffer.

La lecture se fait au microscope à fluorescence(ZEISS), et à l'abri de la lumière. L'analyse des résultats est faite par le logiciel ISIS tout en se référant au design de la sonde pour effectuer la lecture (Figure 11, Annexe 02).

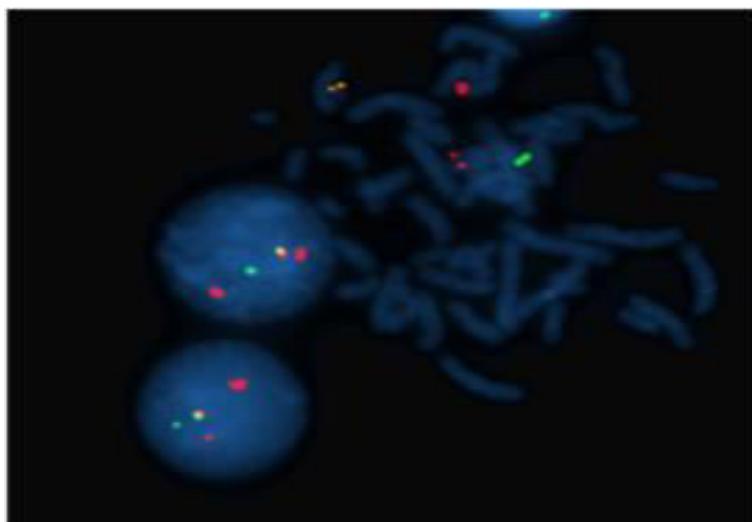


Figure 11. Lecture microscopique d'une lame d'un patient atteint de LMC diagnostiqué par FISH de diagnostic (Taoussi, 2020).

✓ **Avantages et inconvénients/limites de la FISH**

Le tableau III résume les avantages et les inconvénients/limites de la technique de la FISH.

Tableau III : représentant les avantages et les inconvénients de la FISH (Taoussi., 2020).

Avantages	Inconvénients/limites
<ul style="list-style-type: none"> - Technique facile ; - Répond à des problèmes de diagnostic et de pronostic précis ; - Permet de détecter des anomalies cryptiques : parfois l'observation des bandes chromosomiques au caryotype ne permet pas d'interpréter certains remaniements complexes ou non, la FISH permet d'affirmer ces anomalies suspectées. Exemple : t (12.21)(p13;q21) ; - Les sondes peintures marquent la totalité d'un chromosome sont également très utiles pour caractériser des remaniements complexes. 	<ul style="list-style-type: none"> - La FISH est ciblée, ne permet de détecter que l'anomalie recherchée contrairement au caryotype qui permet de détecter plusieurs anomalies en même temps ; - Certains réactifs sont potentiellement toxiques ou cancérigène (DAPI) ; - Technique coûteuse (sondes commerciales).

Chapitre III. Résultats et discussion

III. Résultats et Discussion

Le présent travail est une étude cytogénétique (caryotype et FISH) menée au service d'hématologie, CAC de Blida. Les patients dont les résultats cliniques et hématologiques étaient évocateurs d'une LMC ont été inclus dans notre étude dans le but de confirmer le diagnostic et de rechercher d'éventuelles anomalies « major route » chez ces derniers.

Les résultats vont être interprétés et discutés simultanément et présentés en trois volets:

- Dans le premier volet nous allons présenter les caractéristiques épidémiologiques (âge, sexe, origine géographique, profession) des 34 patients inclus dans notre étude.
- Dans le deuxième volet nous présenterons les résultats clinicobiologiques (découverte et délai de diagnostic, hémogramme/frottis sanguins, myélogramme au moment de diagnostic)
- Enfin, nous présenterons les résultats cytogénétiques (Caryotype et FISH), les données pronostic ainsi que les Anomalies cytogénétiques additionnelles (ACA)

III.1. Résultats épidémiologiques

III.1.2. Répartition des patients selon le sexe

Une légère prédominance masculine a été notée chez les patients atteints de LMC avec un sexe ratio H/F de 2.1. Parmi les 34 patients, 23 cas étaient de sexe masculin et 11 cas de sexe féminin, avec des pourcentages respectifs de 67.65% et de 32.35% (**Figure12**).

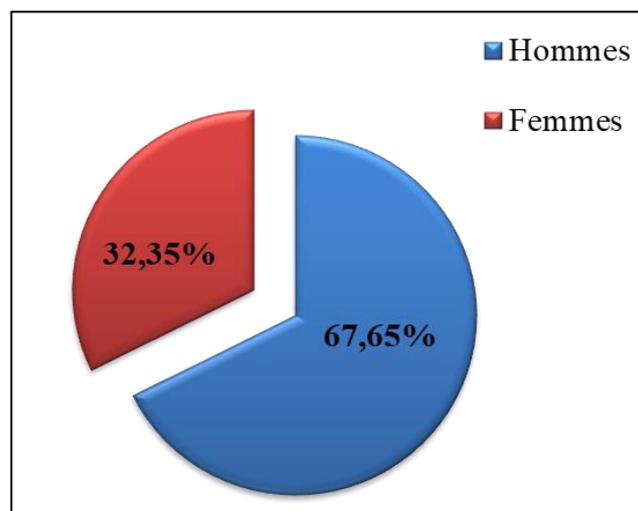


Figure 12. Répartition des patients selon le sexe.

La prédominance masculine a été démontré dans plusieurs études dans le monde et en Algérie de (Entasoltan et al., 2017 ; Djouadi et al., 2017; Padaro et al., 2018 ; de Le Guyader-Peyrou, 2019).

Ces résultats pourraient être expliqués par le fait que les professions d’hommes les exposent à un taux de carcinogènes élevé (pesticides, benzène, radiations ionisantes) ce qui augmente le risque de survenue de LMC chez les hommes.

Bien que la prédominance masculine est classiquement observée dans la littérature, certains auteurs ont rapporté une légère prédominance féminine (Tolo et al., 2010)et la LMC affecterait indifféremment les deux sexes (Nachi et al., 2018).

III.1.2. Répartition des patients selon l’âge

L’âge des patients variait entre 21 et 85 ans et la moyenne d’âge était de 46,8L’âge moyen des hommes était de 49,9 (32-85) alors que celui des femmes était de 41,2 (21-64) (Tableau IV, Figure 13).

Tableau IV. Répartition des patients suspectés de LMC selon l’âge.

Age	<30	[31-50]	[51-70]	[71-90]
Total % (Cas)	5.9% (2)	61.8%(21)	23.5%(8)	8.8%(3)
Homme % (Cas)	0% (0)	41.2%(14)	17.6%(6)	8.8%(3)
Femme % (Cas)	5.9% (2)	20.6%(7)	5.9%(2)	0%(0)

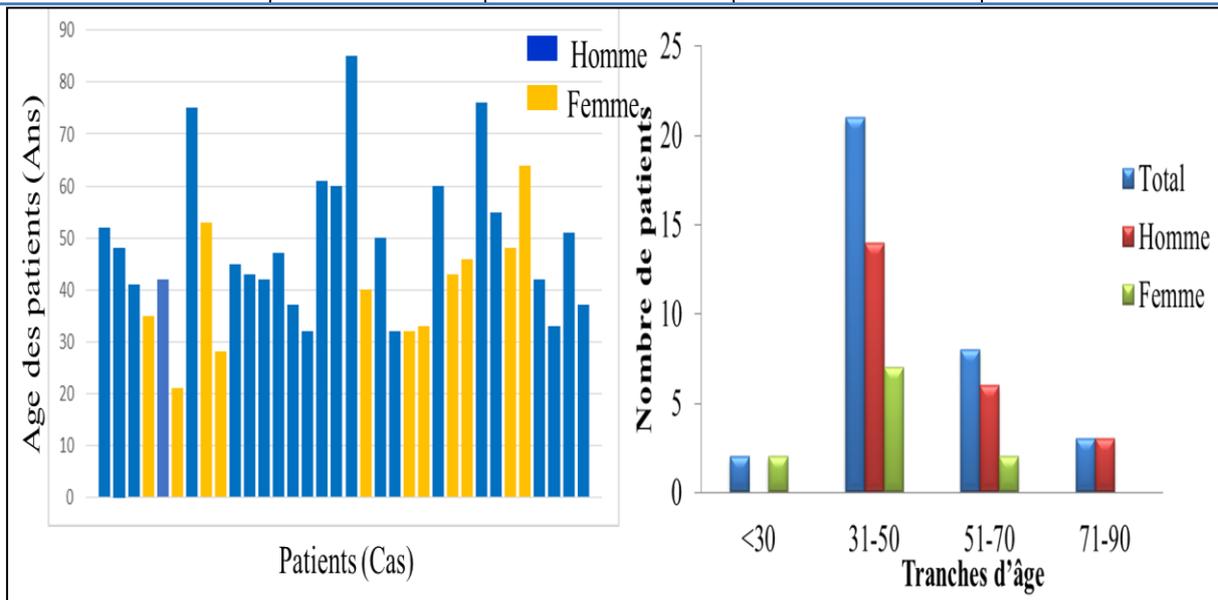


Figure 13. Répartition des patients selon l’âge et le sexe.

Plus que la moitié de l'effectif des patients, soit 61.8 % (21 cas) étaient inclus dans la tranche d'âge comprise entre 31 et 50 ans, suivie par la tranche d'âge comprise entre 51 et 70 ans et qui représentait 23.5% (8 cas) des patients. Les patients dont l'âge compris entre 71 et 90 ans représentaient 8.8% (3 cas) alors que seul 5.9% (2 cas) des patients avaient moins de 30 ans (**Tableau IV, Figure 13**).

Les patients de notre étude avaient un âge moyen de 46,8 ans au moment du diagnostic, se superposant ainsi à la médiane d'incidence de 48 ans observée en Algérie (**Djouadi et al.,2017 ; Nachi et al., 2018**).L'âge médian des patients atteints de LMC en Algérie et dans d'autres pays africains présentant un profil démographique similaire est supérieur à 40 ans et inférieur à celui rapporté en Europe et aux États-Unis (un âge moyen de 63 ans)(**Groves et al., 1995 ; Fleming et Menendez., 2004 ; Djouadi et al., 2017 ; Entasoltan et al., 2017**).

Cette différence selon l'âge est due très probablement à la structure de la pyramide des âges en Algérie, où la majorité de la population est encore très jeune et l'espérance de vie encore très faible par rapport à celles des pays développés.

III.1.3. Répartition des patients selon l'origine géographique

Le service d'hématologie du CAC de Blida draine toutes les hémopathies malignes issues d'un bassin de populations de près de 10 millions d'habitants répartis sur une dizaine de Wilayas limitrophes représentant le centre- ouest de l'Algérie.

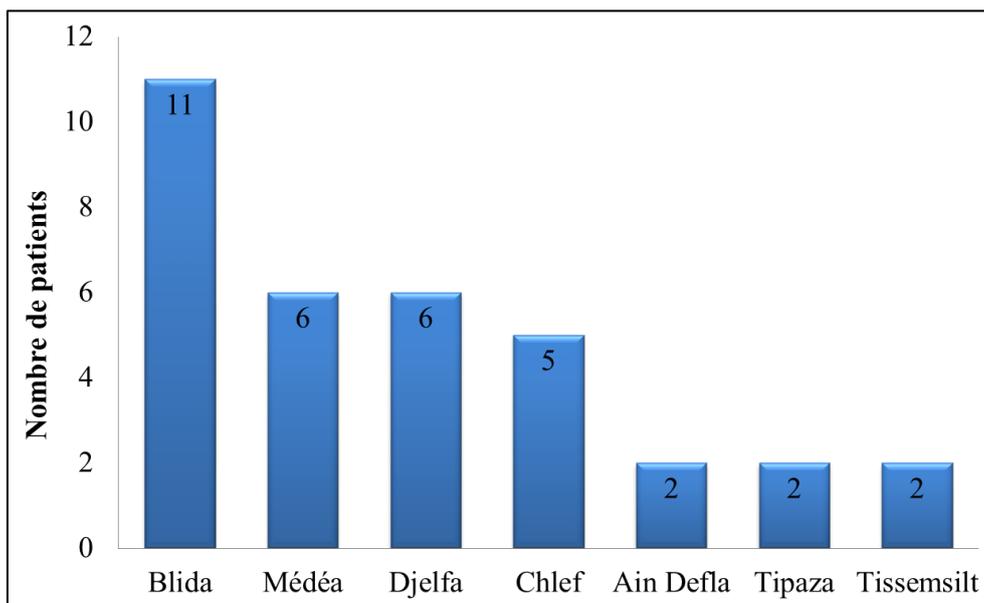


Figure 14.Répartition des patients selon l'origine géographique.

32.35% (11 cas) de nos patients étaient originaires de la Wilaya de Blida, 17.65 % (6 cas) étaient originaires de la Wilaya de Médéa, 17.65 % (6 cas) étaient originaires de la Wilaya de Djelfa, 14.70% (5 cas) étaient originaires de la Wilaya de Chlef et 5.88% (2 cas/ Wilaya) étaient originaires soit de la Wilaya de Tipaza, Ain Defla ou Tissemsilt (**Figure 14**).

III.1.4. Répartition des patients selon la profession

De façon pratique nous avons regroupé les professions exposant au risque de développer une LMC et celle ne présentant aucune exposition. Ces données n'ont été recueillies que chez 22 patients soit 64.7% de la population étudiées. Nous n'avons pas pu avoir des informations sur la profession de 12 cas soit 35.3% de la population étudiées.

Nos résultats montrent que la notion d'exposition à un toxique a été retrouvée dans seulement 2 cas (9.1%) ; il s'agit d'une exposition au benzène. Ce facteur de risque dans la LMC est décrit dans la littérature, allant même jusqu'à classer la LMC comme une maladie professionnelle dans ce type d'exposition (**Imbernon, 2003**).

Néanmoins, la majorité des patients n'avaient pas de profession qui les exposaient à des produits toxiques comme le benzène. Il s'agit de 20 cas soit 90.9% de la population étudiée.

III.2. Résultats clinico-biologiques

III.2.1. Circonstances de découverte de la LMC

La LMC est découverte de manière fortuite dans la moitié des cas, le plus souvent à l'occasion de la pratique d'un hémogramme ; ceci témoigne du fait que la LMC est une affection chronique, dont la révélation clinique est tardive.

Dans le reste des cas, la LMC est symptomatique avec au premier plan la découverte d'une splénomégalie d'apparition récente et augmentant rapidement de volume.

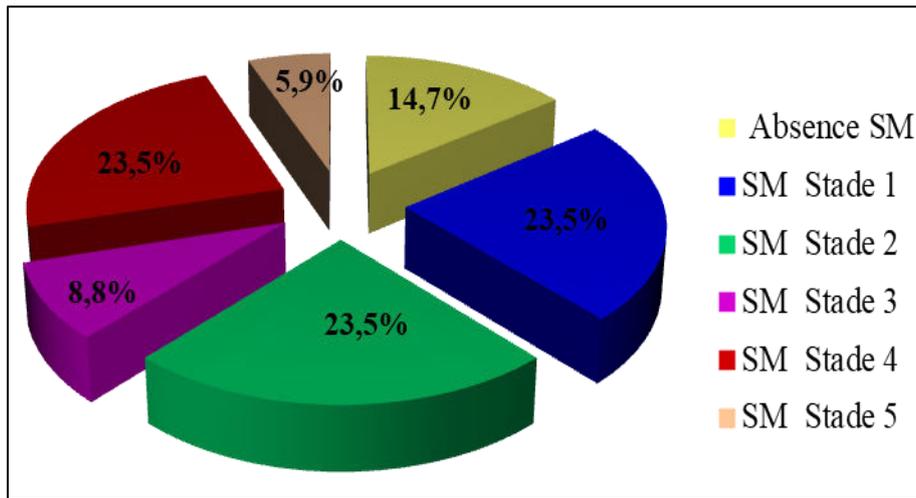


Figure 15. Représentation de circonstances symptomatologiques orientant au diagnostic de la LMC.

Dans notre étude, 14,7% (5 cas) des patients étaient asymptomatiques, la découverte de la LMC dans ces cas était fortuite à l’occasion d’un hémogramme. En outre, la majorité des cas de LMC soit 85,2% (29 cas) ont été découverts devant une splénomégalie symptomatique (**Figure 15**).

Les circonstances cliniques entourant la découverte d'une SPM orientent l'enquête étiologique vers plusieurs maladies telles que les maladies infectieuses ou inflammatoires (septicémies, Lupus érythémateux aigu disséminé, infection par le VIH,...), les hémopathies (LMC, LLC, lymphomes malins, anémies hémolytiques chroniques..), l’hypertension portale, parasitoses, ou les Kystes spléniques congénitaux ...etc. Cependant, nos résultats ont montré une absence de syndrome hémorragique ou infectieux.

L’examen clinique de la splénomégalie se fait par palpation en décubitus dorsal ou latéral droit qui retrouve une masse de l’hypochondre gauche, dont il faut apprécier les caractéristiques : la mobilité, la consistance (ferme élastique ou dure), la surface régulière ou non.

Le volume apprécié permet de classer selon l’OMS l’évolution de la splénomégalie en: Stade 0 : rate de volume normale, non palpable même en inspiration profonde, Stade I : rate palpable lors de l’inspiration profonde, normale chez le nourrisson, pathologique chez l’adulte. Stade II : rate palpable lors de la respiration normale, mais qui ne dépasse pas une horizontale passant à égale distance entre le rebord costale et l’ombilic. Stade III : rate qui descend au-dessous de cette ligne, mais qui ne dépasse pas l’horizontale passant par l’ombilic.

Stade IV : rate qui descend au-dessous de l'ombilic, mais ne dépasse pas une ligne passant à égale distance entre l'ombilic et la symphyse pubienne. Stade V : rate qui descend au-dessous de cette ligne et qui est palpable dans la fosse iliaque gauche.

Dans notre population, 27.5% (8 cas/stade) des patients étaient soit en stade I, II, ou IV, alors que seule 10.3% (3 cas) et 6,8% (2 cas) des cas étaient en stade III et V respectivement (Figure 15).

Ainsi, une splénomégalie massive a été observée dans différentes études Algérienne (Djouadi *et al.*, 2017 ; Entasoltan *et al.*, 2017 ; Nashi *et al.*, 2018).

Toutefois, c'est en fonction de ces orientations cliniques que seront demandés, selon les cas et dans notre étude sur les patients suspectés de LMC, un hémogramme, un myélogramme.

III.2.2. Délai entre les premiers signes et le diagnostique

Le délai entre l'apparition des premiers signes de la maladie et la première consultation en Hématologie est un facteur déterminant et pourrait interférer sur l'aggravation de la maladie et son pronostic.

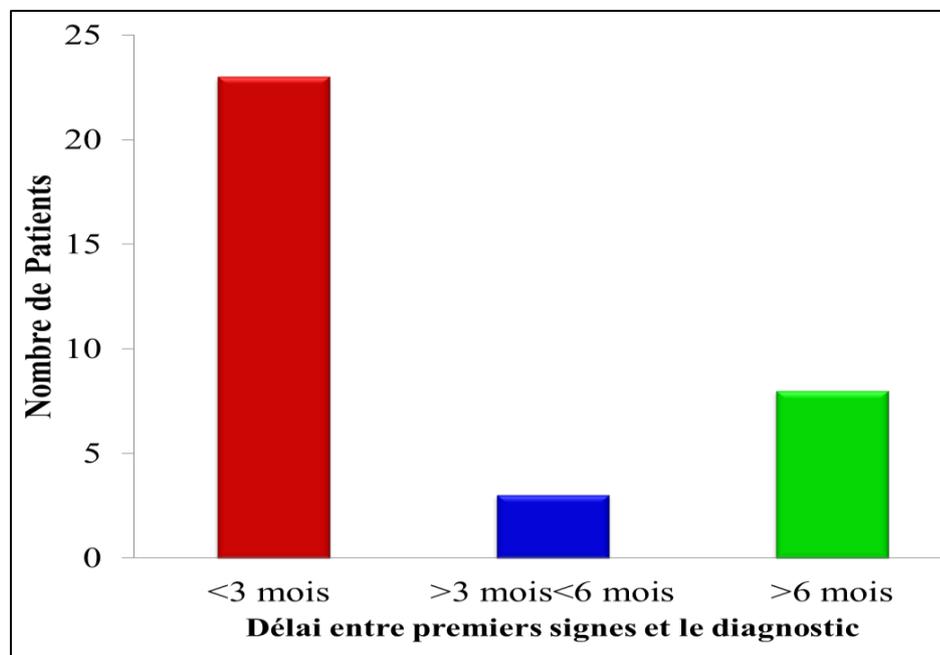


Figure 16. Délais de diagnostic par mois pour le nombre total des patients.

La majorité de nos patients ont été diagnostiqués dans un délai inférieur à 3 mois, soit 67% des cas (23 cas), alors que seule 33% (11 cas) ont été diagnostiqués au-delà de 3 mois. Un délai de diagnostic qui dépasse les 3 mois, est trop long et pourrait ainsi interférer sur le stade et le pronostic de la maladie (**Figure 16**).

III.2.3. Résultats de l'hémogramme au moment du diagnostic

Les données de l'hémogramme sont essentielles au diagnostic et pour préciser le pronostic. L'hémogramme permet de mettre en évidence des cellules leucémiques et de détecter les anomalies caractéristiques de la LMC tels qu'une anémie modérée, une hyperleucocytose franche ($GB > 50\,000/\mu l$), une polynucléose neutrophile avec Myélémie et leucoblastes sanguins importants et un excès quasi constant de granulocytes basophiles. Aussi, le nombre de plaquettes est fréquemment augmenté et une thrombopénie s'installe avec la transformation aiguë.

Tableau V. Résultats de l'hémogramme chez les patients suspectés de LMC.

Paramètres		Homme % (n)	Femme % (n)	Total % (n)
Leucocytes (μl)	$<10 \times 10^3$	-	-	3% (1 cas)
	$10-100 \times 10^3$	-	-	26.5 (9 cas)
	$100-200 \times 10^3$	-	-	32% (11 cas)
	$200-300 \times 10^3$	-	-	26.5 % (9 cas)
	$>30 \times 10^3$	-	-	12% (4 cas)
Hémoglobine (g/dl)	<5 g/dl	5.9% (2 cas)	2.9% (1 cas)	8.8% (3 cas)
	<8 g/dl	11.8% (4 cas)	2.9% (1 cas)	14.7% (5 cas)
	8-10 g/dl	20.6% (7 cas)	11.8% (4 cas)	32.6% (11 cas)
	10-11.6g/dl	26.5% (9 cas)	14.7% (5 cas)	41.2% (14 cas)
Plaquettes (μl)	$<15 \times 10^4$	-	-	9% (3 cas)
	$15-40 \times 10^4$	-	-	61.5% (21 cas)
	$>40 \times 10^4$	-	-	29.5% (10 cas)

Dans notre étude, le taux de globules blancs était supérieur à $10\,000\text{ GB}/\mu l$ chez 33/34 patients soit 97% des cas. Cette hyperleucocytose est un paramètre essentiel pour le

diagnostic de LMC ; en effet l'hyperleucocytose est dans la majorité des cas est supérieure à 50000 GB/ μ l au moment du diagnostic chez les patients atteints de LMC (**Tableau V**).

Lorsqu'elle est très importante (> 100000 GB/ μ l) comme c'est le cas chez 70,5% des patients de notre étude, elle traduit une maladie évolutive avancée. Il est important de s'en préoccuper car il y'a un risque majeur de thrombose veineuse chez ces patients (**Tableau V**).

Les résultats de l'hémogramme montrent également que presque la totalité de nos patients étaient anémique (33/34 cas). L'anémie était présente chez 97% hommes et 100% chez les femmes. Cette anémie était discrète chez 9 hommes contre 5 femmes (Hb 10-11.6 g/dl), modérée chez 7 hommes contre 4 femmes (Hb 8-10 g/dl), sévère chez 4 hommes contre 1 femme ((Hb <8 g/dl), et très sévère chez 2 hommes contre 1 femme (**Tableau V**).

Une anémie avec un taux d'Hb < 10 g/dl n'est retrouvée que chez 15% des patients dans les études de la littérature (**Djouadi et al., 2017 ; Entasoltan et al., 2017 ; Nashi et al., 2018**). Dans notre étude, l'anémie avec taux d'Hb < 10 g/dl est retrouvée dans 47% des cas ; cette donnée est nettement supérieure avec celles de la littérature, traduisant la présence de formes particulièrement évolutives de LMC dans notre étude.

Les résultats de l'hémogramme sont similaires aux études Algériennes de (**Abad et al. (2018) et Entasoltan et al. (2017)**)

III.2.4.Résultats de frottis sanguin à la recherche d'une Myélémie et d'une basophilémie

La présence d'une Myélémie supérieure à 20% est un argument puissant pour évoquer le diagnostic d'une LMC. En effet la Myélémie traduit le passage en bloc de cellules granuleuses immatures médullaires (Promyelocytes, myelocytes et méta-myelocytes) qui sont normalement absentes du sang périphérique (**Figure 17**).

Une Myélémie a été constamment retrouvée chez les patients de notre étude. Le taux de Myélémie était supérieur à 20% chez 85% (29 cas) des patients alors que 15 % (5 cas) présentaient un taux de Myélémie inférieur à 20% (**Figure 17**).

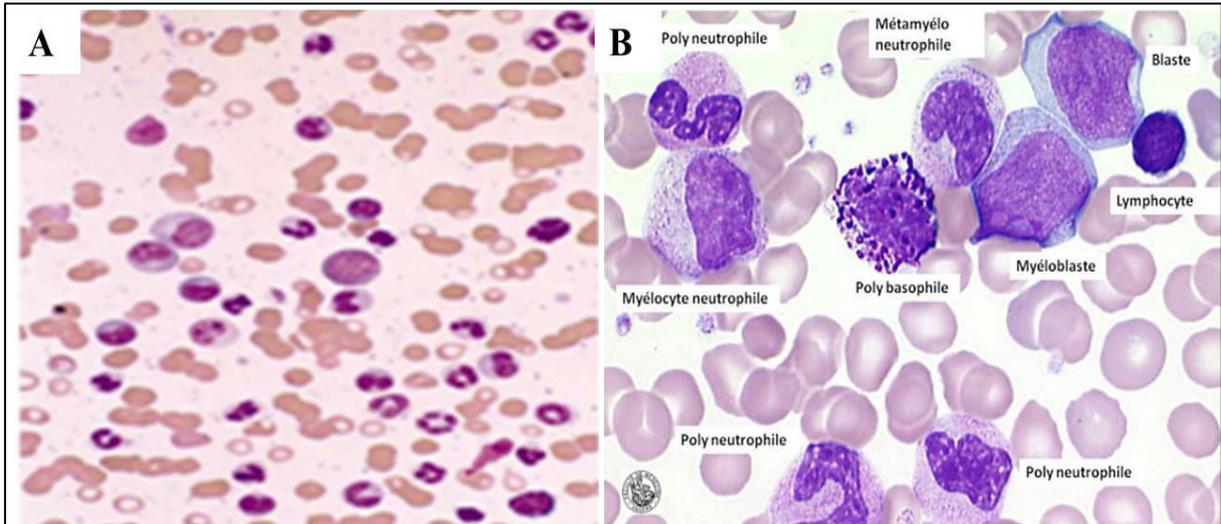


Figure 17. Frottis d'un patient atteint de LMC montrant une hyperleucocytose, polynucléose neutrophile et myélémie. Coloration MGG A : Gx40 ; B : Gx100) (**Taoussi,2020**).

La recherche de basophilémie a révélé une augmentation du taux des polynucléaires basophiles (PB). L'hyperbasophilémie (PB > 150/ μ l) a été retrouvée chez la majorité des patients de notre étude soit 82% (28 cas) de la population étudiée. Le taux de polynucléaires basophiles (PB) normal ne dépasse pas 150 / μ l. Ainsi, 18% (6 cas) des patients ne présentaient pas d'hyperbasophilémie (**Figure 17**).

L'étude du frottis sanguin a permis de révéler la présence de leucoblastes chez 25patients (73.5%) qui présentaient des taux de leucoblastes allant de 1% à 75% de l'ensemble des globules blancs. Le taux moyen de blastes sanguins était de 6% (0-75%). Toutefois, l'analyse de frottis sanguin a révélé l'absence de blastes chez 9 patients (26.5%).

Les plaquettes sanguines ont été évaluées à la numération plaquettaire au moyen d'un automate et contrôlées sur frottis sanguin (**Tableau V**).

Le taux moyen de plaquettes : 343852/ μ l (9000-1429000) :

- Plaques < 150000/ μ l : 3 cas (9%)
- Plaques > 150000/ μ l et < 400000/ μ l : 21 cas (61,5%)
- Plaques > 400000/ μ l : 10 cas (29,5%).

Ces résultats sont similaires aux études Algériennes (**Entasoltan et al., 2017 ; Abad et al.,2018 ; Nachi et al., 2018**)

III.2.5. Résultats du myélogramme au moment du diagnostic

L'examen cytologique (myélogramme) des lignées hématopoïétiques montre un taux moyen de blastes médullaires de 9% (0-100%). Nous avons noté la présence de leucoblastes chez 25 patients (73.5%) alors que 9 patients (26%) n'avaient pas de leucoblastes.

La majorité des patients présentaient 1 à 5 % de leucoblastes soit 50% des cas (17 cas), tandis que 12% des cas (4 cas/taux) avaient un taux de leucoblastes compris entre 5 et 20% ou supérieur à 20% (**Figure 18**). Ces résultats sont similaires aux études Algériennes (**Entasoltan et al., 2017 ; Abad et al.,2018 ; Nachi et al., 2018**).

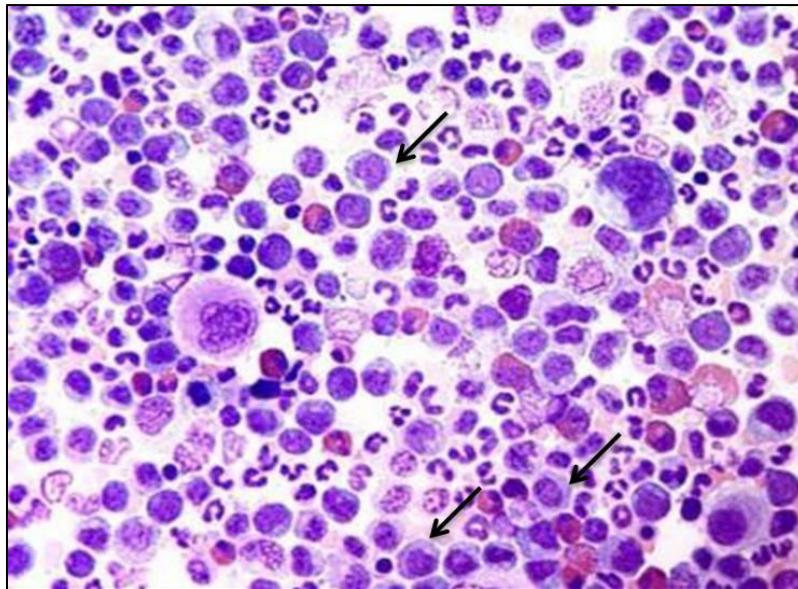


Figure 18 . Frottis médullaire (Myélogramme) d'un patient atteint de LMC montrant une moelle osseuse hypercellulaire, coloration MGG (Gx40)(**Taoussi,2020**).

Le myélogramme, inutile pour établir un diagnostic de LMC, est particulièrement important pour fixer le statut de la maladie (chronique, accélérée ou accutisée) et pour réaliser un caryotype.

Dans notre étude, cet examen nous a permis de classer nos patients en phase **chronique** dans **88%** des cas (30 cas), en phase **accélérée** dans **3%**(1 cas) des cas et en phase **accutisée** (ou blastique) dans **9%** des cas (3 cas) (**Figure 19**).

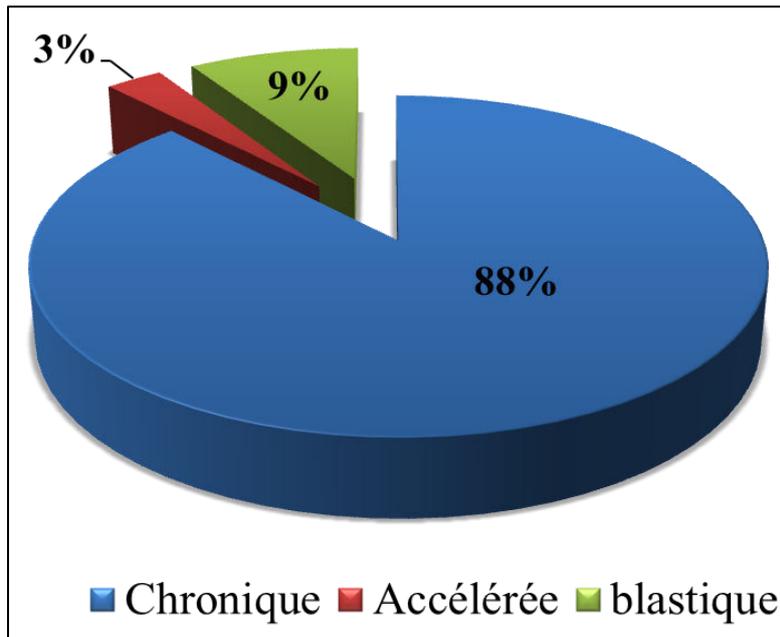


Figure19. Statut des patients (phases de la LMC) dans notre cohorte.

La proportion de patients en phase blastique inclus dans cette étude est supérieure à ce qui est donné dans la littérature (**Ujjan et al., 2015**) où on décrit surtout une phase accélérée dans 10 à 23% des cas ; cette phase accélérée n'a été notée dans notre étude que chez un seul cas.

Ces faits traduisent une évolution défavorable de certains patients avant même l'institution d'un traitement.

III.3. Résultats des données cytogénétiques au diagnostic

Deux méthodologies de diagnostics cytogénétiques ont été appliquées aux patients de notre étude : le caryotype et la FISH (**Tableau VI**).

Tableau VI. Résultats de la FISH et du caryotype

N°	FISH : Signal BCR-ABL	Caryotype	FISH / Caryotype
1	Positif + del der 9	46XY, t(9;22)(q34;q11.2)	Ph1 positif + del der 9
2	Positif	Echec	Fusion BCR-ABL positif
3	Positif	Echec	Fusion BCR-ABL positif (variant)
4	Positif	46XY,t(9;22)(q34;q11.2)	Ph1 positif
5	Positif	46XY,t(9;22)(q34;q11.2)	Ph1 positif
6	Positif	46XY, t(9;22)(q34;q11.2)	Ph1 positif
7	Positif	46XX, t(9;22)(q34;q11.2)	Ph1 positif
8	Positif	46XX, t(9;22)(q34;q11.2)	Ph1 positif
9	Positif + del der 9	46XX ,t(9;22)(q34;q11.2)	Ph1 positif+ del der 9
10	Positif + del der 9	46XY, t(9;22)(q34;q11.2)	Ph1 positif+ del der 9
11	Positif	Echec	Fusion BRC-ABL positif
12	Positif	46XX,t(9;22)(q34;q11.2)	Ph1 positif
13	Positif	46XX,t(9;22)(q34;q11.2)	Ph1 positif
14	Positif	46XX,t(9;22)(q34;q11.2)	Ph1 positif
15	Positif	46XX,t(9;22)(q34;q11.2) Iso17q	Ph1 positif+ iso (17q)
16	Positif	46XX,t(9;22)(q34;q11.2)	Ph1 positif
17	Positif	46XX,t(9;22)(q34;q11.2)	Ph1 positif
18	Positif	46XX ,t(9;22)(q34;q11.2)	Ph1 positif
19	Positif	46XX ,t(9;22)(q34;q11.2)	Ph1 positif
20	Positif	46XY,t(9;22)(q34;q11)	Ph1 positif
21	Positif	46XY,t(9;22)(q34;q11)	Ph1 positif
22	Positif	46XY,t(9;22)(q34;q11)	Ph1 positif
23	Positif	46XY,t(9;22)(q34;q11)	Ph1 positif
24	Positif	46XY,t(9;22)(q34;q11)	Ph1 positif
25	Positif	46XY,t(9;22)(q34;q11)	Ph1 positif
26	Positif	46XY,t(9;22)(q34;q11)	Ph1 positif
27	Positif	46XY,t(9;22)(q34;q11)	Ph1 positif
28	Positif	46XY,t(9;22)(q34;q11)	Ph1 positif

29	Positif	46XY,t(9;22)(q34;q11.2)	Ph1 positif
30	Positif et dupliqué	Echec	Fusion BCR-ABL positif + 32% dupliqué
31	Positif dupliqué	Echec	Fusion BCR-ABL positif + 20% dupliqué
32	Positif	46XY,t(9;22)(q34;q11.2)	Ph1 positif
33	Positif	46XY,t(9;22)(q34;q11.2)	Ph1 positif
34	Positif + del der 22	46XY,t(9;22)(q34;q11.2)	Ph1 positif + del der 22

III.3.1. Résultats du caryotype

Le caryotype qui étudie l'ensemble du génome, reste un examen de référence pour plus de 95% des cas de LMC, il ne détecte pas la translocation (9 ; 22) dans 5% des cas. Il est cependant indispensable pour révéler les translocations (9 ; 22) variantes (impliquant plus de 2 chromosomes dans la translocation (9 ;22)) et les anomalies cytogénétiques additionnelles (ACA).

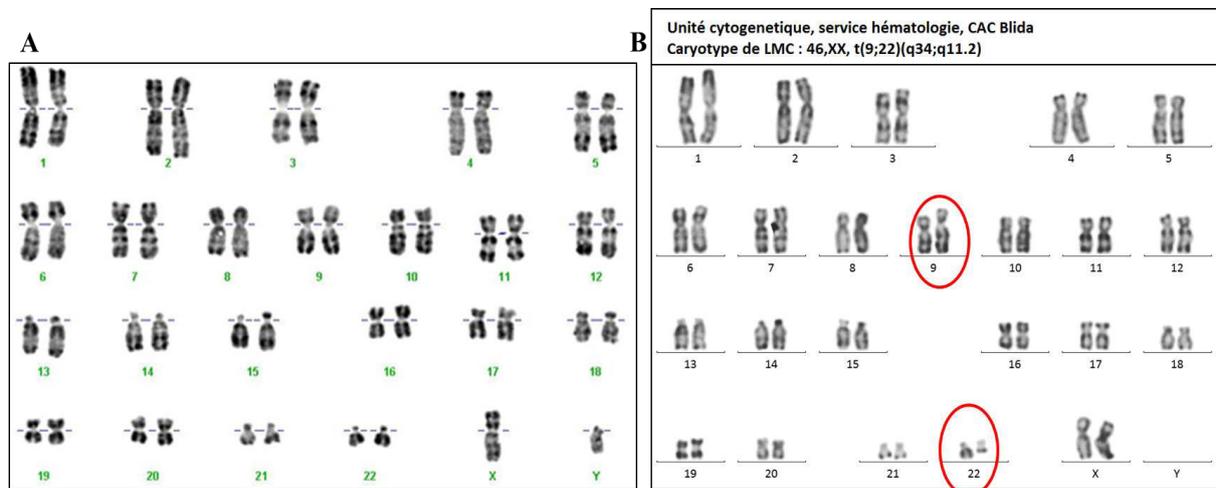


Figure 20. Caryotype humain normal (A) et caryotype typique d'une LMC montrant une translocation t(9 ;22) (q34 ;q11.2) (Taoussi, 2020).

Les résultats de caryotype montrent que parmi nos 34 patients, 29 cas (85%) étaient Ph positif (Ph+). Tous les cas Ph+ (85%) étaient des chromosomes standards simple t(9;22)(q34;q11.2).

Nous avons enregistré un taux d'échec technique dans 5 cas soit 15% de la population étudiée (**Tableau 6, Figure 20**). Cet échec est dû à une culture qui n'a pas poussé (absence de mitoses) dans l'ensemble des cas. Ce fait a été rapporté dans plusieurs travaux où le taux d'échec du caryotype varie de 3% à 10% des cas (**Ujjan et al., 2015; Taoussi et al., 2017 ; Costa et al., 2019**).

Ce taux d'échec constitue un inconvénient du caryotype qui, heureusement est comblé en grande partie par la FISH.

III.3.2. Résultats de la FISH

La FISH a été réalisées chez les 34 patients, et a permis la détection du gène de fusion BCR/ABL1 dans le chromosome Ph dans 100% des cas (**Tableau 6, Figure 21**).

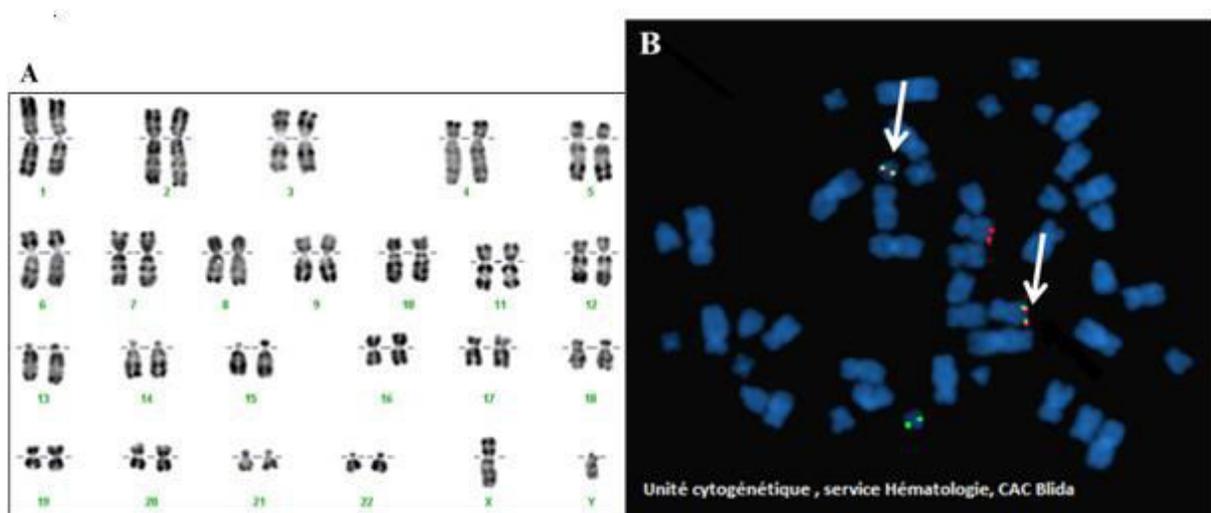


Figure 21. FISH et caryotype sur chromosomes. A : LMC Ph négatif, caryotype normal. B : Présence de Signal BCR-ABL, double fusion, double couleur LMC Ph positif en FISH, Sonde 5' BCR- 3' ABL (**Taoussi, 2020**).

La FISH est un examen ciblé ne révélant que l'anomalie ou les anomalies recherchées ; dans 5% des cas il permet de révéler des anomalies non retrouvées au caryotype, comme le Ph1 masqué et révèle les anomalies cryptiques (insertions, micro délétion du dérivé 9q). Elle met en évidence le signal de fusion BCR-ABL sur les noyaux (FISH interphasique et mitoses (FISH métaphasique)).

En effet, dans notre étude, la FISH a été un examen essentiel en raison de l'absence d'échec lié à la procédure. De façon intéressante, la FISH a révélé dans les 5 cas où il y avait un échec du caryotype, la présence du signal BCR-ABL dont **deux** cas de **duplication** du

signal et **un cas variant** à trois chromosomes ainsi que **quatre** anomalies additionnelles non visibles au caryotype ; il s'agit de trois **del der 9** et d'une **del der 22** détectées par FISH . Ces anomalies font partie des ACA de type mineur (**Tableau 6**).

III.3.3. Score de Sokal

Le score Sokal est le principal score pronostic utilisé pour les LMC. Il prend en compte : l'âge du patient, le nombre de plaquettes, la taille de la rate et le pourcentage de blastes sanguins. Trois groupes de risque avec des survies différentes sont établis: faible risque (score <0,8), risque intermédiaire (score entre 0,8 et 1,2), haut risque (score >1,2). En l'absence de comorbidité, un score élevé, défavorable, peut inciter à prescrire d'emblée le nilotinib, ITK dit de 2^e génération (ITK2, inhibiteur de la tyrosine kinase)(**Dupraz, 2014**).

Le score de Sokal a été établi pour stratifier les cas de LMC sur le plan pronostic.

- Faible : 10 cas (30%)
- Intermédiaire : 12 cas (35%)
- Haut : 12 cas (35%)

III.4. Anomalies cytogénétiques additionnelles (ACA)

Des anomalies cytogénétiques additionnelles sont retrouvées dans 7 cas (20,6%) réparties en : anomalies majeures dans 3 cas (8,8%) et mineures dans 4 cas (11,8%) (**Tableau 6**).

Les ACA majeures sont représentées par :

- Une duplication du **Ph1** (double Ph1) dans deux cas (Patients 30 et 31) (**Figure 22A, 23**).
- Un **iso17q** dans un cas (Patient 15) (**Figure 22 B**).

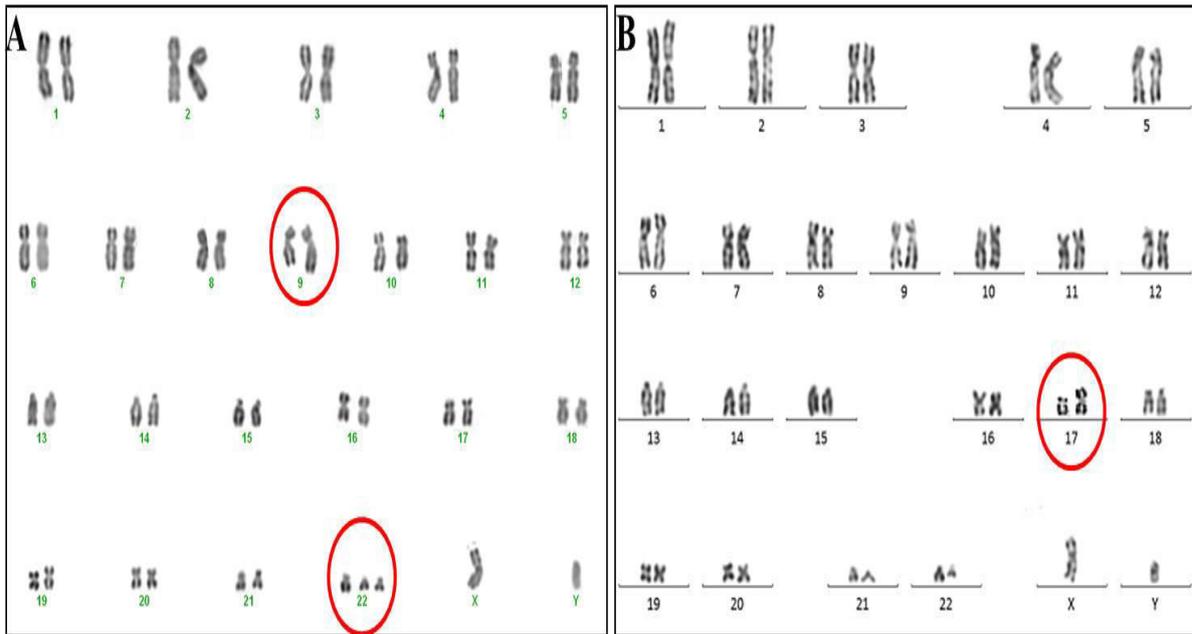


Figure 22. Caryotype de LMC montrant des ACA majeures. A : Ph1 dupliqué (double Ph1) ;
 B :Caryotype de LMC : Ph1 + iso (17q)(Taoussi, 2020)

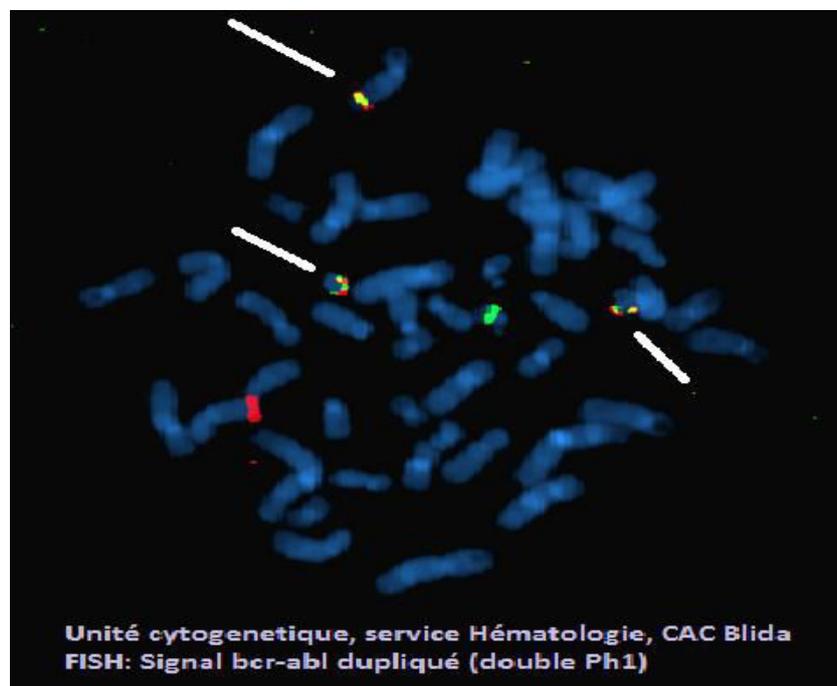


Figure 23.FISH : LMC : BCR-ABL dupliqué (Taoussi, 2020)

Tableau VII.Caractéristiques des patients présentant des ACA majeures (Taoussi, 2020).

Caractéristiques patients	Patient n°30	Patient n°31	Patient n°15
Age	42	37	21
Sexe	M	M	F
Délai consultation : mois	7	8	2
Débord splénique : cm	20	18	4
Taux de Globules blancs/ μ l	740	365960	81900
Myélémie %	10	45	55
Taux de P. Basophiles %	0	4	0
Taux Hémoglobine : g/dl	5,2	6,8	11,1
Taux plaquettes / μ l	9000	254000	204000
Taux leucoblastes sanguins %	75	4	12
Taux leucoblastes médullaires %	100	0	9
Caryotype	Echec	Echec	46XX,t(9;22)(q34;p11.2,iso17q
FISH	76% Ph1+ 32% Ph1 dupliqué	80% Ph1+ 20% Ph1 dupliqué	46XX, t(9;22)(q34;q11.2)
Statut LMC	Phase Accutisée	Phase Chronique	Phase acutisée
Score de Sokal	Haut	Haut	Haut
Type de traitement	Imatinib	Imatinib	Imatinib
Réponse au traitement	Echec	Echec	RMM3
Etat	Décédé	Vivant	Vivante

RMM3 : Réponse moléculaire majeure 3

Dans notre étude, les **anomalies additionnelles majeures** ont été retrouvées dans **3 cas (8,8%)** ; dans la littérature la fréquence des ACA est variable aux alentours de 5% (**Tableau VII) (Lestienne et al.,2016)**

Dans les 3 cas de notre étude, il s'agit de patients jeunes (21, 37 et 42 ans) présentant dans deux cas un débord splénique important (20 et 18 cm respectivement). Dans deux cas il

existait une Myélocémie importante (45 et 55%), une anémie sévère (Hb= 5,2 g/dl et 6,8 g/dl), un échec du caryotype. Le statut LMC comportait en phase accélérée (1 cas) et en phase accutisée (1 cas), un score pronostique **haut** dans les **3** cas, une **résistance** au traitement par anti tyrosine kinase dans **deux** cas et un **décès** dans **un** cas.

Les anomalies cytogénétiques additionnelles ACA sont décrites dans la littérature depuis près de 30 ans. A l'ère du traitement conventionnel par hydroxy-urée (HU) et interféron (IFN).

L'impact pronostique de la présence des ACA a été bien documenté à cette époque et s'est traduit par une survie inférieure à celle des patients sans ACA (**Fabarius et al., 2011 ; Safaei, 2018**)

A l'ère des thérapies ciblées, les anti tyrosine kinases, l'impact pronostique des ACA a été gommé par ces traitements en termes de survie globale ; en termes de survie sans progression, l'impact péjoratif demeure.

IV. Discussion Générale

La leucémie myéloïde chronique (LMC), un syndrome myéloprolifératif, est beaucoup plus fréquente dans les pays occidentaux avec des incidences chez l'adulte de l'ordre de 1,7 pour 100 000 habitants vs 0,51/ 100 000 en Algérie en 2018 (**Djouadi et al., 2019**). L'incidence dans notre pays se rapproche beaucoup plus des incidences observées en Chine et en Suède et dans les autres pays Nord Africains.

Sur le plan clinique et biologique, la LMC des patients algériens semble être fréquemment agressive avec une anémie et une splénomégalie massive associée dans la majorité des cas à un Sokal à haut risque (**Djouadi et al., 2017 ; Entasoltan et al., 2017 ; Nashi et al., 2019**).

La LMC se caractérise par une prolifération importante de la lignée myéloïde, ainsi que par la présence d'une anomalie chromosomique, le chromosome Philadelphie (Ph1). En effet, on observe chez plus de 90% des patients atteints de LMC une translocation du matériel génétique entre les chromosomes 9 et 22. Ceci entraîne l'insertion du gène ABL qui se trouve habituellement au niveau du chromosome 9 et qui code pour une tyrosine kinase de la famille Src, dans le gène BCR du chromosome 22.

Le gène BCR-ABL1 issu de cette fusion entraîne une surexpression de l'activité tyrosine kinase avec pour conséquence l'activation exagérée d'une voie de transduction du signal qui stimule la croissance (**Bachir Bouiadjra et al., 2009**).

Des translocations variantes peuvent être causées par différents mécanismes. Certaines variantes sont causées par plusieurs ruptures simultanées (une étape) et certaines surviennent à la suite de deux, voire plus, événements génétiques en succession proche (en deux étapes ou en plusieurs étapes) (**Bennour et al., 2016; Costa et al., 2019**).

La cytogénétique conventionnelle via l'établissement du caryotype conserve une place importante dans le diagnostic des LMC pour la détection du chromosome Ph au stade métaphase de la division cellulaire. Des techniques de biologie moléculaire, notamment la technique FISH, se sont développées grâce à la disponibilité de sondes moléculaires qui s'hybrident sur les séquences homologues dans les chromosomes (FISH métaphasique) et les noyaux (FISH interphasique). Ces techniques ont permis de progresser dans la détection et la caractérisation des anomalies chromosomiques et/ou moléculaires présentes dans ces hémopathies (**Bachir Bouiadjra et al., 2009**).

L'isochromosome 17q est associé à la perte du bras court (17p) et à la duplication du bras long (17q) qui est à l'origine de l'anomalie. Comme le gène TP53 qui est situé sur le bras court du chromosome 17, l'isochromosome 17q est connu pour être le précédent le plus courant dans le cancer. Ce réarrangement entraîne la progression et l'initiation de la tumeur. Cependant, les mutations p53 n'ont pas été trouvées dans les cas de LMC avec l'iso(17q), ce qui soulève la possibilité que le mécanisme pathogène pertinent chez les patients atteints de LMC-CB avec l'anomalie iso(17q) est la perte de fonction de gènes encore non identifiés (**Fioretos et al., 1999 ; El Gendi et al., 2016**).

Depuis le début des années 2000, l'introduction de l'imatinib (IM) comme médicament inhibiteur de la tyrosine kinase (ITK) a profondément amélioré le pronostic de la LMC (**Cross et al., 2018**). Avant l'apparition des techniques de biologie moléculaire, le suivi biologique de la LMC était réalisé par l'étude de la formule de numération sanguine et par la cytogénétique qui démontrait la disparition du chromosome Ph1 dans le cas où le traitement était efficace.

Le suivi thérapeutique des patients atteints de LMC repose actuellement sur la quantification des transcrits de fusion BCR-ABL1. Cette quantification est basée sur une technique standardisée, la RQPCR et le résultat est exprimé sous forme d'un rapport entre l'expression du transcrit BCR-ABL1 et celui d'un gène de référence comme l'ABL1, GUSB ou encore BCR (**Hochhaus et al., 2017; Nachi et al., 2019**).

Chapitre III. Résultats et Discussion

La limitation de l'analyse cytogénétique est que le chromosome Ph ne peut pas être détecté dans la métaphase agglomérée ou dans les cellules interphases. L'hybridation in situ par fluorescence (FISH) est une technique de génétique moléculaire très sensible, qui permet de détecter la région de cluster de point de rupture - complexe d'Abelson (BCR-ABL) et la maladie résiduelle minimale chez tous les patients atteints de LMC Ph positif non seulement en métaphase mais aussi en interphase (**Jha et al., 2006**).

Enfin, des études cytogénétiques et moléculaires doivent être menées pour une meilleure prise en charge des cas de LMC. Nos résultats pourraient être très utiles pour orienter les options thérapeutiques appropriées pour les patients atteints de LMC.

Conclusion

CONCLUSION

Dans notre série de 34 patients, nous avons noté une prédominance masculine (sexe ratio : 2,1) avec un âge moyen de 46,8 ans (21-85). Tous les cas sont originaires de la région centre-ouest de l'Algérie. 90,9 % de nos patients n'ont pas une profession à risque les exposant à des produits toxiques tel que le benzène.

Cliniquement la splénomégalie est présente chez 85,2% des patients (Stade 1 : 27,5%, Stade 2 : 27,5%, Stade 4 : 27,5%). Le délai entre les premiers signes de la maladie et la consultation en hématologie est inférieur à 3 mois dans 67% des cas.

Les résultats de l'hémogramme et du frottis sanguin montrent une anémie (97% des cas), une hyperleucocytose (97% des cas), une Myélémie supérieure à 20% (>20%) chez 85% des cas, une hyperbasophilémie (PB > 150/ μ l, 82%), avec la présence de leucoblastes chez 73.5% des patients. Ces résultats suggèrent une LMC agressive associée à un Sokal à haut risque (35% des cas).

Les résultats du myélogramme montrent la présence de leucoblastes chez 73.5% et une phase chronique chez 88% des cas.

Les résultats cytogénétiques par caryotype en bandes R montrent la présence d'un chromosome Ph+ standard simple (t(9;22)(q34;q11.2)) dans 85% avec un taux d'échec technique de 15%.

La FISH a permis la détection du gène de fusion BCR/ABL1 dans le chromosome Ph dans 100% des cas dont deux cas de duplication du signal et un cas variant à trois chromosomes ainsi que quatre anomalies additionnelles non visibles au caryotype ; il s'agit de trois del der 9 et d'une del der 22.

Deux principales ACA majeures ont été retrouvés chez 3 cas (8.8%), correspondant à une duplication du Ph1 (double Ph1) dans deux cas par FISH et un iso17q dans un cas par caryotype. Ces ACA ont eu un impact pronostique défavorable chez les patients qui les ont présentés.

Enfin le caryotype et la FISH sont des techniques cytogénétiques et moléculaires essentielles pour le diagnostic, le pronostic pour une meilleure prise en charge thérapeutique des patients atteints de LMC.

En perspective il serait intéressant de :

Conclusion

- Etudier les variants de la translocation (9 ;22) à l'aide du caryotype et de la q-PCR.
- Etudier l'apport de la biologie moléculaire dans la prise en charge des patients LMC.
- Etendre la technique de cytogénétique conventionnelle et de biologie moléculaire dans le panel de diagnostic de la LMC en Algérie.

References bibliographique

Références bibliographiques

Abad, M.T. Cours hématimètrie quatrième année, Faculté de Médecine, Université Blida 1, **2018**.

Alana, B. Adenopathy Medical news today, **2018**.

American cancer society. Chronic myeloid leukemia.,(<https://www.cancer.org/cancer/chronic-myeloid-leukemia.html>) (consulté en juillet 2020)

American Society of Clinical Oncology.Leukemia - Chronic Myeloid - CML: Treatment Options; **2018**. (cancer.org | 1.800.227.2345)

Apperley,JF. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*, **2015**, 385(9976):1447-1459.

Baccarani, M ; Pileri S ; Steegmann, J-L; Muller, M; Soverini, S; Dreyling, M. et al.Chronic myeloid leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, **2012**, 23 (suppl 7).

Baccarani, M; Deininger, MW; Rosti, G; Hochhaus, A; Soverini, S; Apperley, JF; et al.European Leukemia Net recommendations for the management of chronic myeloid leukemia.*Blood.*, **2013**; 122 : 872-84.

Bachir Bouiadjra, S ; Moulessehou, S ; Sebaa, A. *et al*. Apport de la cytogénétique moléculaire à l'étude des hémopathies malignes chez des patients hospitalisés à l'hôpital de Sidi-Bel-Abbès (Algérie) *J Afr Cancer* 1,**2009**, 188.

Bennour, A; Saad, A; Sennana. H.Chronic myeloid leukemia: Relevance of cytogenetic and molecular assays *Critical*

Reviews in Oncology/Hematology 97, **2016**, 263–274.

Bonnet Dominique; Dick John E.

Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*, **1997**, volume 3: 730-737.

Bruzzoni-Giovanelli Heriberto ; González Juan R ; Sigaux François ; Villoutreix Bruno O ; Cayuela Jean Michel ; Guilhot Joëlle ; Preudhomme Claude ; Guilhot François., Poyet Jean-Luc ; Rousselot Philippe.Genetic polymorphisms associated with increased risk of developing chronic myelogenous leukemia. *Oncotarget*, **2015**, 6(34).

Cancer Support Community. Myeloproliferative neoplasms (MPNs). <https://www.cancersupportcommunity.org/myeloproliferative-neoplasms>.(consulté en Août 2020)

Cancer treatments centers of America. Chronic myeloid leukemia. <https://www.cancercenter.com/cancer-types/leukemia/types/chronic-myeloid-leukemia> (consulté en Août 2020).

Carlesso, N; Frank, DA; Griffin JD. Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr/Abl. *J Exp Med* **1996**;183:811–20.

Carter, B. Z; Mak, P. Y; Mu, H ; Zhou, H ; Mak, D. H ; Schober, W; Andreeff, M. et al. Combined targeting of BCL-2 and BCR-ABL tyrosine kinase eradicates chronic myeloid leukemia stem cells. *Science Translational Medicine*, **2016**, 8(355), 355ra117–355ra117.

Références bibliographiques

- Castagnetti, F; Gugliotta, G; Breccia, M; Stagno, F; Iurlo, A; Albano, F; et al. Long-term outcome of chronic myeloid leukemia patients treated frontline with imatinib. *Leukemia*, **2015**, 29:1823–31.
- Chomel, J.-C ; Aggoune, D ; Sorel, N ; Turhan, A. G. Leucémie myéloïde chronique. *Médecine/sciences*, 30(4), 452–461., **2014**.
- Cilloni Daniela et Saglio Giuseppe. Molecular Pathways: BCR-ABL *Clin Cancer Res*, **2012**, (18) (4) 930-937
- Cortez, D; Reuther, GW; Pendergast, A. The Bcr-Abl tyrosine kinase activates mitogenic signaling pathways and stimulates G1-to-S phase transition in hematopoietic cells. *Oncogene* , **1997**, 15:2333–42
- Costa, D; Grau, J; Espinet, B; et al. Conventional and molecular cytogenetic studies to characterize 32 complex variant Philadelphia translocations in patients with chronic myeloid leukemia. *Oncol Lett*, **2019**, 17(6):5705-5710.
- Crisan, AM; Coriu, D; Arion, C; Colita, A; Jordan, C; Carol Davila. The impact of additional cytogenetic abnormalities at diagnosis and during therapy with tyrosine kinase inhibitors in Chronic Myeloid Leukaemia .University of Medicine and Pharmacy, Fundeni Clinical Institute, Bucharest, Romania. *Journal of Medicine and Life*, **2015**, Vol. 8, Issue 4, pp.502-508.
- Cross, NC; White, HE; Evans, PA; Hancock, J; Copland, M, Milojkovic, D; et al. Consensus on BCR-ABL 1 reporting in chronic myeloid leukaemia in the UK. *British journal of haematology*, **2018**, 182(6):777-88
- Cumano Ana et Godin Isabelle. Ontogeny of the hematopoietic system. *Annual Review of Immunology*, **2007**; vol 25: 745-785.
- Deininger, M.W. Chronic Myeloid Leukemia: An Historical Perspective, *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, **2008**, (1): 418.
- Deininger, M.W; Bose Shikha; Joanna Gora-Tybor; Yan Xiu-Hua; Goldman, John M; Melo Junia V.. Selective Induction of Leukemia-associated Fusion Genes by High-Dose Ionizing Radiation, *CANCER RESEARCH* 58, **1998**, 421-425.
- De Klein, A; Geurts van Kessel, A; Grosveld, G; Bartram, C. R; Hagemeijer, A; Bootsma, D; Spurr, N. K; Heisterkamp, N; Groffen, J., Stephenson, J. R. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*, **1982**, 300: 765-767.
- Dine, G; Marc Levert; Yves Rehn., Nadia Ali Amar; Said Brahimi; Baptiste Gaillard; Isabelle Bocq; Gabriela Fumagalli. Two Successful Successive Pregnancies in a Woman with CML Treated with Dasatinib and Temporary Peg-Interferon, Department of Hematology, Hopital des Hauts Clos, Troyes 10000, France, *Journal of US-China Medical Science*, **2013**, Volume 10, No. 5-6 (Serial No. 92) 128-133.
- Djouadi, K; Abdennebi, N; Harieche, F; Nacer Ahmed R; Hamladji R.M; Bouchakour, A; Taoussi, S; Abad, M.T et al. Approche épidémiologique de la Leucémie Myéloïde Chronique étude Algéro-Tunisienne à propos de 1349 cas sur 05 ans (2010 à 2014); *Revue Algérienne d'Hématologie*, Janvier **2017**, n° 13-14,.

Références bibliographiques

Djouadi K., Abdennebi N; Ahmed Nacer.R ;Hamladji, RM ;Ouchenane, Z ; Sidi Mansour, N ; Boughrira, S ; Grifi F ;Gheras S ; Ait Ali H ;Touil F/Z ;Hamdi, SY ; Bouchakor M ;Bradai, M ; Abad, MT et al.Etude Epidémiologique de la Leucémie Myéloïde Chronique en Algérie, incidence et prévalence en 2018. Revue Algérienne d'Hématologie. Numéro Spécial Congrès Maghrébin, **2019**.

Dorfman LE ; Floriani MA ; Oliveira TMRDR ; Cunegatto B ; Rosa RFM ; Zen PRG. The role of cytogenetics and molecular biology in the diagnosis, treatment and monitoring of patients with chronic myeloid leukemia. J Bras Patol Med Lab, **2018**, 54(2): 83-91.

Dupraz Chrystelle. Anomalies cytogénétiques additionnels et variant au diagnostic dans la leucémie myéloïde chronique de l'enfant : description et impact pronostic. Université de Poitiers, Faculté de médecine et pharmacie, **2014**.

El Gendi HM, Fouad DA, Mohamed AA, Eissa DG, Mostafa NN.Clinicopathologic features and prognostic impact of isochromosome 17q in chronic myeloid leukemia patients. Egypt J Haematol, **2016**, 41:9-14

Entasoltan B; Bekadja M.A; Touhami H; Mehalhal N; Zouaoui Z; Mesli N., Talbi M; Bachiri A; Michallet M.Outcome of frontline treatment with "generic" imatinib in adult patients with chronic myeloid leukemia in algerian population: a multicenter study. Mediterr J Hematol Infect Dis, **2017**, 9(1): e2017062.

Fabarius Alice; Armin Leitner., Andreas Hochhaus; Martin C. Müller., Benjamin Hanfstein; Claudia Haferlach., Gudrun Goehring., Brigitte Schlegelberger et

al.Impact of additional cytogenetic aberrations at diagnosis on prognosis of CML: long term observation of 1151 patients from the randomized CML study IV. Blood. **2011**,118(26):6760-6768.

Fioretos T; Strömbeck B;Sandberg T, Johansson B; Billström R, Borg A, *et al*. Isochromosome 17q in blast crisis of chronic myeloid leukemia and in other hematologic malignancies is the result of clustered breakpoints in 17p11 and is not associated with coding TP53 mutations. Blood, **1999**, 94 :225-232

Fleming. A. F et Menendez. C. "Blood," in *Principles of Medicine in Africa*, E. Parry, R. Godfrey, D. Mabey, and G. Gill, Eds.Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2004, vol. 78.

Fondation ARC pour la recherche sur le cancer Leucémies de l'adulte.Les symptômes et le diagnostic. **2020**.

Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. Cell, **1997**;88:435-7;

Gambacorti-Passerini, C., Aroldi, A., Cordani, N., & Piazza, R. Chronic myeloid leukemia: Second-line drugs of choice American Journal of Hematology, **2016**; Vol. 91, No. 1,

Gendron Nicolas, Belhouachi Nabila, Morel Véronique, Azgui Zahia, Maloum Karim, Nguyen-Khac Florence, Cayuela Jean-Michel, Davi Frédéric, Merle-Béral Hélène, Chapiro Elise.Leucémie myéloïde chronique avec transcrit de fusion variant *BCR-ABL1* e19a2 :Intérêt de l'identification moléculaire au diagnostic pour le suivi de la maladie résiduelle. Ann Biol Clin, **2014** ; 72 (3) : 359-66

Références bibliographiques

Goldman, J. M et Melo, J. V. Chronic myeloid leukemia, advances in biology and new approaches to treatment. *New England J. Med.*, **2003**. 349: 1451-1464.

Gonon-Demoulian R ; Goldman JM ; Nicolini FE. Historique de la leucémie myéloïde chronique : un paradigme de traitement du cancer *Bulletin du cancer.*, **2014** ; Volume 101 • N° 1.

Groves. F. D; Linet. M. S; S. S. Devesa. Patterns of occurrence of the leukaemias. *European Journal of Cancer Part A.*, **1995** vol. 31, no. 6, pp. 941–949.

Guilhot, F. Indications for Imatinib Mesylate Therapy and Clinical Management. *The Oncologist.*, **2004**, 9(3), 271–281.

Hehlmann, R.; Berger, U; Pfirrmann, M. 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* 17, **2003**, 1529–1537.

Hernandez-Boluda Juan Carlos; Cervantes Francisco. Prognostic factors in chronic myeloid leukaemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, **2009**. 343–353.

Heyssel R, Brill AB, Woodbury LA, et al. Leukemia in Hiroshima atomic bomb survivors. *Blood*, **1960**;15(3):313-331.

Hochhaus A., Baccarani M., Silver RT., et al. European Leukemia Net 2020 recommendations for treating chronic

myeloid leukemia. *Leukemia*, **2020**, 34(4):966-984.

Hochhaus A, Larson RA, Guilhot F, Radich JP, Branford S, Hughes TP, et al. Long term outcomes of imatinib treatment for chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, **2017**; 376(10):917-27.

Hughes TP, Hochhaus A, Branford S, et al. Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS). *Blood*. **2010**;116(19):3758-3765.

Hughes TP, Saglio G, Kantarjian HM et al. Early molecular response predicts outcomes in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase treated with frontline nilotinib or imatinib. *Blood.*, **2014**; 123(9):1353–1360

Huh J, Jung CW, Kim JW, Kim HJ, Kim SH, Shin MG, et al. Adverse prognostic impact of abnormal lesions detected by genome-wide single nucleotide polymorphism array-based karyotyping analysis in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. **2011** ; 90 : 1255-64.

Imberon Ellen Estimation du nombre de cas de certains cancers attribuables à des facteurs professionnels en France. Département santé travail – Institut de veille sanitaire 94410 Saint-Maurice, France., **2003**.

Info cancer. Le diagnostic de la LMC. <https://www.arcagy.org/infocancer/localisations/hemopathies-malignes-cancers-du-sang/leucemie-myeloide->

Références bibliographiques

[chronique/symptomes-et-diagnostic/le-diagnostic.html/2018](#).(consulté en juin 2020)

Irvine DA, Zhang B, Kinstrie R, et al. Deregulated hedgehog pathway signaling is inhibited by the smoothed antagonist LDE225 (Sonidegib) in chronic phase chronic myeloid leukaemia. *Sci Rep.*, **2016**; 6:25476.

Jain SK, Susa M, Keeler ML, Carlesso NDruker B, Varticovski L. PI 3-kinase activation in BCR/abl-transformed hematopoietic cells does not require interaction of p85 SH2 domains with p210 BCR/abl. *Blood* **1996**;88:1542–50.

Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, Muijtjens M, Jones C, Zehnder JL, Gotlib J, Li K, Manz MG, Keating A, Sawyers CL, Weissman IL. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med.*, **2004**. Aug 12;351(7):657-67.

Jha CB, Kucheria K, Choudhary VP. Diagnostic role of conventional cytogenetics and fluorescence in situ hybridization (FISH) in chronic myeloid leukemia patients. *Kathmandu Univ Med J (KUMJ)*.,**2006**;4(2):171-175.

Laboratoire d'hématologie du CHU d'Angers. Faculté de médecine, Myélémie, Erythromyéémie, Erythroblastémie., **2014**.

Lauseker M, Hanfstein B, Haferlach C, Schnittger S, Pfirrmann M, Fabarius A, et al. Equivalence of BCR-ABL transcript levels with complete cytogenetic remission in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase., **2014**. 140 : 1965-9.

Leguay T., Mahon F.X. Chronic myelogenous leukaemia. *EMC-Hématologie*.2(3), 187205., **2005**.

Le Guyader-Peyrou S, Defossez G, Dantony E, Mounier M, Cornet E, Uhry Z, et al. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Volume 2 – Hémopathies malignes. Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim. Saint-Maurice (Fra) : Santé publique France, **2019**. 169 p.

Leukemia and lymphoma society. Réémission sans traitement chez les patients atteints d'une leucémie myéloïde chronique., **2018**.

Luatti S, Castagnetti F, Marzocchi G, Baldazzi C, Gugliotta G, Iacobucci I, et al. Additional chromosomal abnormalities in Philadelphia positive clone : adverse prognostic influence on frontline imatinib therapy : a GIMEMA Working Party on CML analysis. *Blood.*, **2012** . 120: 761-7.

Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science*, **1990** 247:1079–82

Melo JV, Deininger MWN. Biology of chronic myelogenous leukemia—signaling pathways of initiation and transformation. *Hematol Oncol Clin North Am*, **2004**,18:545–68.

Mughal TI, Radich JP, Deininger MW, Apperley JF, Hughes TP, Harrison CJ, Gambacorti-Passerini C, Saglio G, Cortes J, Daley GQ. Chronic myeloid leukemia: reminiscences and dreams. *Haematologica*, **2016**, 101(5):541-58.

Références bibliographiques

- Nachi. M, Guella. D, Dali-Ali.A, Abed .A, Moussaoui.R, Boukhatmi.Y, Entasoltane.B, Belmir.I, Bekadja.MA, Dida.A, Raiah.M, Abo.O. Apport de la biologie moléculaire dans la prise en charge de la leucémie myéloïde chronique : Expérience du service de biochimie de l'EHU d'Oran-Algérie. Journal d'Épidémiologie et de Santé Publique., Décembre **2018** ; JESP N°20
- National cancer institute; U.S.The Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER), chrnic myeloid leukemia, department of health and human services, 2020.<https://seer.cancer.gov/> (consulté en août 2020)
- Nowell, P. C., Hungerford, D. A.A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia, **1960**. Science 132:1497.
- O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, et al.Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. New England Journal Of Medicine, **2003**. 348:994-1004.
- O'Hare Thomas; Deininger Michael W.Toward a Cure For Chronic Myeloid Leukemia, CCR Practice of Translational Oncology, **2008** ;14(24).
- Padaro E, Magnang H, Layibo Y, et al.Les transcrits bcr-abl et leurs corrélations avec l'hémogramme au cours de la leucémie myéloïde chronique (LMC) au Togo [Types of bcr-abl and their correlations with the blood count in chronic myeloid leukemia (CML) in Togo]. *Pan Afr Med J*, **2018**; 30:221.
- Pendergast AM, Muller AJ, Havlik MH, Maru Y, Witte ON. BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non phosphotyrosine-dependent manner.*Cell*, **1991**;66:161–71
- Prakash, O., Yunis, J. J. High resolution chromosomes of the t(9;22) positive leukemias. *Cancer Genet. Cytogenet*, **1984**. 11: 361-367.
- Preudhomme C, Guilhot J, Nicolini FE, Guerci-Bresler A, Rigal-Huguet F, Maloisel F, et al. Imatinib plus peginterferon alfa-2a in chronic myeloid leukemia.N Engl J Med, **2010**; 363:2511–21.
- Quintás-Cardama A, Cortes JE.Chronic myeloid leukemia: diagnosis and treatment. *Mayo Clin.Proc*, 2006. (7):973–88.
- Quintás-Cardama A, Cortes J.Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*. **2009**;113(8):1619-1630.
- Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer*, **2005**, 5:172–83
- Richebourg S, Eclache V, Perot C, Portnoi MF, Van den Akker J, Terré C, et al. Mechanisms of genesis of variant translocation in chronic myeloid leukemia are not correlated with ABL1 or BCR deletion status or response to imatinib therapy. *Cancer Genet Cytogenet*, **2008**. 182 : 95-102.
- Roche-Lestienne C, Boudry-Labis E, Mozziconacci MJ. Place de la cytogénétique dans la prise en charge de la leucémie myéloïde chronique :

Références bibliographiques

actualisation par le Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH). *Ann Biol Clin*, **2016**, 74(5) : 511-5.

Rowley, J. D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243., **1973**: 290-293.

Safaei. A., Monabati.A., Safavi. M., Atashabparvar.A., Hosseini.M. Additional cytogenetic aberrations in chronic myeloid leukemia: a single-center experience in the Middle East Blood Research., **2018**; Volume 53; Number 1.

Sattler M, Mohi MG, Pride YB, Quinnan L R, Malouf NA, Podar K, et al. Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. *Cancer Cell*, **2002**;1:479–92.

Sawyers CL, Callahan W, Witte ON. Dominant negative MYC blocks transformation by ABL oncogenes. *Cell*, **1992**, 70:901–10

Sessarego M, Fugazza G, Bruzzone R, Ballestrero A, Miglino M, Bacigalupo A. Complex chromosome rearrangements may locate the bcr/abl fusion gene sites other than 22q11. *Haematologica*, **2000**.85 : 35-9.

Shtivelman, E., Lifshitz, B., Gale, R. P., Canaani, E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature*, **1985**, 315: 550-554.

Simonsson B, Gedde-Dahl T, Markevarn B et al. Combination of pegylated IFN- α 2b with imatinib increases molecular response rates in patients with low- or intermediate-risk chronic myeloid leukemia. *Blood*, **2011**, 118(12):3228–3235.

Skorski T, Kanakaraj P, Nieborowska Skorska M, Ratajczak MZ, Wen SC, Zon G, et al. Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. *Blood*, **1995**;86:726–36

Smith B, Brümmendorf T, Roboz G, Gambacorti-Passerini C, Charbonnier A, Viquiera A, et al. Efficacy of bosutinib in imatinib-resistant vs dasatinib/nilotinib-resistant chronic phase chronic myeloid leukemia: results from the Phase 4 BYOND Study. *Blood*, **2019**; 134:1650.

Suknutha, K., Ishii, Y., Tao, L., Hu, K., McIntosh, B. E., Yang, D., Swanson, S., Stewart, R., Wang, J., Thomson, J., & Slukvin, I. Discovery of survival factor for primitive chronic myeloid leukemia cells using induced pluripotent stem cells. *Stem cell research*, **2015**, vol. 15, 3: 678-693.

Talpaz M, Hehlmann R, Quintas-Cardama A, Mercier J, Cortes J. Re-emergence of interferon-alpha in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. **2013**;27:803–12.

Talpaz M, Kantarjian HM, Paquette R, et al. A phase I study of BMS-354825 in patients with imatinib-resistant and intolerant chronic phase chronic myeloid leukaemia (CML): results from CA180002; American Society of Clinical Oncology (ASCO), **2005**.

Taoussi S. Images caryotype et FISH. Unité cytogénétique, Service Hématologie, CAC Blida. Algérie.

Terre C, Eclache V, Rousselot P, Imbert M, Charrin C, Gervais C, et al. Report of 34 patients with clonal chromosomal abnormalities in Philadelphia-negative

Références bibliographiques

cells during imatinib treatment of Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, **2004**, 18: 1340-6.,.

Testoni Nicoletta., Giulia Marzocchi., Simona Luatti., Marilina Amabile., Carmen Baldazzi., Monica Stacchini., Mauro Nanni., Giovanna Rege-Cambrin et al. Chronic myeloid leukemia: a prospective comparison of interphase fluorescence in situ hybridization and chromosome banding analysis for the definition of complete cytogenetic response: a study of the GIMEMACMLWP. *Blood*, **2009**, 114: 4939-4943

Tolo Diebkilé A, Koffi KG, Sawadogo GD et al. Impact thérapeutique de l'interféron alpha dans la prise en charge des patients de leucémie myéloïde chronique. *Mali Med.*, **2010**; tome XXV (n°1) : 22-27.

Ujjan ID, Akhund AA, Saboor M, Qureshi MA, Khan S. Cytogenetic and Molecular Analyses of Philadelphia Chromosome Variants in CML (chronic myeloid leukemia) Patients from Sindh using Karyotyping and RT-PCR. *Pak J Med Sci.*, **2015**;31(4):936-940.

US.National Library of Medicine.Genetics home reference, chronic myeloid leukemia, **2020**.<https://ghr.nlm.nih.gov/condition/chronic-myeloid-leukemia> (consulté en août 2020)

Van Maele-Fabry, G., Duhayon, S., Mertens, C., & Lison, D. Risk of leukaemia among pesticide manufacturing workers: A review and meta-analysis of cohort studies. *Environmental Research*, 2008, 106(1), 121–137. Varticovski L, Daley GQ, Jackson P, Baltimore D, Cantley LC. Activation of

phosphatidylinositol 3-kinase in cells expressing abl oncogene variants. *Mol Cell Biol*, 1991;11:1107–13.

Wang H1, Jin J, Wang Y, Huang X, Huang J. Clonal chromosomal abnormalities in Philadelphia-negative cells in chronic myeloid leukemia patients treated with nilotinib used in first-line therapy. *Ann Hematol*, 2013, 92 : 1625-32.

Wang W, Cortes JE, Tang G, et al. Risk stratification of chromosomal abnormalities in chronic myelogenous leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitor therapy. *Blood*, **2016**, 127(22):2742-2750.

Welner, R. S., Amabile, G., Bararia, D., Czibere, A., Yang, H., Zhang, H., et al. Treatment of Chronic Myelogenous Leukemia by Blocking Cytokine Alterations Found in Normal Stem and Progenitor Cells. *Cancer Cell*, **2015**, 27(5), 671–681.

Woo YM, Kim S, Park JH, Lee NY, Kim JW, Kim DDH. Evidence that 6q25.1 variant rs6931104 confers susceptibility to chronic myeloid leukemia through RMND1 regulation. *PLOS ONE*, **2019**, 14(6), e0218968.

Zeidan A, Kakati S, Anderson B, Barcos M, Wetzler M. Monosomy 7 in t(9;22)-negative cells during nilotinib therapy in an imatinib-resistant chronic myeloid leukemia case. *Cancer Genet Cytogenet*, **2007**, 176 : 169-71.

Zerouali SE. Leucémie Myéloïde Chronique, Thèse de doctorat en médecine, université Sidi Mohamed Ben Abdellah, Faculté de médecine et de pharmacie, Maroc, 2019.

Références bibliographiques

Zhang X, Subrahmanyam R, Wong R, Gross AW, Ren R. The NH₂-terminal coiled-coil domain and tyrosine 177 play important roles in induction of a myeloproliferative disease in mice by Bcr-Abl. *Mol Cell Biol*, **2001**, 21:840–53.

Zhou H, Xu R. Leukemia stem cells: the root of chronic myeloid leukemia. *Protein Cell*, **2015**, 6(6):403.

Annexe

Annexe 01 :

Matériel non biologique	Matériel Biologique	Appareillage
Micro Pipettes (5 µl, 10µl, 20 µl, 100 µl, 500 µl, réglable); Embouts jetable; lame et lamelle; tubes coniques; Tubes avec anticoagulant (EDTA); Tubes secs; petit flasques Portoir; plateaux; haricots pipettes jetable; béciers; grands flasques; compresses masque; lunette; gants stériles; le diamond (cutteur); portoirs; tube hépariné; KCL	-Sang veineux : 5 -10 ml dans un tube stérile hépariné. -Moelle osseuse : aspiration recommandée (2 ml) dans une seringue stérile héparinée + tube conique de 15 ml contenant de RPMI complet -RPMI complets contient : Un milieu RPMI 1640, Un sérum de veau foétale, Lglutamine-péni-strepto, Héparine.	Etuve sèche; Vortex; Microscope/Logiciel IKAROS; Un incubateur pour culture cellulaire (5% de CO2); Une hotte à flux laminaire (sécurité microbiologique, risque pathogène); Une hotte chimique pour manipulation de produits toxiques; Une centrifugeuse basse vitesse et une à micro-tubes; Un bain marie thermostaté 0 à 100° C; Deux réfrigérateurs 4°C. Congélateur -20°C; Un hygromètre; Thermobrite

Réactifs : KCL; Fixateur; Eau distillée; NAH₂PO₄; RPMI Pure; RPMI complet; 20 SSC; 2 SSC; Sondes; Peintures; Ethanol; Acide acétique; Méthanol; Igepal 0,3; Igepal 0,1; Alcools 70% 85% 100%; FBS: sérum bovin foetal; Héparine; Streptomycine (anti biotique); Colchicine; IL2; DSP30; Synchro A; Synchro B; Giemsa

✓ *Conditions d'asepsie dans un laboratoire de cytogénétique :*

- Le Port des gants est obligatoire à chaque manipulation et il faut mettre le matériel souillé dans des poubelles prévues à cet effet.
- Les mises en culture sont effectuées stérilement sous hotte à flux laminaire.
- les mises en culture sont effectuées dans une étuve à CO₂ (5%) et à une température de 37°C, flasques dévissées à ¼ de tour, positionnés à plat dans un plateau en inox nettoyé à l'alcool ou un désinfectant de surfaces.
- Toute centrifugation se fait avec des tubes fermés.

Protocoles opératoires :

La mise en culture :

- Quand le taux de cellules est supérieur à 100.000/µl: faire des dilutions.
- Mettre en culture le nombre de ml dans des flasques pour 10 ml RPMI complet, pour chaque flasque éditer le nom et prénom du patient, son numéro de dossier, la date du jour, la technique : soit 24 H synchro (LMC)..

- Positionner les flasques à l'étuve à CO₂ à 37°C, bouchon dévisse ¼ de tour, à plat sur un plateau en inox désinfecté.

Les étalements cellulaires :

Pour une bonne dilution du culot cellulaire : pour 1/3 de culot, mettre 2/3 de surnageant. • Si le culot est trop dilué; on aura un étalement pauvre ; dans ce cas il faut le concentrer en enlevant l'excès du surnageant, Si le culot est trop dense on aura des mitoses chevauchées ce qui empêche de faire l'analyse du caryotype ; dans ce cas il faut le diluer avec du fixateur.

L'idéale est d'obtenir :

- Des mitoses avec des chromosomes pas trop chevauchés (séparation difficile) ni trop éloignés (risque de perte chromosomiques).
- Pas de fonds cytoplasmiques (dénaturation difficile et hétérogène)
- Une préparation pas trop dense (mitoses compactes), pas trop pauvre (culot dilué).
- L'étalement a une très grande importance pour la qualité des mitoses et des bandes chromosomiques.
- Pour un bon étalement il faut respecter les conditions de température (23 °C - 25°C) et un taux d'humidité de 30 à 40% pour avoir des mitoses bien éclatées et des noyaux bien séparés.
- L'humidité joue un rôle très important c à d : si le taux d'humidité trop bas $\leq 30\%$: séchage très rapide des lames donc on aura des mitoses ramassées.
- Si taux d'humidité trop haut $\geq 55\%$: séchage lent des lames ; les chromosomes apparaissent noirs avec la présence de cytoplasme sur les mitoses ; il est préférable après étalement de placer les lames dans une étuve sèche ou une plaque chauffante à 37°C afin qu'elles sèchent rapidement.

Actuellement il existe une enceinte préréglée à une température et une humidité fixe appelée Thermotron qui évite les aléas des changements de température et d'humidité dans l'air ambiant.

- Pour le caryotype : on étale : 5 à 6 lames par patient.
- Pour la FISH : le nombre de lames dépend du panel de sondes pour chaque pathologie.
- Sur chaque lame inscrire : Le nom et prénom du patient, la technique, sonde ou temps de dénaturation pour le caryotype, la date du prélèvement.
- Centrifuger les tubes 1300 tours pendant 5min.
- Enlever le surnageant pour obtenir 1/3 culot pour 2/3 de fixateur.
- Homogénéiser à a pipette pasteur en aspirant doucement et légèrement pour que les cellules ne remontent pas trop dans la pipette (risque de perte cellulaire).
- Préparer des lames superfrost ou super star (lames dégraissées) ; inscrire sur le ord dédié le Nom-Prénom du patient (à défaut du code barre), la culture et la date de culture (exp : M JJ-mm-aa) et la technique : si caryotype, mettre le temps de dénaturation (R 12min 20sec) ; si FISH, mettre la sonde (exp : BCR-ABL TC DF).

- Homogénéiser le culot délicatement et prendre par la pipette pasteur quelques gouttes et laisser tomber sur la lame 2 gouttes aux deux extrémités de la lame pour l caryotype et une seule goutte au milieu pour la FISH.
- Pour la dénaturation en bandes R au tampon phosphate : laisser sécher les lames entre 30 et 45min avant la dénaturation.
- Pour la dénaturation en bandes R à l'EARLE, laisser sécher une nuit.
- Pour la FISH, étalement la veille du prétraitement des lames.
- Vérifier la qualité de l'étalement (richesse cellulaire et qualité des mitoses au microscope à contraste de phase) ; si besoin diluer ou concentrer le culot en rajoutant ou en enlevant du fixateur.

Caryotype :

Procédure :

- Préparer les prélèvements (Culots).
- Préparer des lames (2 lames pour chaque patient) et des compresses (pour le nettoyage des lames).
- Inscrire le Nom-Prénom de chaque patient, date de culture, type de culture (24H Synchro pour LMC, MDS ; 72H pour LLC).
- Préparer un bain marie à 87 C°, et y mettre un bac contenant du NaH₂PO₄.
- La dénaturation se fait à différentes température selon le climat (plus la T est élevée, plus le temps de dénaturation augmente).
- Commencer par bien nettoyer les lames.
- Enlever le surnageant pour obtenir 1/3 culot pour 2/3 de fixateur.
- Homogénéiser à la pipette pasteur en aspirant doucement pour que les cellules ne remontent pas trop dans la pipette.

FISH :

- La FISH se fait dans une chambre noire (technique et lecture).
- Les sondes FISH : Il peut s'agir de sondes locus, de peintures chromosomiques ou de sondes centromériques ou télomériques.

La dénaturation :

- Retirer les sondes du congélateur -20C° et les préchauffer à température ambiante.
- Mettre les sondes dans leur centrifugeuse désignée (bien équilibré).
- Bien homogénéiser la sonde en pipetant plusieurs fois.
- Prélever 10µl de la sonde par test et placer dans un tube eppendorfs. Remettre le tube de sonde à -20C°.
- Laisser la lame et la sonde quelques minutes à température ambiante.
- Déposer 10 µl de sonde sur l'échantillon et couvrir avec une lamelle. Sceller avec une lamelle à l'aide d'un rubber cément et laisser sécher.

Lavage :

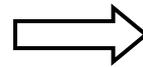
- Après l'ajout du DAPI, il faut recouvrir d'une lamelle et enlever les bulles d'air en appliquant une petite pression sur la lamelle.

✓ **Préparation des réactifs :**

1. Milieu de culture : RPMI complet :

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

- RPMI sans glutamine : 400 ml.
- SVF : 100ml.
- Héparine lithium : 1ml.
- Péni-strepto- L glutamine : 5ml.



2. Synchro test A et B :

Solution prête à l'emploi. Mettre 100 µl de la solution A le jour de la culture à 16h et 100 µl de la solution B le lendemain à 8h du matin.

3. KCL (choc hypotonique) :

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

4. Préparation de la solution de fixation :

3 volumes Méthanol + 1 volume acide acétique.

5. Préparation NaH₂PO₄ (dénaturation bandes R) :

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



6. Coloration Giemsa :

- Mettre 4cc Giemsa dans un bécher, compléter à 100 ml avec de l'eau distillée.

7. Préparation du 2 SCC :

On prend 100 ml du 20 SCC et on complète à 1000 ml d'eau distillée, bien mélangé.

8. Préparation des alcools :

- Alcool 70% : 70 ml éthanol, compléter à 1000 ml de l'eau distillée.
- Alcool 85% : 85 ml éthanol, compléter à 1000 ml d'eau distillée.
- Alcool 100% : éthanol pur.

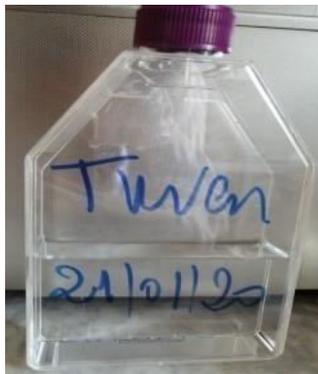
9. Préparation des IGEPAL :

- 0,1 Igepal : 100 ml de 20 SCC + 1 CC Igepal et compléter à 1000 ml avec de l'eau distillée.
- 0,3 Igepal : 10 ml de 20 SCC + 1,5 cc Igepal, compléter à 500 ml avec de l'eau distillée.

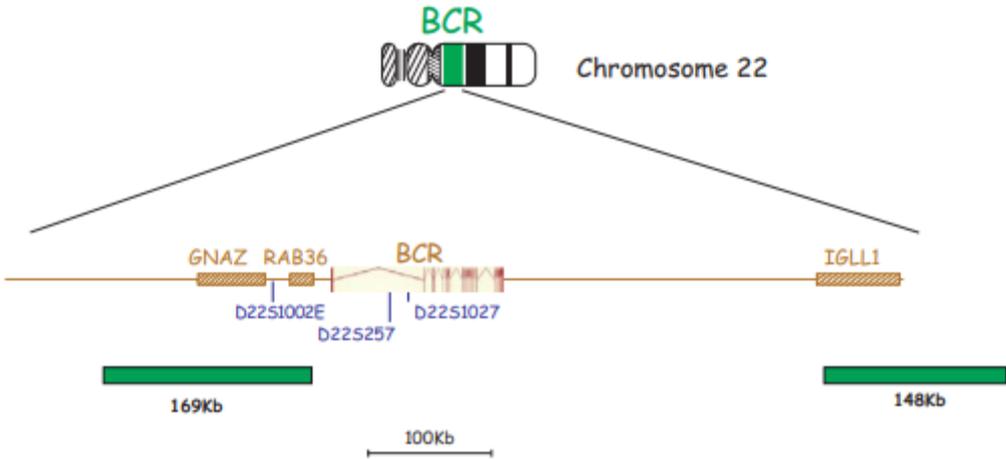


10. Préparation du TWEEN :

- 100 ml du 20 SCC + 1cc TWEEN, compléter à 500ml d'eau distillée.

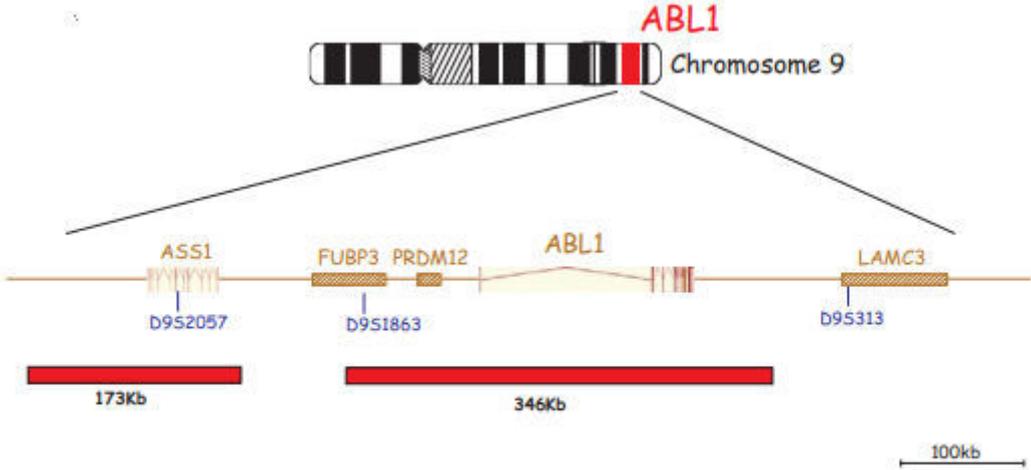


Annexe 02



Sonde BCR

Structure de la sonde BCR (Catalogue Cytocell 2018)



Sonde ABL1

Structure de la sonde ABL1 (Catalogue Cytocell 2018)