

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'enseignement Supérieur et de La Recherche Scientifique
Université SAAD DAHLEB BLIDA 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et de Physiologie Cellulaire



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de MASTER en sciences biologiques

Option : Génétique

Thème

**Etude des anomalies cytogénétiques dans la Leucémie
Lymphoïde Chronique**

Présenté par : Mlle KHALDOUN Nihad
Mlle TAOUSSI Djaouida

Devant le jury:

M ^r Mohamed Said R.	MCA	USDB1	Président
M ^{me} Aïssani R.	MCB	USDB1	Examinatrice
M ^{me} Guessaibia N.	MCA	USDB1	Promotrice
M ^{me} Mokrane A.	MCB	USDB1	Co-promotrice

2019/2020

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'enseignement Supérieur et de La Recherche Scientifique
Université SAAD DAHLEB BLIDA 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et de Physiologie Cellulaire



Université BLIDA1, Laboratoire de recherche sur les Hémopathies Malignes et les Hémoglobinopathies,
Faculté de Médecine, B.P 270, Route de Soumaa, BLIDA, ALGERIE.

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de MASTER en sciences biologiques Option :
Génétique

Thème

**Etude des anomalies cytogénétiques dans la Leucémie
Lymphoïde Chronique**

Présenté par : Mlle KHALDOUN Nihad
Mlle TAOUSSI Djaouida

Devant le jury:

Mr Mohamed Said. R	MCA	USDB1	Président
Mme Aissani. R	MCB	USDB1	Examinatrice
Mme Guessaibia. N	MCA	USDB1	Promotrice
Mme Mokrane. A	MCB	USDB1	Co-promotrice

2019/2020

Remerciements :

C'est avec beaucoup d'efforts et de sacrifices que ce travail de recherche tend aujourd'hui à sa fin et en ce moment précis, nous tenons à nous attarder à juste raison pour exprimer nos remerciements à tous ceux qui nous ont aidés à le mener à terme.

Nos reconnaissances, notre haute considération et notre profond respect à notre encadreur, **Madame Guessaibia. N** qui nous a guidé et encouragé au cours de ce travail, également pour sa gentillesse, sa disponibilité et sa patience.

Nous remercions notre co-promotrice **Mme Mokrane .A** pour toute l'aide qu'elle nous a apportée. Nous étions très touchés pour votre modestie, votre patience et votre générosité. Nous vous remercions infiniment pour tout le temps que vous avez consacré pour nous. Le partage de vos connaissances et votre expérience scientifique en toute circonstance nous ont permis de bien avancer et d'être optimistes. Vous nous avez inspiré.

Nos remerciements s'adressent aussi à Mr **Mohamed SAID. R** d'avoir accepté de présider ce jury et pour son partage de son savoir au cours de notre parcours et de nous avoir inspiré par sa passion envers la science ainsi que de nous avoir poussé à travailler très dur. Nous vous remercions pour vos conseils judicieux qui ont contribué à alimenter notre réflexion.

Nous exprimons toute notre reconnaissance à Mme **Aissani. R** pour son partage de son savoir au cours de notre parcours ; nous vous remercions d'avoir été très compréhensive, merci beaucoup pour votre disponibilité, ainsi que vos conseils judicieux, nous sommes honorées et nous vous remercions d'avoir accepté de faire partie du jury.

Nous tenons à remercier profondément **Mme TAOUSSIS** professeur en hématologie de l'EHS CLCC, Hôpital Frantz Fanon Blida, La réalisation de ce travail n'aurait pas vu le jour sans votre acceptation dans votre unité Merci beaucoup. Nous vous sommes très reconnaissantes.

C'est avec une grande marque d'estime que nous tenons à remercier le chef de département de la Biologie et physiologie cellulaire **Mme SAADIL.**

Nous exprimons en premier lieu nos sincères remerciements à Mme la doyenne

A la fin, nous aimerions remercier toute personne et professeurs de notre université qui ont contribué à notre instruction ainsi que celle de milliers d'étudiants. De nous avoir poussé, nous faire rêver à regarder plus haut.

Dédicaces :

De Nihad :

La louange est à **Allah**, celui qui glorifie ce qui dans les cieux et dans la terre, c'est Allah, le pur le puissant le sage et qui la prière et le salut de mon seigneur soient sur son prophète.

Je dédie ce modeste travail accompagné d'un profond amour.

A celle qui m'a arrosé de tendresse et d'espoirs, à la source d'amour incessible. À la mère des sentiments fragiles qui m'a bénie par ces prières. **Ma mère**

A mon support dans ma vie. Qui m'a appris, ma supporté et m'a dirigé vers la gloire, **Mon père**

A mes très chères sœurs **Nassima** et **Nadjet** et mes chers frères **Youcef** et **Younes**

A toute ma famille maternelle et paternelle.

Puisse dieu vous donner santé bonheur courage et surtout réussite

A ma très chère amie d'enfance, **Kenza**, à qui je porte beaucoup d'estime.

A ma chère amie **Zineb** Je te remercie pour ton amitié chère à mon cœur.

A mon adorable binôme **Djaouida**, je te remercie pour ton amitié chère à mon cœur, et je te souhaite tout le bonheur du monde. Toute mon affection pour ton admirable famille, que je remercie beaucoup.

Pour mes très chers (chers) amis de classe, à toute **la promotion de master génétique 2019-2020** Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées ; vous êtes pour moi des frères, sœurs et des amis sur qui je peux compter. En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

A tous les amis qui j'ai connu jusqu'à maintenant. Merci pour leurs amours et leurs encouragements

A tous ceux et celles qui m'ont aidé et encouragé de près ou de loin dans la réalisation de ce travail, par leur patience, leurs compétences et leurs interventions adéquates aux plans technique et moral. Il me serait difficile de les citer tous. Qu'ils trouvent ici, l'expression de ma reconnaissance.

De Djaouida :

Je dédie affectueusement ce travail,

A mes très chers parents, les prunelles de mes yeux.
Qui m'ont soutenue toute ma vie sans la moindre hésitation et qui ont fourni pour mon succès tout leur temps et leurs énergies et qui ont crus en moi depuis mon enfance.
Que dieu les protège et leurs accorde une longue vie. **Papa, Maman** je suis très reconnaissante et chanceuse d'être votre fille.

Mes remerciements ne pourront jamais égaler votre grand cœur qui m'a apporté du soutien au moment où j'avais besoin d'aide ; je suis très reconnaissante pour le temps que vous avez pris pour m'aider à réaliser mon projet ; je n'aurais pas avancé aussi rapidement si vous n'aviez pas été là c'est de tout mon cœur que je vous remercie mon deuxième **Papa, Dada Mohand Tayeb Abad**

Ce fut une période difficile et ton aide fut plus qu'appréciable .c'est si bon de savoir que tu étais présente à mes côtés ; saches que cette main tendue restera à jamais dans mon cœur. Tu n'es pas juste ma grande sœur, tu es mon ange gardien **Souad**, après toute l'aide que tu m'as apportée une seule chose me vient à l'esprit ...Qu'ai-je fait pour te mériter ? Merci.

A mes chères sœurs **Fatiha** et **Hayat** et je vous dis Merci pour votre aide. Tout ce que vous avez fait signifie beaucoup pour moi ! Vous êtes les meilleures !

Comment peut-on rester insensible à ta sollicitude. Tu m'as consolé lorsque j'avais de la peine, je te remercie sincèrement mon très chère frère **Yacine** pour ton soutien dans ces moment difficiles de notre vie.

A mon frère **Zaki**, un petit message pour te dire que tu comptes beaucoup pour moi. Tu m'as fait rire lorsque j'étais malheureuse. C'est pourquoi je te remercie d'être avec moi.

A mes frères **Mohamed** et **Billel** pour leurs encouragements incessants.

A l'épouse de mon frère, **Zola** et à toutes **mes nièces** et tous mes **neveux** que j'aime beaucoup.

A mon binôme et ma chère collègue de parcours **Nihad**, je te souhaite une vie pleine de réussite, de santé et de bonheur.

A mes très chères amis **Fella, Maya, Asmaa, Maroua, Imane, Abderrahmane, Akram.**
Je vous remercie pour votre amitié.

Merci à toute **la promotion master Génétique 2019 /2020.**

Résumé

La leucémie lymphoïde chronique est une hémopathie maligne, caractérisée par la prolifération et l'accumulation dans la moelle osseuse de lymphocytes B monoclonaux immunologiquement incompetents. Les anomalies cytogénétiques sont des facteurs pronostiques importants et indépendants et qui impactent la survie sans progression et la survie globale dans cette pathologie.

Nous avons réalisé une étude prospective dans une cohorte de patients (n=43) atteints de leucémie lymphoïde chronique dans la région de Blida. L'objectif de ce travail est de rechercher par technique FISH, quatre anomalies cytogénétiques récurrentes importantes dans la leucémie lymphoïde chronique, puis évaluer leur répartition.

L'analyse par FISH a été réalisée sur un prélèvement de sang périphérique sur héparine lithium ; une culture de 72 heures est réalisée. Les sondes utilisées sont: CEP12, 13q14/13qter, P53 (17p13)/ATM (11q22).

Dans notre étude, nous avons observé un sexe ratio de 3.7 avec une nette prédominance masculine (34 hommes et 9 femmes) et un âge médian de 65 ans. L'étude cytogénétique a révélé l'absence d'anomalies ciblées dans 9 cas (21%) et leur présence dans 34 cas (79%). Les anomalies cytogénétiques récurrentes retrouvées se répartissent en del13q14 : 20 cas (10 isolées, 10 associées), trisomie 12 : 10 cas (7 isolées, 3 associées), del 11q22 : 10 cas (4 isolées, 6 associées), del P53 : 6 cas (2 isolées, 4 associées).

Ces données indiquent les fréquences élevées de la del (ATM) et de la del (P53) dans notre étude. Ce constat est du très probablement aux statuts de ces patients qui présentent souvent des formes tumorales de la maladie et au diagnostic tardif, le délai pour consulter pour ces anomalies étant supérieur au délai moyen de l'ensemble des cas.

Ces anomalies sont réputées être de très mauvais pronostic en raison en particulier de la résistance aux schémas thérapeutiques à base de Fludarabine. L'analyse cytogénétique par FISH est un outil utile et indispensable pour préciser la répartition des principales anomalies chromosomiques dans la LLC en raison des implications thérapeutiques qui en dépendent.

Mots clés: LLC, FISH, del13q14, trisomie 12, del ATM, del P53

Abstract

Chronic lymphoid leukemia (CLL) is a malignant blood disease characterized by the proliferation and accumulation in the bone marrow of immunologically incompetent monoclonal B cells.

Cytogenetic abnormalities are important prognostic factors independent of the progression and survival in this pathology.

We performed a prospective study in a cohort of patients (n = 43) with chronic lymphocytic leukemia in the Blida region. The objective of this work is to search by FISH technique, four important recurrent cytogenetic abnormalities in chronic lymphoid leukemia, then to assess their distribution.

The FISH analysis was performed on a peripheral blood sample on lithium heparin; a 72-hour culture is carried out. The probes used are: CEP12, 13q14 / 13qter, P53 (17p13) / ATM (11q22).

In our study, we observed a sex ratio of 3.7 with a clear male predominance (34 men and 9 women) and a median age of 65 years. The cytogenetic study revealed the absence of targeted abnormalities in 9 cases (21%) and their presence in 34 cases (79%). The recurrent cytogenetic abnormalities found are divided into del13q14: 20 cases (10 isolated, 10 associated), trisomy 12: 10 cases (7 isolated, 3 associated), del 11q22: 10 cases (4 isolated, 6 associated), del P53: 6 cases (2 isolated, 4 associated).

These data indicate the high frequencies of del ATM and del P53 in our study. This finding is most likely due to the status of these patients who often present with tumor forms of the disease and late diagnosis, the time to consult for these abnormalities being greater than the average time for all cases.

These anomalies are deemed to have a very poor prognosis, in particular due to resistance to Fludarabine-based schemes..

Cytogenetic analysis by FISH is a useful and indispensable tool for specifying the distribution of the major chromosomal abnormalities in CLL due to therapeutic implications that depend on it.

Key words: CLL, FISH, del 13q14, trisomy 12, del ATM, del P53

ملخص

سرطان الدم اللمفاوي المزمن هو ورم دموي خبيث يتميز بانتشار وتراكم للخلايا اللمفاوية بوحيدة النسيلة الغير مؤهلة مناعيا في نخاع العظام.

الامراض (التشوهات) الجينية تعتبر عوامل تشخيصية مهمة ومستقلة (متفردة) على الانتشار التقدم في المرض وفرص حياة الشخص بهذا الداء.

أجرينا دراسة استباقية على مجموعة من المرضى (ن = 43) مصابين بسرطان الدم الليمفاوي المزمن في منطقة البلية. الهدف من هذا العمل هو البحث بتقنية FISH عن أربعة تشوهات خلوية متكررة ومهمة في سرطان الدم الليمفاوي المزمن ، ثم تقييم توزيعها. تم إجراء تحليل FISH على عينة الدم المحيطية على الليثيوم هيبارين. يتم تنفيذ ثقافة لمدة 72 ساعة. المجسات المستخدمة هي:

CEP12 ، q14 / 13qter13 ، q14 / 13qter13 ، ATM (11q22) / P53 (17p13)

في دراستنا ، لاحظنا أن نسبة الجنس 3.7 مع غلبة ذكور واضحة (34 رجلاً و 9 نساء) ومتوسط عمر 65 عامًا. كشفت الدراسة الوراثية الخلوية عدم وجود تشوهات مستهدفة في 9 حالات (21٪) ووجودها في 34 حالة (79٪). تنقسم التشوهات الوراثية الخلوية المتكررة التي تم العثور عليها إلى del13q14: 20 حالة (10 معزولة ، 10 مرتبطة) ، التثلث الصبغي 12: 10 حالات (7 معزولة ، 3 مرتبطة) ، del 10: 11q22 حالات (4 معزولة ، 6 مرتبطة) ، del P53: 6 حالات (حالتان منفصلتان ، 4 حالات مرتبطة).

هذا الاستنتاج يعود من الجد محتمل لحالات المرضى التي تظهر غالباً انواع ورمية من المرض ولتشخيص متأخر.

المهلة من اجل فحص هذه التشوهات (امراض) عالية بالنسبة لمتوسط المهلة لمجموع الحالات.

غير ان هذه التشوهات معروفة بتشخيص سيء و ذلك لسبب خاص وهو المقاومة للمخططات العلاجية ذات العنصر القاعدي

Fludarabine.

التحليل الجيني الموضوعي بتقنية الادمج الموضوعي الفلوري اداة (وسيلة) مفيدة لا غنى عنها من اجل توضيح(تحديد) التوزيعات للتشوهات الكروموزومية الاساسية لسرطان الدم اللمفاوي نتيجة الاثار المترتبة على العلاج الذي يعتمد عليه .

الكلمات المفتاحية: FISH, del13q14, trisomie 12, del ATM, del P53 سرطان الدم اللمفاوي

Liste des figures

Figures	Page
Figure n° 1: Processus de différenciation et transformation monoclonale	2
Figure n° 2: Origine de la cellule de la leucémie lymphoïde chronique.	6
Figure n° 3 : Interaction entre le stroma et les cellules LLC-B.	8
Figure n° 4 : Voies de signalisation du BCR dans la LLC	9
Figure n° 5 : Étalement sanguin typique d'une LLC.	10
Figure n° 6 : Le rôle de la protéine ATM dans le cycle cellulaire.	16
Figure n° 7 : Domaine Structuraux et fonctionnels de la P53.	17
Figure n°8 : Blocage de l'initiation de la phase S par p53 et p21.	18
Figure n°9 : Modèle de l'activation de p53.	19
Figure n°10: NOTCH1 protein structure and signaling activation.	22
Figure n°11 : Voies canoniques et non canoniques du facteur nucléaire kappa B.	23
Figure n°12 : Impact potentiel des mutations SF3B1 dans la LLC	24
Figure n°13 : Sonde 13q14q34	26
Figure n°14 : Sonde centromère du chromosome 12/MDM2.	26
Figure n°15 : Sonde couplée CEP12/13q14q34	27
Figure n°16 : Sonde couplée 11q22.3 (ATM)/17p13.	27
Figure n°17 : Répartition des patients selon le sexe.	35
Figure n° 18 : Répartition des patients selon l'origine géographique.	36
Figure n°19 : Répartition des patients selon la profession.	36
Figure n°20 : représentation des comorbidités.	37
Figure n°21 : Répartition des cancers familiaux.	38
Figure n° 22 : Circonstances de découverte.	39
Figure n°23 : Frottis sanguin de LLC typique.	40
Figure n° 24 : Frottis sanguin de LLC atypique.	40
Figure n° 25 : Répartition des types cytologiques de LLC.	41
Figure n°26 : Répartition selon les anomalies cytogénétiques.	43
Figure n°27 : CEP 12/13q14 ; q34 normale.	48
Figure n°28 : ATM/P53 normale.	48
Figure n°29: Délétion 13q14 sur mitose et noyaux.	49
Figure n°30 : Délétion 13q14 sur noyaux.	50
Figure n°31 : Trisomie 12 sur mitose et noyaux.	51
Figure n°32 : Trisomie 12 sur mitose et noyaux.	51
Figure n°33 : del ATM sur noyaux.	52

Figure n°34 : del P53 isolée sur mitose	53
Figure n°35 : del P53 isolée sur mitose	54
Figure n°36 : Anomalies complexes.	55
Figure n°37 : Le microscope à fluorescence.	71

Liste des tableaux

Tableaux

	Pages
Tableau I : Classification FAB des hémopathies B et T.	4
Tableau II : Score de Matutes pour le diagnostic de LLC	10
Tableau III : Récapitulatif des conséquences des anomalies cytogénétiques récurrentes dans la LLC.	19
Tableau IV : Données de l'hémogramme.	40
Tableau V : Répartition des scores de Matutes des patients.	41
Tableau VI : Récapitulatif de l'analyse cytogénétique.	46
Tableau VII : Comparaison des résultats de notre étude FISH avec la littérature.	57

Abréviations

ACPA : Analyse Chromosomique sur Puce à ADN

ADN : Acide DesoxyriboNucleique

ANK : Ankirin

ATLL : Adult T Leukemia/Lymphoma (leucémie/lymphome T de l'adulte)

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

BCL2 : B Cell Lymphoma 2

Bcl-xl : B-cell lymphoma-extra large

BCR: B Cell Receptor

ZMYM3 : Zinc finger MYM 3

β2m :β2 microglobuline

BIRC3 : Baculoviral IAP Repeat Containing 3

BTK : Bruton Tyrosine Kinase

CD: Cluster de Différenciation

CD 40L : CD 40 ligand

CDK4 : Cycline-dependante kinase 4

CGH array : Array comparative genomic hybridization

CIRS : Cumulative Illness Rate Scale

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

c-Myc : protéine oncogène

CNAs : Copy Number Abnormalities

CXCL12: C-X-C motif 12 ou (SDF1 : Stromal Derived Factor 1)

CXCR4 (CD184) : C-X-C Chemokine Receptor 4

DDX3X : Dead box helicase 3, X-linked

DNA-PK : DNA-dependent Protein Kinase

DSP 30 :single stranded CpG unmethylated phosphorothioate oligodeoxy nucleotide

EGR1 : Early Growth Response 1

EGR2: Early Growth Response 2

FAB : Franco-Américano-Britannique

FAT1: gene suppresseur

FBXW7: F-Box and WD repeat domain containing 7

FCR : Fludarabine Cyclophosphamide Rituximab

FISH : Fluorescent In Situ Hybridization

FIT : état de santé physique et biologique

FL : Follicular Lymphoma (lymphome folliculaire)

FMC7: antigène lymphocytaire

GSH : Glutathion

HAUSP: Herpes Associated Ubiquitin Specific Protease

HCL : HairyCellLeukemia (leucémie à tricholeucocytes)

IgVH : Immunoglobulin Heavy chaine Variable

IL-6 : Inter Leukine-6

IRF4 : Interferon Regulatory Factor 4

LA : Leucémie Aigue

LAL : Leucémie Aigue Lymphoblastique

LAM : Leucémie Aigue Myeloblastique

LB : Lymphocyte B

LDT : Lymphocyte Doubling Time (temps de doublement des lymphocytes)

LFA-3 : Lymphocyte Fonction Associated antigene 3

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique T

LPL : Leucémie Pro Lymphocytaire

LPLT : Leucémie Pro Lymphocytaire T

LPS : Lipo Poly Saccharide

LT : Lymphocyte T

MAP : Mitogen Activated Protein.

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases

MCL : MantleCelllymphoma (lymphome à cellules du manteau)

Mcl-1 : Myeloid cell leukemia

MDM2 :Murine Double Minute 2

MED12 : Mediator complex subunit 12

mir RNA : micro RNA

mir-15a : micro RNA 15a

mir-16-1: Micro RNA 16-1

MnSOD2 : Manganese-Dependant Superoxyde Dismutase)

MYD88 : Myeloid Differentiation primary Response 88

NFAT : Nuclear Factor of Activated T-cells

NF-κB : Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NK : Natural Killer

NLC : Nurse-Like Cells

NLS : Nuclear Localisation Sequense (séquences de localisation nucléaire)

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P53AIP : P53 apoptosis induced protein 1

PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern

PECAM1 : (Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 (CD31)

PI3Kδ : Isoforme delta de la Phosphatidylinositol-3 Kinase

POT1: Protection Of Telomeres 1
PT3K : Phosphatidylinositol-3 Kinase
PWM : PokeWeedMitogen
RAD51: protéine nécessaire au maintien de l'intégrité du génome
RBPK: Recombination signal Binding Protein for immunoglobulin Kappa J region
ROS : Reactive Oxygen Species
SDF-1 : Stromal cell-Derived Factor-1
SF3B1: Splicing Factor 3B subunit 1
SLL : Small Lymphocytic Lymphoma
SLPC : Syndromes LymphoProlifératifs Chroniques
SLVL: Splenic Lymphoma Vileus Lymphocyte (lymphome splénique à lymphocytes vilieux)
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
SYK : Spleen Tyrosine Kinase
TAM : Tumor Associated Macrophage (macrophages associés aux tumeurs)
TK : La Thymidine Kinase
TNF: Tumor Necrosis Factor
TP53: Tumor Protein 53
TPA : 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate
UPD : uni parental disomy
USP7 : Ubiquitin Specific Protease 7
VCAM-1 : vascular-cell adhesion molecule 1
VDJ : Variable Diversity Joining
XPO1: EXPORTINE 1
ZAP-70 : Zeta-chain Associated Protein kinase 70
ZMYM3 : Zinc finger MYM 3

Glossaire

Asthme : maladie respiratoire de type allergique

Adénopathie : un grossissement ou une hypertrophie d'un ganglion lymphatique.

Carcinome : cancer à structure conjonctive dominante

Comorbidité : la présence d'un ou de plusieurs maladies associées à la maladie primaire.

Cytopénie : un déficit quantitatif d'un type de cellules du sang.

Fludarabine : produit de chimiothérapie utilisé dans le traitement de la leucémie lymphoïde chronique.

Hyperlymphocytose : nombre élevé de lymphocytes, supérieur à 5000 par mm³ chez le sujet adulte.

Hypertrophie amygdalienne : augmentation de volume des deux organes situés sur la paroi latérale du larynx.

Infarctus de myocarde: est une nécrose d'une partie du muscle cardiaque secondaire à un défaut d'apport sanguin.

Ira thérapie : irradiation interne par l'iode 131

Ostéosarcome : une tumeur primitive maligne de l'os.

Myélome multiple : est une affection de la moelle osseuse provoquée par une prolifération maligne d'un type de globules blancs : les plasmocytes.

Néoplasme : est une tumeur maligne de n'importe quel organe.

Néphropathie : maladie rénale

Pronostic: est la prédiction d'un médecin concernant le développement futur de l'état de son patient.

Splénomégalie: une augmentation de volume de la rate.

Survie globale : temps écoulé entre le début de sa maladie et le devenir du patient à un temps t.

Survie sans progression : durée après un traitement pendant laquelle la maladie ne progresse pas.

Thrombopénie : diminution du nombre de thrombocytes en dessous de 150 Giga /litre.

Sommaire

Introduction	1
I. Partie théorique	
I.1 Généralités	2
I-1.1 Les hémopathies malignes	2
I-2. Les leucémies	2
I-3. Les leucémies aiguës	3
I-4. Les leucémies chroniques	3
I-5. Les syndromes lymphoprolifératifs chroniques	3
II. La leucémie lymphoïde chronique	4
II-1. Historique	4
II-2. Définition	5
II-3. Epidémiologie	5
II-3-1. Incidence	5
II-3-2. Facteurs de risques	5
II-4. Physiopathologie	6
II-4-1. Origine de la cellule de la leucémie lymphoïde chronique	6
II-4-2. La résistance à l'apoptose	7
II-4-3. La prolifération	8
II-4-4. La voie de signalisation du BCR	8
II-5. Etude Clinique	9
II-5-1. Circonstances de découverte	9
II-5-2. Critères diagnostiques	9
II-5-3. Les facteurs pronostiques	11
Classification de Rai	11
Classification selon binet	11
II-5-4. Anomalies cytogénétiques récurrentes	11
Délétion 13q 14q34	13
La trisomie 12	14
Le gène MDM2	14
Le CDK4	15
Délétion 11q22.3	15
Délétion 17p 13	17
II-5-5. Anomalies moléculaires récurrentes	21
II-5-5.1 Le statut mutationnel des IGVH	21
II-5-5.2 Mutation du gène TP53	21
II-5-5.3 Mutation NOTCH 1	22

II-5-5.4 Mutation du gène BIRC3	23
II-5-5.5 Mutation de SF3B1	24
II. Partie pratique	
II. Matériel et méthodes	25
II.1. Matériels	25
II.1.1. Matériels biologiques :	25
II.1. 2. Matériels non biologiques	25
II.2. Méthodes	28
II.2.1. Prélèvement	28
II.2.2. Comptage	28
II.2.3. La mise en culture	28
II.2.4. Sortie de culture	29
II.2.5. Etalement cellulaire sur lames	30
II.2.6. Hybridation In Situ Fluorescente : FISH	31
II.2.7. Lecture au microscope à fluorescence	33
II.2.8. Etude statistique	33
III. Résultats	
III.1 Etude pratique	34
III.1.1. Résultat de l'étude épidémiologique	35
III.1.2. Critères diagnostiques	39
III.1.3. Résultats de l'analyse cytogénétique	41
III.1.4. Illustration par des cas cliniques	47
IV. Discussion	56
Conclusion générale	60
Références bibliographiques	61
Annexes	68

Introduction

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une pathologie du sujet âgé caractérisée par une grande variabilité évolutive y compris au sein des mêmes groupes pronostiques où certains patients présentent une maladie évolutive avec une survie de quelques mois (formes agressives), alors que d'autres ont une maladie plus indolente avec une survie très longue (**Montillo et al.,2005**)

Les classifications de Rai et de Binet ont longtemps été les seuls outils qui ont permis de stratifier le pronostic des LLC. Il est apparu à l'usage que ces classifications n'étaient pas suffisamment puissantes pour révéler toutes les situations pronostiques.

Parmi les facteurs pronostiques les plus puissants récemment étudiés, on relève au premier plan les anomalies cytogénétiques tels les délétions des chromosomes 13, 11 et 17 et la trisomie 12. Plusieurs anomalies cytogénétiques sont identifiées comme des facteurs de pronostic défavorable, en particulier la délétion 17p et la délétion 11 q, observées chez des patients porteurs de LLC à des stades avancés et très évolutives. (**Dohner et al.,2000**)

Ces techniques complémentaires ont un grand intérêt pour évaluer le pronostic des LLC en identifiant des sous-groupes de patients à risque, définissant ainsi au mieux la stratégie thérapeutique adaptée pour chaque patient. Dans ce cadre, nous avons réalisé un projet de fin d'étude sur les anomalies cytogénétiques des LLC. Notre travail a été réalisé au sein du plateau technique de cytogénétique hématologique de l'EHS CLCC, Hôpital Frantz Fanon Blida. Il avait pour principaux objectifs de:

- Etablir la répartition des anomalies cytogénétiques récurrentes dans la Leucémie lymphoïde chronique et leurs intérêts thérapeutiques.
- Comparer nos résultats à ceux de la littérature.

Chapitre I

Synthèse bibliographique

I. Généralités

I. 1. Hémopathies malignes

Les hémopathies malignes regroupent l'ensemble des cancers du sang et des organes lymphoïdes. Elles résultent d'une prolifération d'une lignée de cellules sanguines matures (entraînant des hémopathies chroniques à évolution lente) ou d'une lignée de cellules immatures (entraînant des hémopathies aiguës à évolution rapide) mais qui, dans tous les cas échappent à la régulation normale de l'organisme.

On peut distinguer deux grandes familles : les leucémies qui se développent initialement dans la moelle osseuse, et les lymphomes qui se développent et donnent une masse tumorale dans les organes lymphoïdes. La **figure 1** illustre le processus de différenciation et transformation monoclonale.

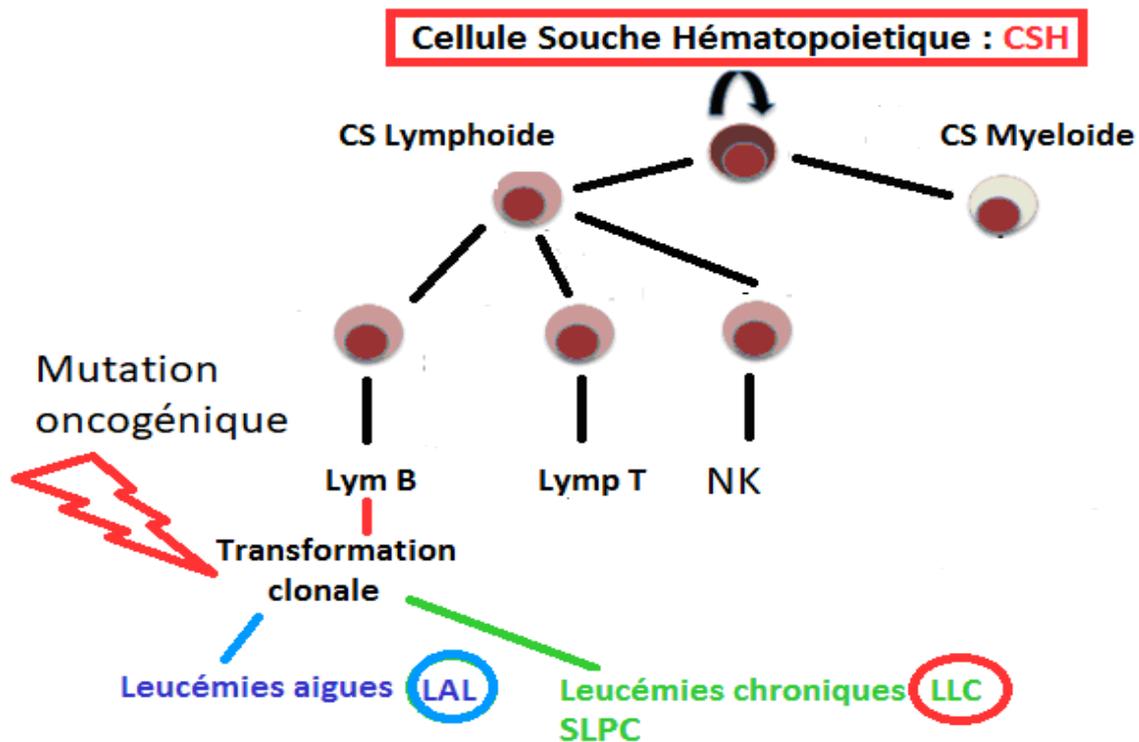


Figure 1 : Processus de différenciation et transformation monoclonale (original)

I. 2. Les leucémies

Les leucémies représentent des affections hématologiques malignes caractérisées par une prolifération monoclonale incontrôlée dans la moelle osseuse, de cellules à l'origine des globules blancs.

Les leucémies prennent le nom de (lymphoïde) ou (myéloïde) quand les cellules leucémiques trouvent leur origine au niveau des cellules souches lymphoïdes ou des cellules souches myéloïdes respectivement. Ainsi pour toutes ces leucémies, les symptômes, leurs évolutions, leurs traitements sont différents (**Arberetal.,2016**).

I. 2. 1. Leucémies aiguës

Dans cette catégorie, les cellules cancéreuses sont issues de précurseurs hématopoïétiques bloqués dans un processus de maturation soit à un stade immature à l'état de Blaste soit à un stade immature de précurseurs. Ces cellules s'accumulent dans la moelle, le sang, et les organes lymphoïdes secondaire et ils ne remplissent pas leurs fonctions habituelles, cette prolifération empêche la maturation des autres cellules sanguines normales (**Arberet al.,2016**). On distingue deux types de leucémies aiguës(LA), selon leur origine, les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) issues des précurseurs lymphoïdes (LT, LB, NK), et les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) issues des précurseurs myéloïdes (Granuleux, érythroblastes, mégacaryocytes)

I. 2. 2. Leucémies chroniques

Dans cette catégorie, les cellules cancéreuses ont un aspect mature, on retrouve deux types de leucémies chroniques : lymphoïdes et myéloïdes (**Troussard, 1999**)

I. 3. Les syndromes lymphoprolifératifs chroniques

Ils regroupent des entités allant de la leucémie lymphoïde chronique à des maladies plus agressives, chacune comportant des caractéristiques biologiques spécifiques. La classification FAB des syndromes lymphoprolifératifs permet de séparer les proliférations B et T (**Tableau I**).

Tableau I: Classification FAB des hémopathies B et T. (Troussard, 1999)

Hémopathies B	Hémopathie T
LLC	La leucémie lymphoïde chronique T (LLC-T)
LLC de type mixte	La leucémie pro lymphocytaire T (LPLT)
La leucémie pro lymphocytaire (LPL)	La leucémie/lymphome T de l'adulte (ATLL)
La leucémie à tricholeucocytes (HCL)	Le syndrome de Sézary
Les phases leucémiques des lymphomes à cellules du manteau (MCL) et du lymphome folliculaire (FL),	
Le lymphome lymphoplasmocytaire.	
La leucémie à plasmocytes	
Le lymphome splénique à lymphocytes villeux (SLVL).	

La classification de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) des néoplasmes lymphoïdes mise à jour en 2016 représente un consensus mondial sur le diagnostic de ces tumeurs et est basée sur la reconnaissance de maladies distinctes, en utilisant une approche multidisciplinaire (clinique, cytologique anatomopathologique, immunocytologique, cytogénétique et moléculaire). La classification mise à jour a affiné les définitions des maladies bien reconnues, identifié de nouvelles entités et variantes et incorporé des concepts émergents dans la compréhension des néoplasmes lymphoïdes. (Swerdlow *et al.*, 2016)

II. Leucémie lymphoïde chronique

II. 1. Historique

En 1840 Virchow a décrit deux formes de leucémies chroniques, correspondant probablement à la LLC et à la leucémie myéloïde chronique (LMC). Près d'un siècle plus tard, en 1928, Richter décrit l'apparition de lymphomes à grandes cellules dans la LLC. En 1967 :Dameshek a émis l'hypothèse que la LLC était une maladie cumulative des lymphocytes immunologiquement incompetents. Trois ans après, il a été démontré que les Lymphocytes de LLC expriment une immunoglobuline de surface, indiquant que ces cellules néoplasiques étaient des cellules lymphoïdes B. En 2010, le séquençage haut débit met en lumière l'hétérogénéité moléculaire de la LLC.

II. 2. Définition

La LLC est une hémopathie maligne, caractérisée par la prolifération et l'accumulation dans la moelle osseuse de lymphocytes B matures monoclonaux, immunologiquement incompétents. Cette monoclonalité est due à l'expression d'un seul type d'immunoglobuline de surface soit kappa soit Lambda ; avec passage des cellules au niveau du sang et des organes lymphoïdes. La LLC se caractérise par une lymphocytose isolée de plus de 5000/ μ l, persistant plus de 3 mois, chez un sujet adulte. (**Campo et al.,2011 ; Swerdlow et al., 2016**)

II. 3. Epidémiologie

II. 3. 1. Incidence

La LLC est la leucémie la plus fréquente chez les adultes dans les pays occidentaux, (25 à 30 % de toutes les leucémies). Elle est plus fréquente chez les hommes, avec un rapport hommes / femmes d'environ 1,3/1 à 1,7/1. Aux États-Unis, les taux d'incidence chez les hommes et les femmes sont d'environ 6,75 et 3,65 cas pour 100 000 habitants par an, respectivement (**Yamamoto et Goodman, 2008**). En Europe, ces taux d'incidence sont respectivement de 5,87 et 4,01 cas pour 100 000 habitants par an (**Sant et al., 2010**)

En Algérie, sur cette période de 5 ans (2009-2013), l'incidence moyenne annuelle est de 0,66 / 10⁵ hbts. Elle est faible, comparée à celle des pays occidentaux. L'âge moyen au diagnostic est de 67,5 ans (33-98) avec deux pics de fréquence : 60-69 ans (28%) et 70-79 ans (32,7%). Sexe ratio : 2,13. L'âge jeune de la population algérienne pourrait expliquer cette incidence ainsi que la méconnaissance du diagnostic dans les stades A asymptomatiques. (**Dali et al.,2015**)

II. 3. 2. Facteurs de risques

- Facteurs héréditaires

L'existence d'une susceptibilité génétique à développer une LLC : les apparentés au premier degré de patients ayant une LLC ont un risque relatif de développer eux-mêmes une LLC évalué à 8,5 ; de plus, les jumeaux monozygotes de patients porteurs d'une LLC se voient plus souvent diagnostiquer eux-mêmes des LLC que leurs jumeaux dizygotes. Des polymorphismes nucléotidiques (SNP) sont impliqués dans ces formes familiales, et concerneraient notamment les gènes IRF4 et BCL2. (**Rebora et al.,2012**) (**Law Philip et Houston, 2019**)

- **Facteurs environnementaux**

Un lien statistique a été mis en évidence entre le développement d'une LLC et le fait de vivre et travailler dans une exploitation agricole, et plusieurs données suggèrent que les insecticides et herbicides (agent orange) augmenteraient le risque de LLC. (Rushton *et al.*, 2014).

II. 4. Physiopathologie

II. 4. 1. Origine de la cellule de la leucémie lymphoïde chronique 1

En 2010 et 2011, Kikushige et ses collègues ont démontré que la cellule souche hématopoïétique est impliquée dans le développement de la LLC. En effet, ils ont prouvé que cette cellule produit un grand nombre de cellules pro-B polyclonales en réponse à une activation de la voie de signalisation du BCR, ces cellules expriment fréquemment le CD5 et le CD23, caractéristiques du clone leucémique de la LLC. Ces lymphocytes B polyclonaux, sont ensuite sélectionnés et amplifiés par activation de la signalisation de leur BCR conduisant à l'apparition de la MBL. Cette dernière évoluerait enfin vers une LLC suite à des événements oncogéniques non définis. (Kikushige *et al.*, 2010) (Figure 2).

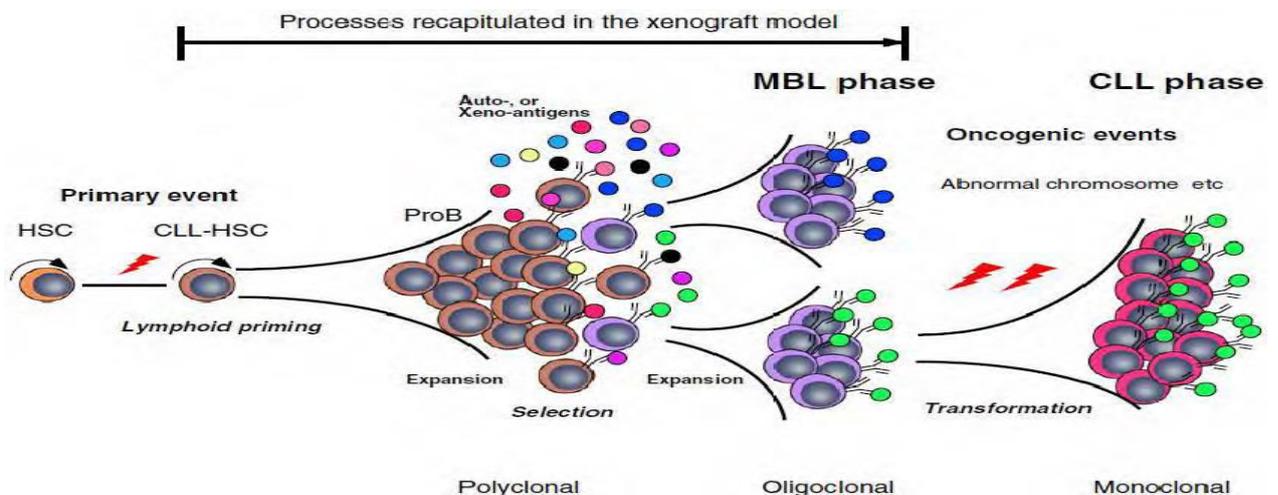


Figure 2 : Origine de la cellule de la LLC (Kikushige *et al.*, 2010)

Au sein du lymphocyte B normal, la diversité du répertoire immunitaire du BCR est rendue possible notamment par la recombinaison des chaînes VDJ (Variable Diversity Joining) Celle-ci a lieu au moment du stade pré pro-B dans la différenciation B dans la moelle osseuse. Ainsi, à la sortie de la moelle osseuse, chaque lymphocyte B naïf exprime un BCR qui lui est propre et la probabilité qu'il existe au sein de l'organisme deux BCR identiques appartenant à deux lymphocytes B différents est quasi nulle (Chu *et al.*, 2008)

II. 4. 2. Résistance à l'apoptose

Une surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (B-cell CLL/lymphoma 2) a été mise en évidence dans les cellules leucémiques. L'hypothèse retenue actuellement est que miR-15-a et miR-16-1, qui régulent négativement Bcl-2 au niveau post traductionnel, sont sous-exprimés dans la LLC (**Aguilar-Santelises et al., 1996 ; Cimmino et al., 2005**)

▪ **Interaction entre les macrophages associés aux tumeurs et la cellule leucémique**

Dans le microenvironnement tumoral, il existe des cellules immuno-régulatrices qui s'accumulent massivement, elles s'appellent les macrophages associés aux tumeurs (TAM). Ces cellules dérivent de précurseurs monocytaires circulants. Le recrutement des monocytes au sein des tumeurs est régulé principalement par des cytokines, des chémokines et des facteurs de croissance produits par les cellules tumorales et les cellules du microenvironnement. (**Kodelja et al ., 1998**).

Il existe des TAM de phénotype M1 qui sont activés par la présence de PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern) et la présence des cytokines inflammatoires IL- 12 et IFN- γ , et des TAM de phénotype M2 qui sont stimulés par d'autres Interleukines IL-4, 13, 21, 33 qui possèdent un effet anti-inflammatoire.

Dans la plupart des tumeurs, les macrophages sont considérés comme de phénotype M2. Les TAM secrètent des cytokines, protéases, facteurs de croissances qui encouragent l'angiogenèse tumorale et les métastases grâce aux nutriments et à l'oxygène que les nouveaux vaisseaux sanguins apportent à la tumeur. (**Ning-Bo et al ., 2012**). Les nurses like cells (NLC) sont retrouvées dans les ganglions lymphatiques des patients atteints de LLC, favorisant ainsi la survie des cellules leucémiques in vitro. Ces NLC partagent avec les TAM de nombreuses caractéristiques telles que la capacité immunodépressive et un profil transcriptomique proche. (**Burger et al ., 2000**)

▪ **Interaction entre les cellules LLC et les cellules stromales**

Les cellules LLC ont un métabolisme plus actif que les cellules saines, ce qui entraîne une production plus importante de radicaux libres et une dépendance vis-à-vis des antioxydants cellulaires comme le glutathion (GSH) pour maintenir leur balance redox intracellulaire.

Les cellules stromales protègent les cellules LLC de la mort cellulaire en augmentant la concentration du GSH. La cystéine est très instable dans le milieu extracellulaire et s'oxyde spontanément et rapidement en cystine (deux molécules de cystéine liées par une liaison

disulfure). La cystine, plus abondante et plus stable que la cystéine, est transportée du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire par l'anti porteur cystine/glutamate (Xc-) (**Figure3**) pour y être réduite en cystéine. (**Zhang et al ., 2013**)

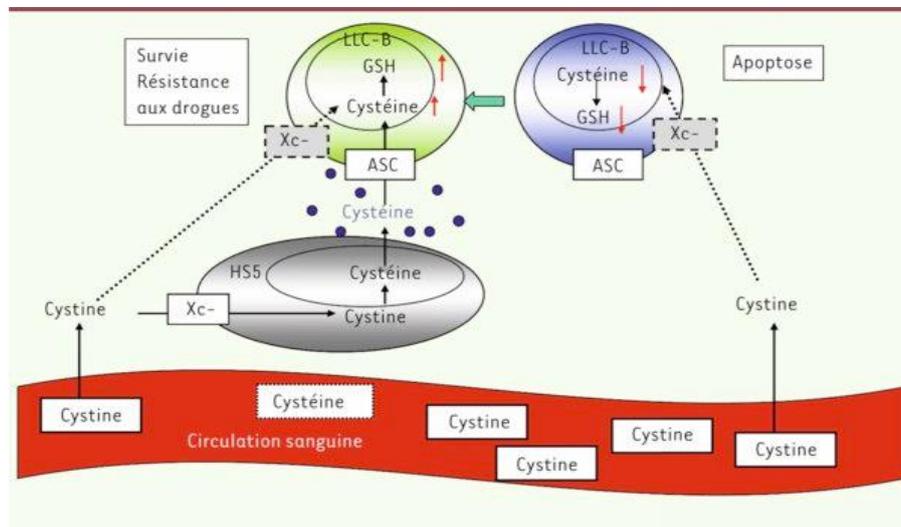


Figure 3 : Interaction entre le stroma et les cellules LLC-B.(Zhang et al ., 2013)

II. 4. 3. Prolifération

Les cellules leucémiques, prélevées dans le sang périphérique, sont des lymphocytes quiescents, bloquées en phase G0/G1 du cycle cellulaire. Plusieurs études révèlent que les cellules leucémiques ont des télomères plus courts que les lymphocytes B normaux démontrant ainsi une augmentation de leur prolifération. Des cellules leucémiques en prolifération peuvent être retrouvées au sein des ganglions lymphatiques ou plus rarement dans la moelle osseuse au sein des centres de prolifération.(**Rampazzo et al ., 2012**)

II. 4. 4. Voie de signalisation du BCR

Le BCR et son signalosome contrôlent très finement la différenciation et la maturation des lymphocytes B. Dans la LLC, la voie de signalisation du BCR est essentielle à la survie, à la prolifération, et aux interactions avec le microenvironnement. (**Hendriks et al.,2014**) (**Figure 4**)

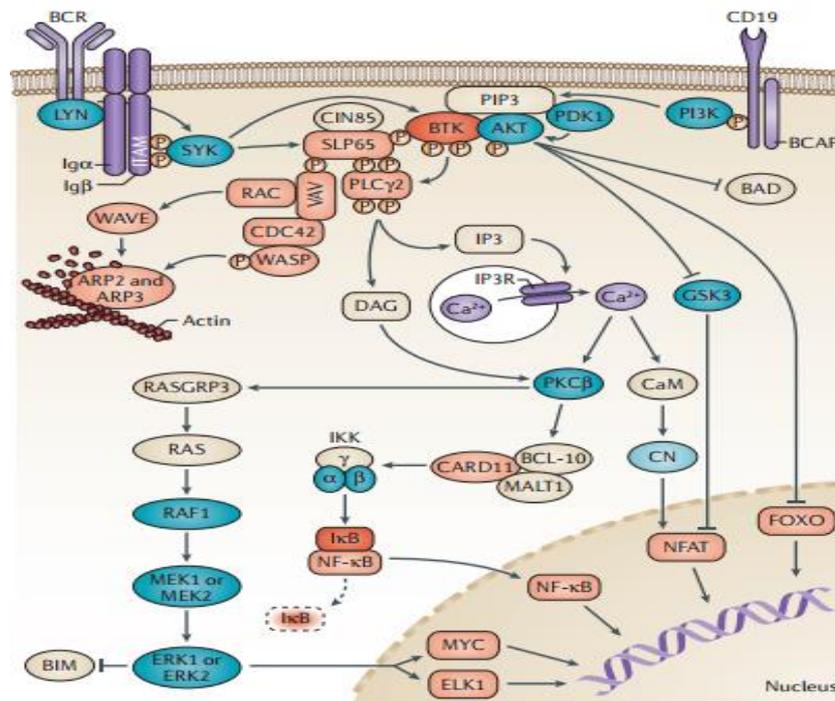


Figure 4 : Voies de signalisation du BCR dans la LLC (Hendriks et al., 2014)

II. 5. Etude Clinique

II. 5. 1. Circonstances de découverte

Les circonstances de découverte d'une LLC sont nombreuses :

- Lors d'un hémogramme de routine
- Des adénopathies superficielles, bilatérales et symétriques (cas le plus fréquent en Algérie)
- Une splénomégalie ou plus rarement une hypertrophie amygdalienne (<5% des cas)
- Cytopénies (anémie, thrombopénie) dues à l'infiltration médullaire
- Complications infectieuses ou auto-immunes.

II. 5. 2. Critères diagnostiques

- **Hémogramme** : la réalisation de deux hémogrammes à trois mois d'intervalle selon les recommandations de la HAS, permet de différencier une hyperlymphocytose de plus de 5000/ μ l réactionnelle d'une hyper lymphocytose de la LLC ; néanmoins une hyper lymphocytose à 15000/ μ l une seule fois doit évoquer la LLC. (Swerdlow et al., 2016)
- **Frottis sanguin** : visualise les lymphocytes d'aspect cytologique matures avec un noyau arrondi à chromatine dense et cytoplasme réduit, majoritaire sur l'équilibre leucocytaire, et des débris nucléaires dites « Ombres de Gümprécht » très évocatrice de la LLC. (Swerdlow et al., 2016) (Figure 5)

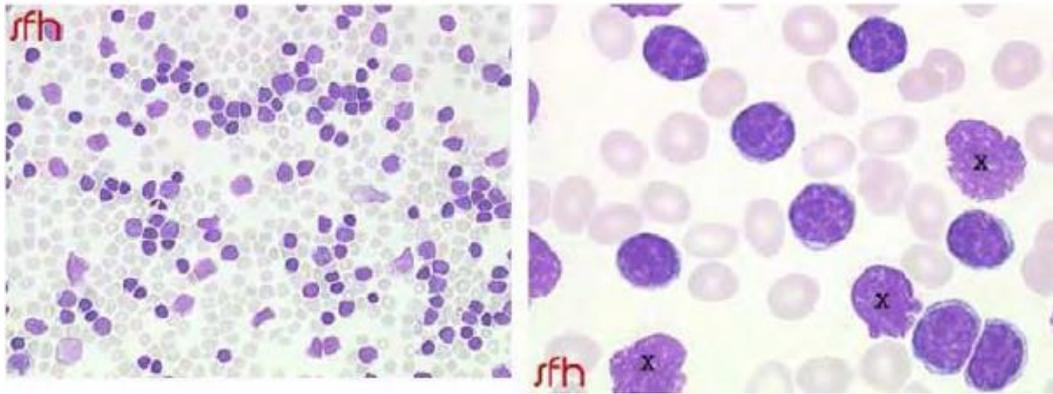


Figure 5 : Étalement sanguin typique d'une LLC (gauche) : Nombreux petits lymphocytes avec noyau arrondi et cytoplasme très réduit avec des ombres de Gümprrecht (croix) (droite) (<http://campus.cerimes.fr>)

- **Immunophénotypage lymphocytaire sur sang périphérique :**

L'immunophénotypage lymphocytaire sur sang périphérique met en évidence les antigènes membranaires pour préciser la nature lymphocytaire monoclonale et le niveau de maturation de la cellule. Le score de Matutes (SM) qui comportent 5 points est utilisé pour confirmer le diagnostic de LLC parmi les SLPC. Dans le SM, un point est attribué en cas de positivité des molécules membranaires (CD5), (CD23), d'expression faible des IgS, de (CD22) /ou (CD79b) et de négativité de FMC7 (**Matutes et al .,1994**) (**Tableau II**).

La LLC se définit par un score de Matutes égal ou supérieur à 4, un score de 3 peut correspondre à une « LLC atypique ». Un score inférieur à 3 permet de caractériser les autres syndromes lymphoprolifératifs chroniques B. Un score inférieur à 3 exclut le diagnostic de LLC.

Tableau II. Score de Matutes pour le diagnostic de LLC (Matutes et Polliack ,2000).

Marqueurs	1 point	0 point
CD5	+	-
CD23	+	-
FMC7	-	+
Ig	Intensité faible	Normale à forte
CD22 / CD79b	Intensité faible	Normale à forte

II. 5. 3. Facteurs pronostiques

Les facteurs pronostiques généraux tels que l'âge avancé, un mauvais état général, l'existence de signes généraux, les comorbidités associées, le sexe masculin, ont un impact négatif sur la survie des patients.

Dans les facteurs pronostiques cliniques nous retrouvons :

➤ Classification de Rai

Développée aux Etats-Unis : une lymphocytose en augmentation (stade 0, survie médiane de 150 mois), suivie par l'apparition d'adénopathies et d'une hépato-splénomégalie en progression (stades 1 et 2, survie : 101 et 71 mois), une anémie et une thrombopénie peuvent survenir (stades 3 et 4, survie : 19 mois). **(Rai et al ., 1975)**

➤ Classification selon Binet

Développée en France : implique 5 sites lymphoïdes, accessibles à la palpation : les régions cervicale, axillaire, inguinale, splénique et hépatique (stade Binet A : < 3 sites atteints, stade B \geq 3 sites) si anémie ou thrombopénie (stade Binet C quel que soit le nombre de sites atteints). La survie médiane des patients de stade A est similaire à celle de la population générale, tandis que pour le stade B elle est de 84 mois, et de 24 mois pour le stade C. **(Binet et al ., 1981)**

Le temps de doublement des lymphocytes (LDT) es aussi considéré comme un facteur de pronostique. Il s'agit du temps mis pour que le nombre absolu de lymphocytes soit multiplié par 2. Dans un stade A, un LDT < 12 mois est associé à une diminution de la survie globale. **(Montserrat et al ., 1986)**

Dans ce qui suit, sont détaillés les différents facteurs pronostiques génétiques

II. 5. 4. Anomalies cytogénétiques récurrentes

Dans les années 80, les anomalies cytogénétiques n'étaient retrouvées que dans 40% à 60% des cas par caryotype, ce taux limité est expliqué par l'index mitotique bas des cellules LLC in vitro et la mauvaise réponse aux stimulations mitogènes utilisées à l'époque qui sont le TPA (12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate) et le LPS (lipopolysaccharide) et le PWM (pokeweedmitogen). **(Gahrton et al ., 1987)**

Vu le taux faible des anomalies cytogénétiques retrouvées par caryotype, l'introduction de la FISH dans les années 90 a révolutionné le model pronostic initialement proposé par le caryotype. Les anomalies cytogénétiques par FISH sont retrouvées dans plus de 80% des cas

de LLC ; Cela a permis de présenter un modèle de hiérarchisation pronostique selon les anomalies du 13q14, +12, del11q, del17p13 ; la meilleure survie est attribuée à la del13q14 isolée (133 mois) et la plus courte survie à la del17p13 (32 mois). **(Dohner et al ., 2000)**

La FISH a amélioré considérablement la fréquence des anomalies cytogénétiques retrouvées dans la LLC mais elle reste un examen ciblé ; des efforts ont été faits pour améliorer les résultats du caryotype conventionnel vu son importance dans la visualisation du tout le génome.

En 2006, Frank Dicker a obtenu 80% d'anomalies cytogénétiques par caryotype en utilisant une immuno-stimulation des cultures cellulaires par CpG-oligonucléotide DSP 30 plus interleukine 2, en plus le caryotype a montré des sous-groupes pronostiques en rapport avec des anomalies additionnelles comme des translocations équilibrées et non équilibrées non récurrentes pour la plupart et des caryotypes complexes de très hauts risques. **(Dicker et al ., 2006)**

Le caryotype complexe (CK) est défini par la présence de 3 anomalies chromosomiques ou plus, définissant trois catégories de CK : bas risque (Low CK) = 3 anomalies, risque intermédiaire (Intermediate CK) = 4 anomalies et haut risque (High CK) = ≥ 5 anomalies. Le CK représente 15% au diagnostic, sa fréquence s'élève à plus de 40% à la rechute de la maladie. Il est souvent associé à d'autres facteurs de mauvais pronostic comme les anomalies TP53, état IgVH non muté, stades avancés, del 11q et trisomie 12. Les anomalies de la TP53 prédisent 50% des anomalies complexes. En absence d'anomalies TP53, le caractère complexe inclut 5 anomalies chromosomiques (High CK). **(Panagiotis et al ., 2019)** Le CK est de mauvais pronostic même en absence d'anomalies de haut risque (ATM, TP53). **(Puiggros et al ., 2017)**. L'analyse chromosomique sur puce à ADN (ACPA) est une technique de cytogénétique qui permet de détecter des variations quantitatives du génome, correspondant à des pertes ou gain de matériel chromosomique (délétions, duplications, insertions ou remaniements complexes) en comparaison avec un génome de référence diploïde. L'ACPA peut détecter des déséquilibres génomiques de très petite taille (microremaniements) non détectés sur le caryotype. Sous le terme d'ACPA sont regroupés deux types de techniques qui sont l'hybridation génomique comparative sur réseau d'ADN ou CGH array (pour Array comparative genomichybridization) d'une part, et la « puce à SNP » ou SNP array (SNP pour Single Nucleotide Polymorphism) d'autre part. Ces techniques détectent les CNAs (copy number abnormalities) et les UPD (uni parental disomy) dans les régions génomiques à intérêt pronostique dans la LLC, avec une résolution meilleure que le caryotype et la FISH. **(De Leeuw et al ., 2012)** **(Mian et al ., 2013)**. L'étude de Wang et al. par séquençage du génome à haut débit a identifié 9 gènes dans lesquels les mutations étaient plus fréquentes : 4 étaient déjà rapportés dans la LLC (TP53, ATM,

MYD88 et NOTCH1) et 5 étaient nouveaux (SF3B1, ZMYM3, MAPK1, FBXW7 et DDX3X) [14]. D'autres mutations récurrentes sont décrites, comme XPO1, NFKBIE, FAT1, EGR2, POT1, BIRC3, MED12. Certaines études suggèrent que ces anomalies sont associées de façon significative aux anomalies cytogénétiques déjà connues, comme les mutations de NOTCH1 et FBXW7 à la trisomie 12, les mutations de BIRC3 à la perte d'ATM (**Puente et al ., 2011**).

➤ **Délétion 13q14q34**

La délétion (del) 13q14 est retrouvée dans 55% à 63% des cas de LLC selon les séries, c'est l'anomalie la plus fréquente. (**Dohner et al ., 2000 ; Stockero et al ., 2006**). Elle peut être homozygote (bi allélique), hétérozygote (mono allélique) ou en mosaïque (présence des deux clones) (**Reddy, 2006**). La délétion 13q 14 peut être cryptique (non visible au caryotype), retrouvé dans 10% à 20% des cas par caryotype standard ; et sa détection se fait par les techniques de cytogénétique moléculaire (FISH) dans 55% à 64% (**Stockero et al ., 2006**).

La partie délétée est d'environ 550 Kb, une région de 30 Kb de celle-ci contient le gène *DLEU2* supposé comme un gène suppresseur de tumeur et deux micro ARNs (MIR15- *a* et MIR16-1) situés entre l'exon 2 et l'exon 5 de ce gène.

Les miRs sont une grande famille de gènes non codant hautement conservés qui sont impliqués dans la régulation des gènes spécifiques aux tissus. Ces deux micro RNAs sont dérégulés dans 70% des cas de la LLC, sont ubiquitaires et non codant et ils ont une fonction régulatrice de l'expression des gènes en se fixant sur la partie UTR s'exprimant le plus souvent par une régulation négative du gène *BCL2* (**Nguyen-Khac et al ., 2016**)

Le gène *BCL2* (B-cell leukemia/lymphoma 2-like proteins) localisé sur le chromosome 18, identifiée comme l'un des oncogènes les plus importants impliqués dans le cancer. C'est un régulateur clé de l'apoptose, en faisant partie de la sous famille pro-survie par la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui sont des inducteurs clé de l'invasion cellulaire et de la métastase cancéreuse. (**Nguyen-Khac et al ., 2016**).

Les MIR favorisent l'apoptose et le contrôle du cycle cellulaire par une régulation post-transcriptionnelle des *BCL2* par leur liaison imparfaitement complémentaire à l'ARNm principalement la partie UTR3', la complémentarité entre les 9 premiers nucléotides, des extrémités 5' des miR15/16 et les bases 3287-3279 à l'extrémité 3' de l'ADN complémentaire de *BCL2*, donc les protéines *bcl2* sont régulées à la baisse ou supprimées dans les cellules tumorales alors sont considérées comme des points chauds dans la transformation du cancer.

L'expression des MIR inhibe la prolifération, supprime la tumorigénicité, et contrôle l'angiogenèse. Il en résulte que les MIR fonctionnent comme gènes suppresseur de tumeurs et leurs délétions est très importante pour la pathogénicité de la LLC. **(Pekarsky et al ., 2018)**

Lorsque la délétion 13q est plus large (type2) elle inclue en plus le gène RB1 (Retinoblastoma 1): gène suppresseur de tumeur code une phosphoprotéine nucléaire impliqué le contrôle du cycle cellulaire et la régulation de la transcription. Dans ce cas, la valeur pronostique de la del (13q) est différente, la TFS étant significativement moins importante en cas de délétion concomitante de RB1. **(Corcoran et al ., 1998)**

➤ **Trisomie 12**

La trisomie 12 est observée dans 11% à 25% des cas de LLC. **(Dohner et al ., 2000)**. La trisomie 12 est la deuxième aberration chromosomique la plus fréquente dans la LLC ; apparait souvent comme l'altération cytogénétique unique dans 40% à 60% des cas **(Puiggros et al ., 2014)**. Cette anomalie est considérée comme un marqueur de risque intermédiaire dans le modèle pronostique hiérarchique proposé par Dohner et al. **(Dohner et al ., 2000)**.

Elle est associée à d'autres anomalies chromosomiques dans plus de la moitié des cas comme la tri 18 et 19, la del 14q, les translocations t(14 ; 18), t(14 ; 19), t(8 ;14). La trisomie 12 s'associe à une cytologie atypique **(Matutes et al ., 1996)**. La trisomie 12 est considérée par certaines équipes comme une anomalie clonale précoce, la LLC pouvant évoluer secondairement avec l'apparition d'aberrations chromosomiques secondaires ou mutations touchant en particulier les gènes NOTCH 1, TP53 (un pronostic défavorable) avec une fréquence respective de 17% et 8%. **(Roos-Weli et al ., 2013 ; Nguyen Khac et al ., 2016)**

Le chromosome 12 contient le gène MDM2 dans la région 12q13-15. La trisomie 12 signifie l'amplification et la surexpression du gène MDM2 qui code la protéine anti apoptotique responsable de la dégradation de la protéine P53.

➤ **Gène MDM2 :**

Le gène MDM2 a été initialement décrit dans une lignée cellulaire de souris tumorigène en raison de son amplification. Ce gène est responsable de la transformation spontanée d'une lignée cellulaire immortalisée. **(Dembla et al ., 2018)**. Il fut ensuite cloné et cartographié sur le chromosome 12q13-15. Ces travaux ont permis de mettre en évidence que le gène MDM2 comprenait deux promoteurs nommés P1 et P2.

Le promoteur P1 permet de moduler la transcription de MDM2 indépendamment de la p53, alors que le fonctionnement du promoteur P2 est dépendant de la p53. **(Riscal, 2016)**.

MDM2 est le principal régulateur négatif de la p53 et participe activement à sa dégradation. En effet MDM2 est capable d'inhiber l'activité de p53 via deux voies principales : la première par interaction directe avec celui-ci, ayant pour but de masquer son domaine de trans-activation et donc d'empêcher le recrutement de la machinerie transcriptionnelle de base, la seconde via la régulation de la stabilité et la localisation de la p53. MDM2 fonctionne comme une E3 ligase pour initier la poly-ubiquitination par une mono-ubiquitination au niveau de l'extrémité c-terminal de la p53 sur les résidus lysines (k370, k372, k373, k381, k 382et k386). Cette mono-ubiquitination entraîne l'export nucléaire de la p53, puisqu'une chaîne d'au moins 4 molécules d'ubiquitine est nécessaire pour une dégradation efficace par le protéasome. D'autres protéines sont nécessaires pour aider à la poly-ubiquitination de la p53 comme les protéines CBP et p300 décrites comme des acétyl transférases ; elles ont été proposées pour jouer le rôle d'E4 ligase pour favoriser la poly ubiquitination de la p53. **(Marchenko et al ., 2007)**

C'est dans le cytoplasme que la p53 est poly-ubiquitinylé, représentant le signal nécessaire pour être dégradée par le protéasome en absence du stress. Cette ubiquitinylation de la p53 est une réaction réversible, donc il existe des enzymes de dé-ubiquitinylation dont HAUSP. Cette relation entre MDM2 et p53 forme une boucle de rétrocontrôle négative. **(Riscal, 2016)**

➤ **CDK4**

Le CDK4 (Cycline-dépendante kinase 4) est un gène situé sur le 12q14.1 ; constitue une kinase qui régule des gènes comme le E2F1 (, ce dernier est un facteur de transcription associé à la prolifération. Une régulation à la hausse de ce gène dépendante de la dose du gène CDK4 pourrait contribuer à la surexpression de E2F1 chez les patients avec trisomie 12, ce qui suggère une activité proliférative accrue en tant que mécanisme pathologique potentiel de cette anomalie dans la LLC. **(Puiggros et al ., 2014)**

➤ **Délétions en 11q22.3**

La région critique en 11q22.3 contient le gène ATM (ataxia-telangiectasamutated), codant pour une protéine qui joue un rôle important dans les réparations des cassures double-brins de l'ADN et dans la régulation de l'activité de P53 ; des dysfonctionnements de celle -ci pouvant être observés lors des mutations d'ATM **(Nguyen Khac et al ., 2016)**

La protéine ATM est une sérine / thréonine kinase nucléaire de 350 kDa dont les activités sont induites par des ruptures chromosomiques à double brin qui surviennent de manière endogène ou après exposition à des agents endommageant l'ADN (les rayonnements ionisants et les

médicaments), qui sont potentiellement nocives pour les cellules ; son implication se traduit par une augmentation rapide de l'activité kinase.

Bakkenist *et al.* Ont proposé que, dans les cellules non perturbées, les protéines ATM associent la formation d'homodimères ou d'homomultimères d'ordre supérieur dépourvus d'activité kinase. Après endommagement de l'ADN, une molécule ATM phosphoryle la sérine 1981, permettant la dissociation de cette dernière et la phosphorylation de la cible cellulaire. Il a été observé que les mutations hétérozygotes faux-sens augmentent considérablement le risque de cancer. Ce phénomène peut s'expliquer par l'effet dominant négatif (**Guarini et al ., 2012**)

En réponse à des agents génotoxiques, le taux de la P53 augmente, induisant à la fois l'arrêt de cycle cellulaire, et la diminution de la synthèse d'ADN. Les cassures double brin d'ADN sont reconnues par des protéines multiples dont l'ATM, après cette reconnaissance, l'ATM agit selon différentes voies moléculaires. L'ATM phosphoryle directement la p53 sur la ser15 permettant la dissociation de cette dernière de son inhibiteur MDM2 ce qui conduit à l'activation de la transcription des gènes cibles (**Bay et al .,1999**) (**Figure 6**)

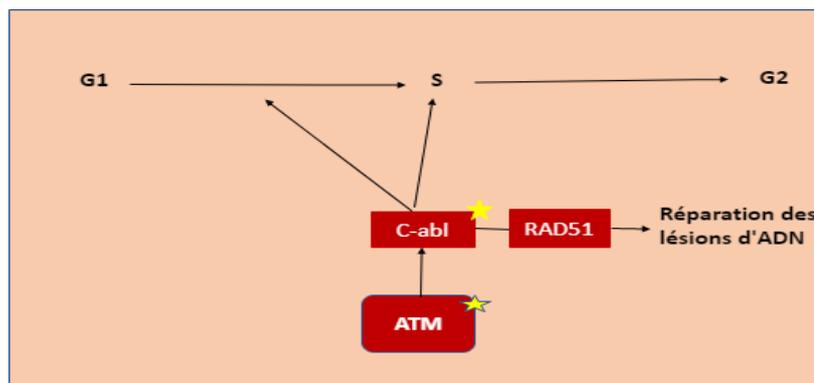


Figure6 : le rôle de la protéine ATM dans le cycle cellulaire. (Original)

La protéine ATM interagit avec c-abl et elle le phosphoryle pour l'activer ; le c-abl activé contribue au contrôle des phases G1/S et S du cycle cellulaire et à la réparation des lésions de l'ADN. (**Bay, 1999**)

Les anomalies ATM Représentent le troisième déséquilibre cytogénétique le plus courant et un paramètre biologique associé à un pronostic défavorable. la délétion du bras long du chromosome 11, de taille assez hétérogène, est retrouvée chez 6 à 20% des patients selon les études. la délétion 11q semble être le plus souvent sous clonale, et elle est associée cliniquement à une lymphadénopathie importante. (**Nguyen Khac et al ., 2016**).

➤ **Délétion 17 p13 (P53)**

Elle entraîne la perte du gène TP53 (suppresseur de tumeur) codant la protéine p53 humaine. Ce gène est localisé sur le bras court du chromosome 17, sur la bande chromosomique 17p13.1. Il est composé de 11 exons sur une longueur de 20 kilobases (kb). (Walid et al., 2006).

Cette délétion peut concerner l'ensemble de bras court du chromosome 17 ou être cryptique, avec une région minimale de délétion correspondant au locus 17p13.1, quel que soit le caryotype présent, la FISH du locus TP53 doit être réalisée. La délétion (17p) est fréquemment associée à un caryotype complexe. Dans plus de 80 % des cas la délétion (17p) est associée une mutation du gène TP53. Seulement 4 à 5 % des LLC sans délétion (17p) présentent une mutation monoallélique de TP53. (Chauzeix, 2018). La fréquence de cette anomalie est inférieure à 10 % au moment du diagnostic. (Nguyen Khac et al., 2016)

II. 5. 5.P53

Découvert en 1979 par Lane et Crawford, le gène P53 est le gardien du génome. Le gène P53 est localisé au locus 17p13.1, une région sujette à des pertes alléliques et code pour la protéine P53 ou TP53 (Tumor Protein of 53 kilodaltons), une phosphoprotéine nucléaire de 393 acides aminés, qui est un facteur de transcription aux propriétés anti-oncogènes (Soussi, 2000).

La protéine p53 est un polypeptide d'une longueur d'environ 400 résidus AA (393 AA pour la p53 humaine). La p53 forme des tétramères en solution (Soussi, 2000) (Figure 7).

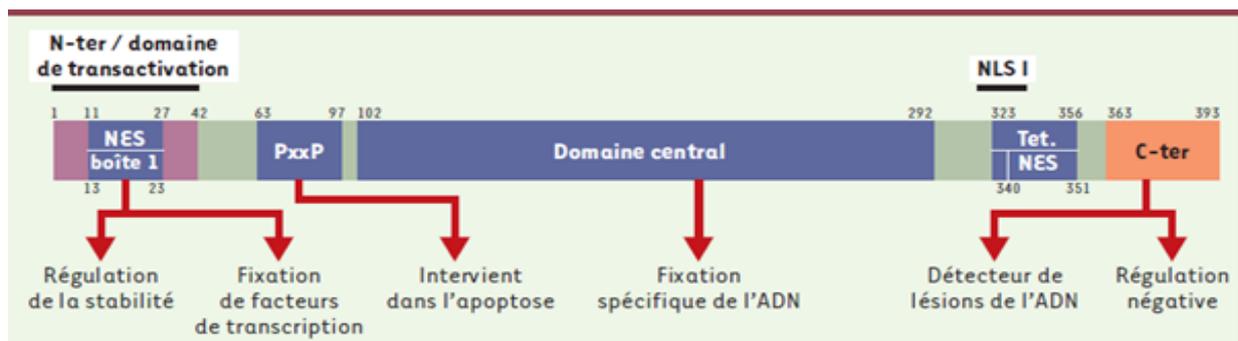


Figure7 : Domaine Structuraux et fonctionnels de la P53. (Leblanc et May, 2002)

L'activation de p53 faisant suite aux dommages causés à l'ADN après radiation (I) γ ou UV a été très étudiée. Il a été montré que p53, activée après I γ , provoque l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose entraînant l'élimination des cellules génétiquement altérées. (Leblanc et May, 2002)

La p53 transactive le gène codant pour l'inhibiteur des CDK qui est le P21, en se fixant sur les complexes cycline-CDK. Ces derniers ne peuvent pas phosphoryler la protéine RB, donc cette protéine reste complexée aux facteurs de transcription de la famille E2F qui ne peuvent pas activer la phase S(**Figure8**)

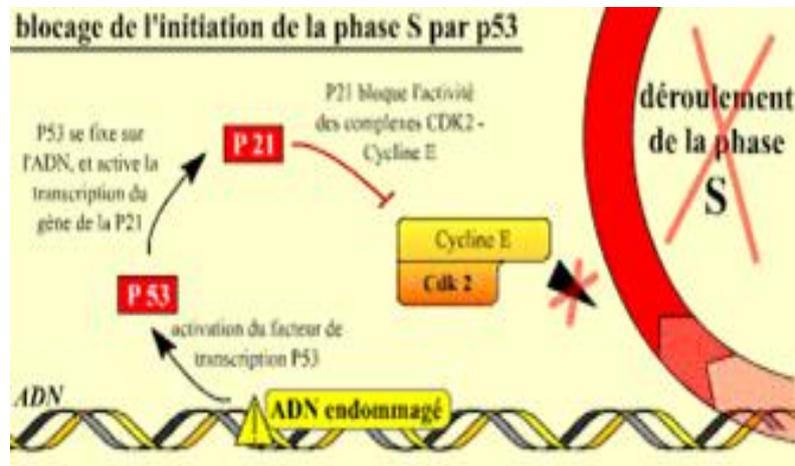


Figure 8 : Blocage de l'initiation de la phase S par p53 et p21.(May , 2004)

Le rôle de la protéine p53 n'est pas aussi clair dans l'apoptose que dans l'arrêt du cycle cellulaire. Cela est dû à l'hétérogénéité de cette fonction apoptotique (**Figure 9**).

Les gènes impliqués dans l'apoptose sont transactivés par p53 incluent Bax (dont la protéine est antagoniste de BCL-2), NOXA, P53AIP (apoptosis induced protein 1). Il existe d'autres médiateurs de l'apoptose comme Fas/Apo de la famille des récepteurs de TNF. PIG3 impliqué dans la régulation de la production espèces réactives d'oxygènes.

P53 réprime l'expression des gènes en interagissant avec d'autres composants de la machinerie transcriptionnelle comme la TBP (TATA box binding protein), ou d'autres facteurs régulateurs positifs ou négatifs de transcription, parmi les gènes réprimés par p53 se trouvent les gènes BCL-2, les c- fos (proto-oncogène), MnSOD2(manganese-dependant superoxyde dismutase), IL-6 (inhibe l'apoptose).

P53 provoque aussi des mécanismes indépendants de la transcription tels que les interactions protéine-protéine. (**Leblanc et May, 2002**)

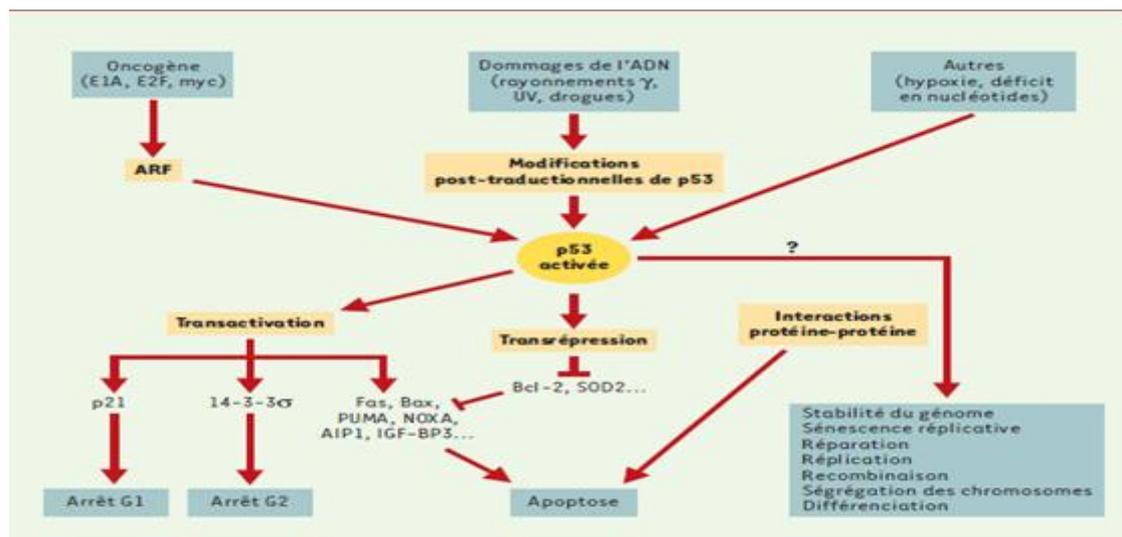


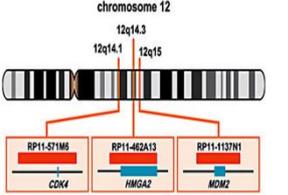
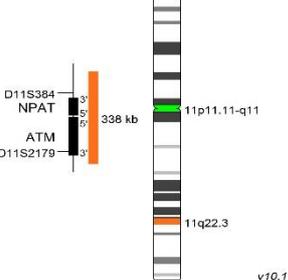
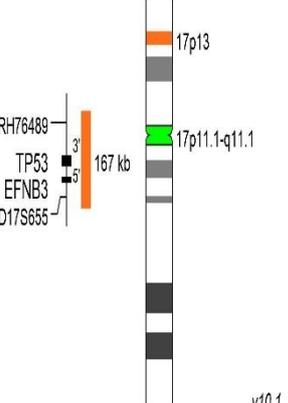
Figure 9 : Modèle de l'activation de p53 par dommages de l'ADN et par une expression inappropriée d'oncogènes (Leblanc et May, 2002)

La p53 participe également au maintien de la stabilité du génome dans la réparation de l'ADN, la recombinaison et la ségrégation chromosomique. (Leblanc et May, 2002)

Le **tableau III** donne un récapitulatif des conséquences des anomalies cytogénétiques récurrentes dans la LLC.

Tableau III : Récapitulatif des conséquences des anomalies cytogénétiques récurrentes dans la LLC. (Original)

Anomalie cytogénétique	Locus chromosomique	Conséquences de l'anomalie.
Del 13q14		<ul style="list-style-type: none"> Absence de la régulation négative de BCL-2 (un antiapoptotique) au niveau post-transcriptionnel, ce dernier reste toujours existant. (la survie de la cellule) Si cette délétion est plus large, elle pourra inclure le gène RB1 suppresseur de tumeur impliqué dans le Contrôle du cycle cellulaire.

<p>Trisomie 12</p>		<ul style="list-style-type: none"> • La surexpression de gène MDM2, qui est le principal régulateur négative de P53. (absence de l'activité de P53). • La surexpression de gène de CDK4, la protéine CDK4 a une activité kinase, qui régule les gènes de facteurs de transcription E2F1, qui sont liés à la prolifération. (activité proliférative accrue).
<p>Del 11q22.3</p>		<ul style="list-style-type: none"> • Absence de la phosphorylation de P53 par l'ATM (p53 ne se dissocie par de son inhibiteur MDM2, elle reste inactive). • Absence de la détection des cassures doubles brins d'ADN et donc l'absence de la phosphorylation de c-abl (absence de Contrôle de la transition de G1/S, et absence de réparation d'ADN).
<p>Del 17p13</p>		<ul style="list-style-type: none"> • Absence de la transactivation de gène de p21 qui est un inhibiteur des CDK, les complexes CDK cycline restent actives et phosphorylent les protéines RB, ces dernières se détachent des facteurs de transcription E2F, ces facteurs vont ensuite activer la phase S. • Absence de la transactivation gène de 14-3-3Σ, il n'y aura pas une séquestration de complexes de CDC2-Cycline B1 dans le cytoplasme, il rentre dans le noyau et provoque la transition de G2/M. • Absence d'apoptose.

II. 5. 5. Anomalies moléculaires récurrentes

II. 5. 5. 1. Statut mutationnel des *IgVH*

Le marqueur pronostique le plus pertinent, actuellement, repose sur la détermination du statut mutationnel des IGHV. **(Brochet, 2008)**. Une homologie de plus de 98% avec le gène germinale définit le statut "non muté" et une homologie inférieure à 98% définit le statut "muté" **(Crombie et Davids, 2017)** Ainsi, les LLC dites « naïves » ou non mutées, sont développées à partir d'un lymphocyte B naïf n'ayant pas transité par le centre germinatif du follicule lymphoïde secondaire et n'ayant pas rencontré d'antigènes. Les LLC dites « mémoires » ou mutées sont développées à partir d'un lymphocyte B mémoire qui a transité par le centre germinatif et qui a subi le phénomène d'hyper mutation somatique des IGHV. **(Brochet, 2008)** Dans la majorité des cas une anomalie cytogénétique favorable s'associe à un statut mutationnel IGHV muté et une anomalie cytogénétique défavorable s'associe à un statut mutationnel IGHV non muté. **(Crombie et Davids, 2017)**

II. 5. 5. 2 Mutations du gène *Tp53*

Les mutations du gène TP53 sont retrouvées dans de nombreux cancers.

Les mutations de décalage de lecture et les mutations stop aboutissent à la perte de l'activité suppresseur de tumeur. Les mutations faux sens entraînent la substitution d'un acide aminé par un autre et lorsqu'elles sont situées dans le domaine de fixation à l'ADN (exons 4 à 9) elles inhibent la fixation du tétramère p53 à l'ADN et donc l'activité transcriptionnelle de la p53. Si la mutation est hétérozygote le tétramère est constitué de protéines mutées et de protéines sauvages ce qui empêche la liaison à l'ADN, la forme mutée a un effet dominant négatif sur la forme sauvage **(Cosson, 2015)**

II. 5. 5. 3 Mutation du *NOTCH 1*

La voie NOTCH est une voie de signalisation importante, elle joue un rôle majeur dans l'orientation des cellules souches vers leurs différenciation, elle est impliquée dans la croissance ainsi que dans l'apoptose au cours du développement cellulaire, il faut noter que cette voie permet la régulation de l'expression de divers gènes comme C-Myc, TP53 et la voie NFκB comme GATA2 . La perte de fonction de certains de ces composants est rencontrée dans des pathologies héréditaires et leurs surexpressions dans certaines pathologies cancéreuses. **(Cosson, 2015)** **(Figure 10)** Le gène NOTCH est retrouvé muté chez 4 à 12 % des patient LLC dont 80 % muté pour NOTCH1, la mutation retrouvée est une délétion de 2 paires de bases au niveau de domaine Pest de la protéine. **(Rosati et al ., 2018)**

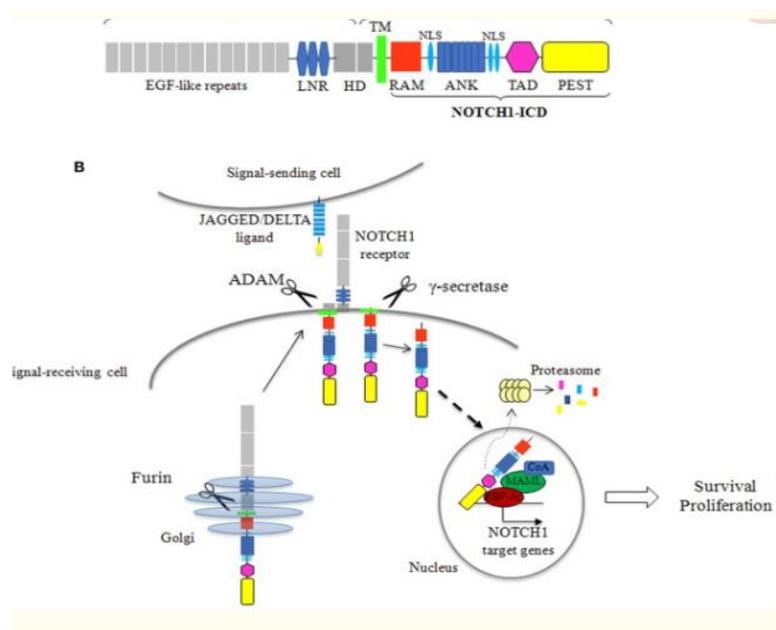


Figure 10: NOTCH1 protein structure and signal activation (Robert, 2018)

II. 5. 5. 4 Mutations du gène *BIRC3*

BIRC3 est situé sur le chromosome 11 à proximité de l'*ATM* et les délétions 11q incluent le locus *BIRC3* dans environ 80% des cas. En outre, *BIRC3* peuvent être affectées par des mutations, principalement un non - sens et des variantes du cadre de lecture, avec une incidence de 3-5% chez les patients non traités, ce qui rend ces mutations rares par rapport à *TP53*,*NOTCH1*,*SF3B1* ou *ATM*.

Les mutations ciblent 3 hot spots situés dans les exons 5, 7 et 10. Elles sont rares au diagnostic (4%) et semblent inexistantes au cours des MBL.

BIRC3 induit une dégradation protéasomique de MAP3K14, qui est le principal moteur de l'activation non canonique du facteur nucléaire kappa B (NFκB). Par conséquent, *BIRC3* perturbé pourrait entraîner une activation indépendante du ligand de la voie constitutive NFκB, induisant la prolifération et la survie des cellules. Elles sont de plus associées à une évolution défavorable similaire à celles des patients délétés ou mutés pour TP53. (Rossi et al.,2013) (Figure 11)

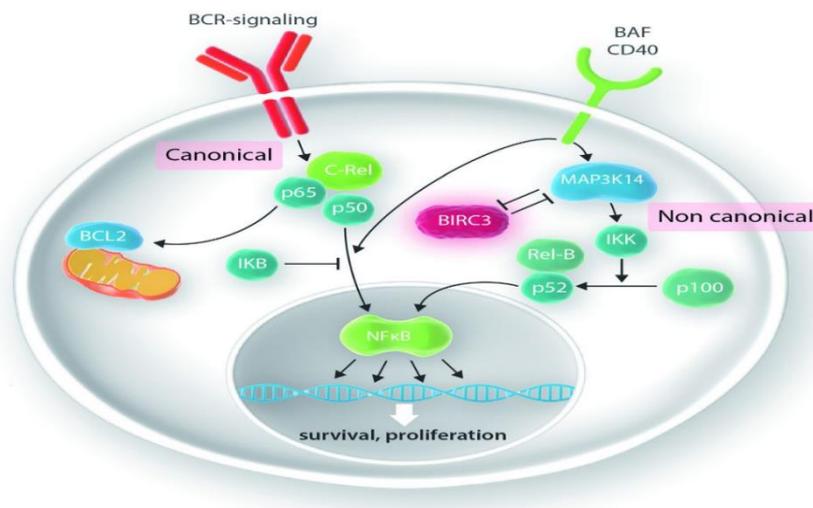


Figure 11 : voies canoniques et non canoniques du facteur nucléaire kappa B.(Rossi et al ., 2013)

II. 5. 5. 5 Mutations de *SF3B1*

Chez l'homme, le gène *SF3B1* (pour Splicing factor 3B subunit 1) est situé sur le bras long du chromosome 2 (2q33.1). Il code pour la protéine SF3B1 l'un des constituants des facteurs de l'épissage, un processus qui consiste à exciser les introns et réunir les exons d'un pré-ARNm et l'obtention d'un ARNm prêt à la traduction.

La mutation de SF3B1 est associée à la présence de délétion 11q et elle est la plus fréquente après la mutation TP53, cette mutation provoque une activité aberrante du spliceosome, avec un rapport ARNm non épissé/épissé augmenté par rapport à d'autres mutations.

Ces mutations, majoritairement faux-sens, sont situées essentiellement dans les exons 12 à 18 ; elles ciblent de façon récurrentes 3 hot spots dans l'exon 14 (codons 662, 666, et 700, la mutation K700E étant la plus récurrente)(Wanet Wu, 2013) (Figure 12).

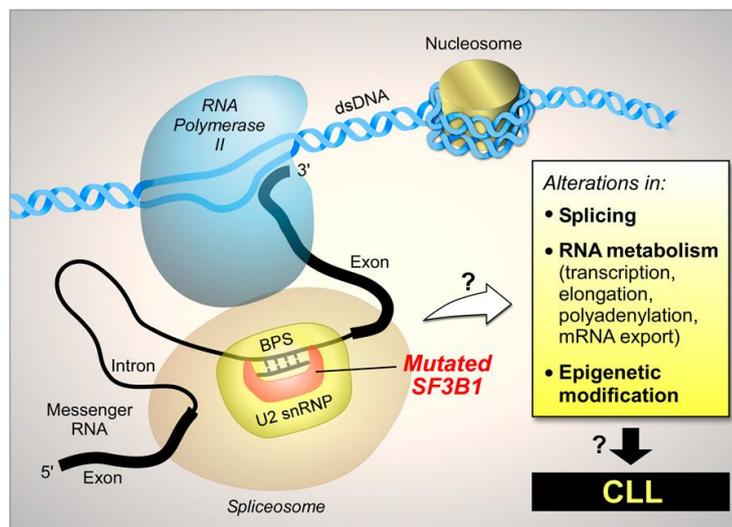


Figure12 : Impact potentiel des mutations SF3B1 dans la LLC (Wan et Wu, 2013)

Chapitre II

Matériel et méthodes

II. MATERIEL ET METHODES

Nous avons réalisé durant notre stage de 2 mois (Fev-Mars 2020) au niveau du plateau technique de cytogénétique, du service hématologie, Centre de Lutte Contre le Cancer (CLCC), Hôpital Frantz Fanon à Blida, une étude cytogénétique des cas de LLC recrutés sur 18 mois dans la région centre-ouest de l'Algérie.

Il s'agit d'une étude rétro-prospective de 43 cas de LLC, pour lesquels nous avons recherché les anomalies cytogénétiques récurrentes : trisomie 12, délétion 13q14q34, délétion ATM et délétion P53 par la technique de cytogénétique moléculaire FISH (Hybridation *In Situ* Fluorescente).

II.1. Matériel

II.1. 1 Matériel biologiques

Notre étude a été réalisée sur des culots cellulaires congelés issus de cultures cellulaires de patients suivis pour LLC ou sur prélèvements de sang périphérique des nouveaux patients recrutés durant notre période de stage, au service Hématologie de l'EHS CLCC Blida.

II.1. 2. Matériels non biologiques

Le travail est réalisé dans l'unité cytogénétique qui comprend une salle de culture, une salle de manipulation (caryotype et FISH) et une salle de lecture (chambre noire) pour la FISH.

Chaque salle est dotée du matériel nécessaire à l'étude (détaillés dans les annexes 1 et 4). Pour la FISH, on a utilisé les sondes commerciales de chez Cytocell (Figures 13 à 16).

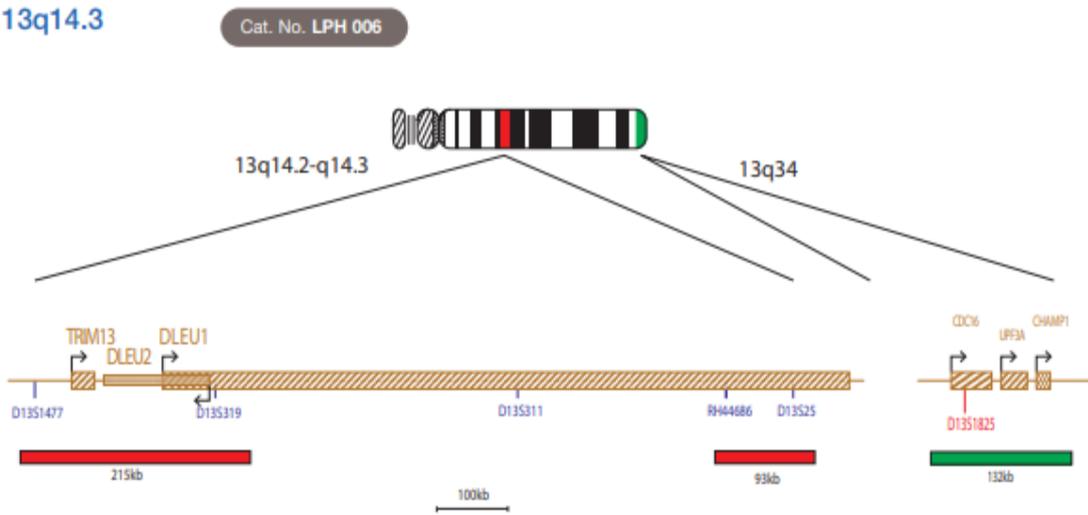


Figure 13 : Schéma de la Sonde 13q14q34 (Cytocell)

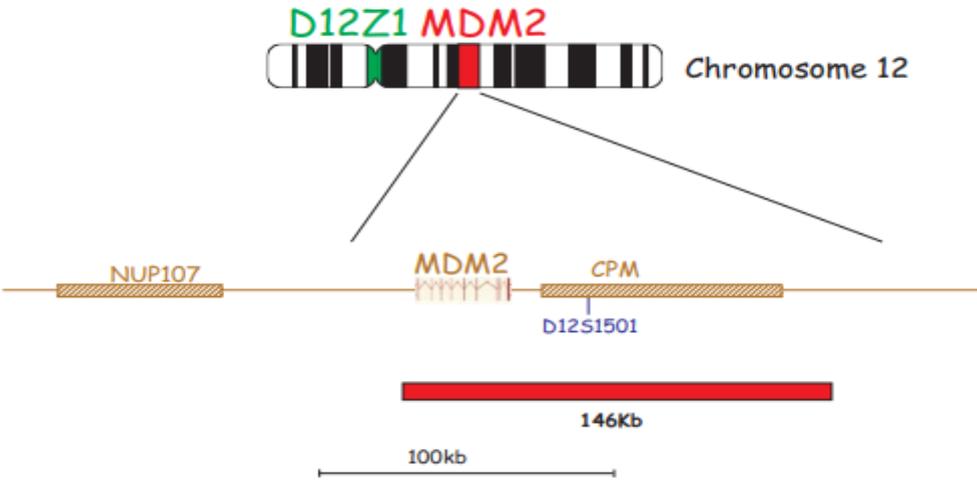


Figure 14 : Schéma de la Sonde centromère du chromosome 12/MDM2

Dans 10 cas, une sonde couplée CEP12/13q14q34 a été utilisée

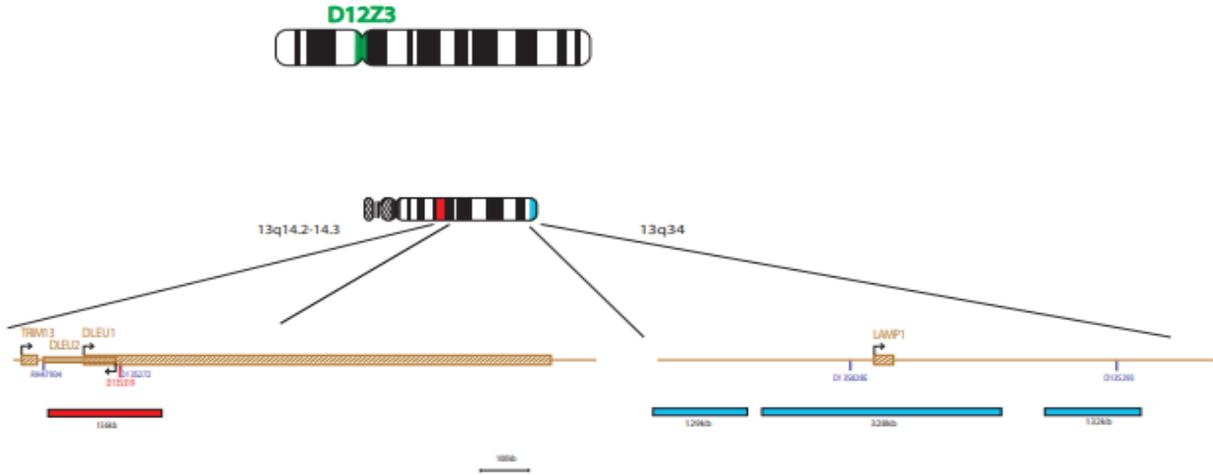


Figure 15 :Schéma de laSonde couplée CEP12/13q14q34

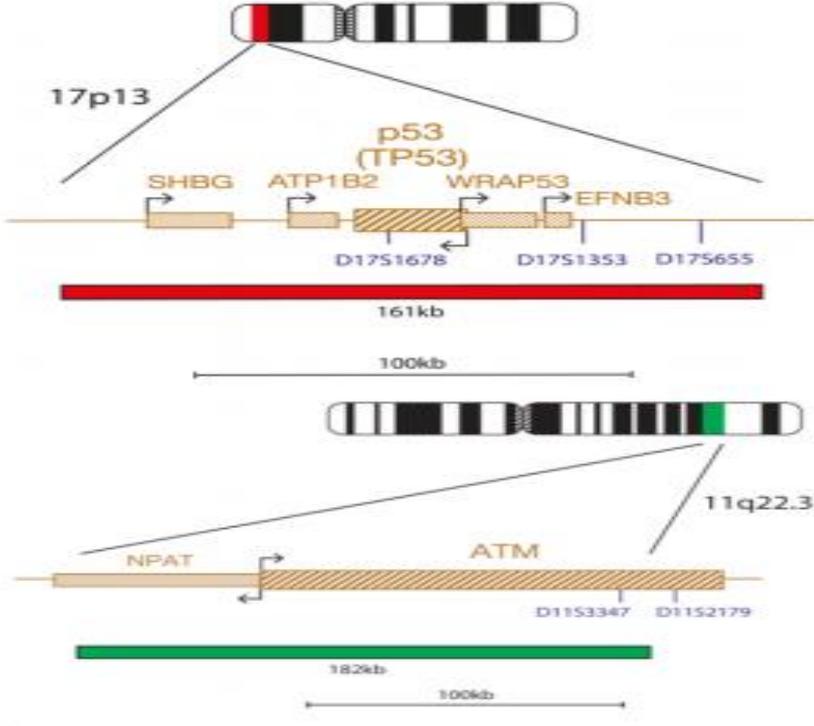


Figure 16 : Schéma de la Sonde couplée 11q22.3 (ATM)/17p13 (P53)

II.2. Méthodes

La description qui suit est une fiche technique de travail ; le travail pratique personnel a couvert toutes les phases de la réalisation d'une FISH depuis le prélèvement jusqu'à la lecture assistée des cas divers d'hémopathies malignes recrutés par le laboratoire.

Après une période de formation pratique de 15 jours dans ce laboratoire organisé autour de toutes les étapes nécessaires à la pratique d'une FISH, nous avons traité 43 culots cellulaires de LLC connues et typées préalablement pour l'ATM/P53, complété par la recherche de la trisomie 12 et de la délétion 13q14 ; en débutant par la phase d'étalements cellulaires sur lames.

II.2.1. Prélèvement

Pour les nouveaux patients diagnostiqués lors de notre période de stage, la procédure a été totale et a démarré par un prélèvement de sang périphérique.

Il s'agit d'un prélèvement sanguin périphérique de 5 ml de sang total dans un tube vacutainer hépariné. Des conditions d'asepsie rigoureuses sont respectées lors de la réalisation du prélèvement pour éviter toute contamination. Aussitôt fait, le prélèvement est rapidement acheminé au laboratoire de cytogénétique.

II.2.2. Comptage

Un comptage des globules blancs est effectué sur automate pour hémogramme,

Il faut mettre un million de cellules pour chaque ml de milieu de culture (au total 10 ml) dans un flasque de 50 ml.

Des dilutions peuvent être nécessaires si le nombre de GB est très élevé dépassant 100.000/ μ l ($\frac{1}{2}$ jusqu'à 1/10).

II.2.3. La mise en culture

Toute mise en culture est effectuée stérilement sous hotte bactériologique à flux laminaire. Chaque flasque est identifié par : le nom, le prénom, la date de culture, le type de prélèvement (dans notre cas c'est le sang) et la technique utilisée (72h DSP 30/IL2).

Dans chaque flasque, on ajoute la quantité de sang calculée dans 10 ml de RPMI complet et on rajoute 20 μ l d'IL2 et 10 μ l de DSP30.

Les flasques sont incubés à plat dans un plat en inox, leurs bouchons dévissés d'un quart de tour, dans une étuve à CO₂ (5%) et à 37°C pendant 72h.

II.2.4. Sortie de culture

II.2.4.1. Blocage des cellules en métaphases

Après 72 de culture, on procède à l'arrêt de la pousse cellulaire à l'étape de métaphase par l'ajout de la colchicine (qui est un inhibiteur de la progression de la mitose vers l'anaphase en bloquant la polymérisation de microtubules).

On met 100 µl de colchicine dans chaque flasque sous hotte à flux laminaire et on remet les flasques (toujours bouchons dévissés d'un quart de tour) dans l'étuve à CO₂ pendant 30 min.

Après 30mn d'action de la colchicine, on sort les flasques de l'étuve à CO₂, pour passer à l'étape suivante qui est le choc hypotonique.

II.2.4.2. Choc hypotonique

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

Il est réalisé à l'aide du KCl qui entraîne le gonflement des cellules par différence de pression osmotique.

Les étapes suivantes sont réalisées :

- Transvaser les flasques dans des tubes coniques (15 ml) étiquetés par le nom, prénom du patient, type et date de culture.
- Centrifuger les tubes fermés à 1300 tours pendant 8 min
- Enlever le surnageant en laissant un 1/3 culot pour 2/3 de surnageant
- Rajouter un ml de KCl (réchauffé au préalable à 37° C) et homogénéiser doucement le culot cellulaire.
- Compléter progressivement par le KCl jusqu'à 12 ml et procéder à des aspirations - refoulements de ce mélange sur la paroi interne du tube conique plusieurs fois (choc mécanique).
- Incuber ces tubes sans bouchons à l'étuve sèche à 37°C pendant 25 minutes

II.2.4.3. La préfixation

Une fois le temps dans l'étuve écoulé, on retire les tubes et on ajoute sur la suspension cellulaire sans l'homogénéiser 1 ml de solution de fixation et on procède à une homogénéisation douce et progressive (les cellules à cette étape sont très fragiles).

Une fois cette préfixation réalisée, on referme les tubes et on les centrifuge à 1300 tours pendant 8 min.

Ensuite on enlève le surnageant en laissant 1/3 culot et 2/3 surnageant pour procéder à l'étape de fixation

II.2.4.4 La fixation

Homogénéiser doucement le culot cellulaire avec une pipete vide puis rajouter 1 ml du fixateur et homogénéiser délicatement.

Compléter jusqu'à 12 ml de fixateur et homogénéiser puis centrifuger à 1300 tours 8 min.

Cette fixation est faite deux à trois fois maximum pour avoir un culot cellulaire clair.

Le culot cellulaire clair ainsi obtenu est conservé à 4°C bouchons bien fermés pour éviter l'évaporation du fixateur, avant de procéder à l'étalement cellulaire.

II.2.5. Etalement cellulaire sur lames

Se fait à partir du lendemain de la sortie de culture.

L'étalement cellulaire nécessite des conditions de température et d'hygrométrie bien précises pour avoir un étalement cellulaire avec des chromosomes bien séparés sur la mitose et des noyaux bien éparpillés sur la lame, pour une hybridation optimale des sondes et pour faciliter la lecture.

Pour réussir un étalement de bonne qualité, la température ambiante doit être de 23°C à 25°C et le taux d'humidité de 30 à 40 %.

Vue la difficulté d'obtenir toujours ces conditions dans une atmosphère ambiante d'un laboratoire, certains laboratoires sont dotés d'une enceinte réglée appelée Thermotron, pour optimiser l'étalement cellulaire et pallier aux conditions météo.

Une fois les conditions réunies, on procède ainsi :

- Centrifuger les tubes à 1300 tours pendant 5 min
- Enlever le surnageant pour obtenir 1/3 de culot et 2/3 de fixateur
- Homogénéiser à la pipette de transfert en plastique
- Préparer les lames avec inscription du nom-prénom, de la date de culture, de la technique et de la sonde : une lame CEP12, une lame 13q14q34 et une lame ATM/P53 (3 lames par patient)
- A l'aide d'une pipette pasteur et après avoir homogénéisé le culot cellulaire, on dépose une goutte de ce culot sur la lame et on laisse étaler puis on laisse les lames sécher à température ambiante.

II.2.6. Hybridation *In Situ* Fluorescente: FISH

Dans cette étude nous avons utilisé le protocole de FISH pratiqué en routine dans l'unité de cytogénétique du CLCC de BLIDA.

II.2.6.1. Prétraitement des lames

Avant de démarrer le prétraitement il faut :

- Préparer les solutions de travail : 2 SSC, Ethanol : 100%, 85% et 70%. (Annexe)
- Délimiter la zone de l'étalement par un crayon diamant sur le verso de la lame.

Les étapes suivantes sont réalisées à **l'abri de la lumière** :

- Plonger les lames dans du 2 ×SSC (Standard Sodium Citrate) pendant 2 min à température ambiante (TA)
- Déshydrater dans des bains d'éthanol (70% ,85%,100%), 2 min dans chaque bain à TA.
- Laisser sécher à TA.

La procédure du pré traitement des lames peut changer selon les sondes utilisées. Suivre les indications du fournisseur.

II.2.6.2. Dénaturation à l'abri de la lumière

- Retirer la sonde du congélateur - 20°C et la préchauffer à TA
- Bien homogénéiser la sonde en pipetant plusieurs fois
- Prélever 10 µl de la sonde par test et le mettre dans un tube Eppendorf. Remettre le tube de sonde à - 20°C.
- Mettre la sonde (tube Eppendorf) et la lame échantillon à préchauffer à 37°C pendant 5 min (sur une plaque chauffante)
- Déposer les 10 µl de sonde sur l'échantillon et couvrir avec une lamelle.
- Chasser les bulles d'air entre lame et lamelle si elles existent, en appliquant une petite pression sur la lamelle, leurs présences empêchent l'hybridation.
- Mettre les lames dans l'Hybrite (chambre humide automatisée) pour une dénaturation à 80°C pendant 2 min.

II.2.6.3. Hybridation

Incuber les lames pendant une nuit à 37°C à l'abri de la lumière, dans l'Hybrite.

II.2.6.4. Lavage post hybridation à l'abri de la lumière

Il a pour but d'éliminer les hybrides non spécifiques et les molécules de sondes non hybridées ainsi que les lamelles

Le lendemain de l'hybridation, on prépare les réactifs du lavage : Igepal 0,1%, Igepal 0,3%, Tween 20 et l'éthanol 100%, 85% et 70% (Annexe 6)

On procède ainsi :

- Mettre la lame dans la solution 0.1 Igepal pendant 2 min à 37°C, afin de retirer délicatement la lamelle.
- Egoutter la lame et la plonger dans du 0,3 Igepal à 72°C pendant 2 min.
- Plonger ensuite la lame dans du 0.05% Tween (PH7) à température ambiante pendant 30 secondes sans agitation.

- Sécher la lame à TA, ensuite appliquer 10 µl de DAPI sur chaque lame.
- Recouvrir d'une lamelle, enlever les bulles d'air en appliquant une petite pression sur la lamelle
- Laisser pendant au moins 10 min cette préparation à l'abri de la lumière et à +4°C afin que la coloration du DAPI apparaisse nettement.
- La lecture se fait au microscope à fluorescence et à l'abri de la lumière.

II.2.7. Lecture au microscope à fluorescence

La lecture se fait dans une chambre noire, avec comptage des signaux d'hybridation sur au moins 200 noyaux et 20 mitoses pour chaque sonde testée.

Dans le cas où les mitoses sont insuffisantes (moins de 10), un comptage de 500 noyaux est réalisé.

- Une prise de 3 à 5 photos par sonde pour l'archivage est effectuée.

➤ Lecture et interprétation

Chaque sonde est marquée par un fluorochrome sur le locus d'intérêt (exp : rouge) et souvent sur un autre locus témoin par un autre fluorochrome (exp : vert).

Le seuil de positivité : 5% pour les sondes 13q14, CEP 12, ATM et de 7% pour la P53.

Sur les noyaux

- Ne pas compter les noyaux qui se chevauchent, ni les noyaux détériorés.
- Ne pas compter les zones où les noyaux ne sont pas hybridés.
- Compter les signaux divisés en deux petits signaux juxtaposés comme un seul signal.
- Compter deux petits signaux reliés par un fil fluorescent comme un seul signal.
- Ne pas compter les signaux non spécifiques, reconnus par leurs intensités de fluorescence différente.
- Sur les mitoses

- Ne pas compter les mitoses incomplètes, ou à chromosomes trop dispersés.

Les résultats sont rendus selon la nomenclature internationale ICSN 2016

II.3. Etudes statistiques

Application de paramètres basiques : pourcentages ; moyennes.

Chapitre III

RESULTATS

III. RESULTATS

III.1 Etude pratique

L'étude pratique a porté sur 43 cas de LLC, tous ont eu un diagnostic cytologique et une étude par cytométrie en flux sur sang périphérique avec établissement et calcul d'un score de Matutes.

Nous allons présenter dans cette étude :

- Les caractéristiques épidémiologiques des patients :
 - L'âge moyen au diagnostic.
 - La répartition selon le sexe.
 - La répartition selon l'origine géographique.
 - La répartition selon la profession (facteur d'exposition)
 - L'existence de cancer personnel ou familial et le degré de parenté avec le patient
 - Les circonstances de découverte de la pathologie
 - Le délai diagnostic
 - L'hémogramme au diagnostic
 - Le score de Matutes
 - Le stade de la maladie au diagnostic

- Une analyse cytogénétique des anomalies récurrentes dans la LLC.

L'étude FISH est faite sur des culots congelés et a comporté une recherche des anomalies suivantes pour chaque patient : délétion 13q14q34, la trisomie 12, la délétion ATM et la délétion P53 est faite par une sonde double ATM/P53.

Cette recherche est faite en utilisant des sondes commerciales de chez Cytocell

III.1.1. Résultat de l'Etude épidémiologique

Nous présentons les résultats épidémiologiques des 43 patients LLC étudiés.

III.1.1.1. Répartition des patients selon le sexe

L'étude a concerné 34 Hommes et 9 femmes avec un Sexe ratio = 3,7

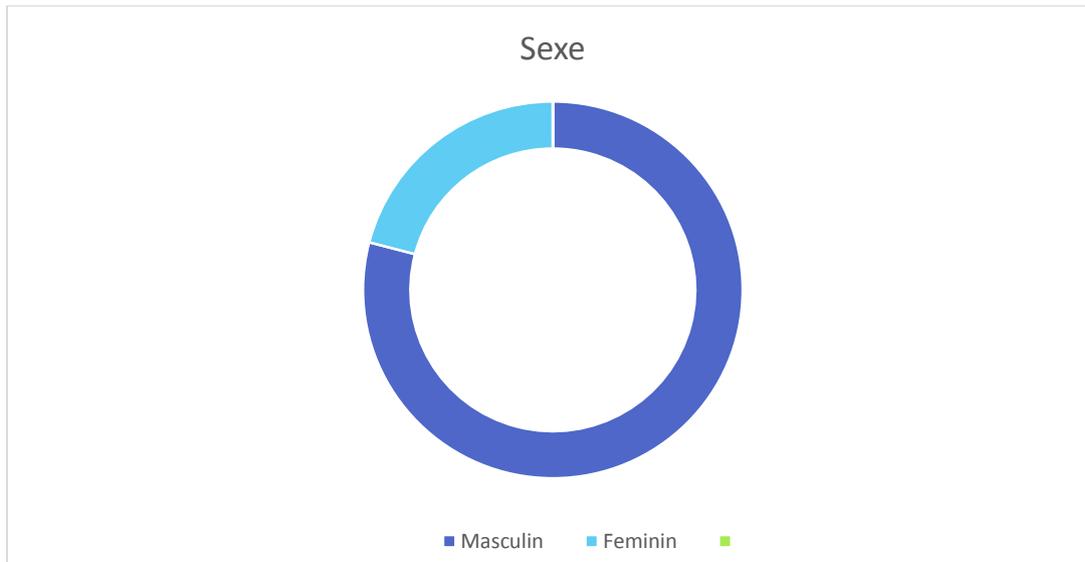


Figure 17 : Répartition des patients selon le sexe

III.1.1.2. Age moyen des patients au diagnostic

L'âge moyen des patients au diagnostic est 65 ans (44- 96) avec 21 patients âgés de moins de 65 ans et 9 patients âgés de plus de 75 ans.

III.1.1.3. Origine géographique des patients

L'origine des patients est représentée dans la figure 18. Nous remarquons que la majorité des patients sont de la région de Blida (n = 12)

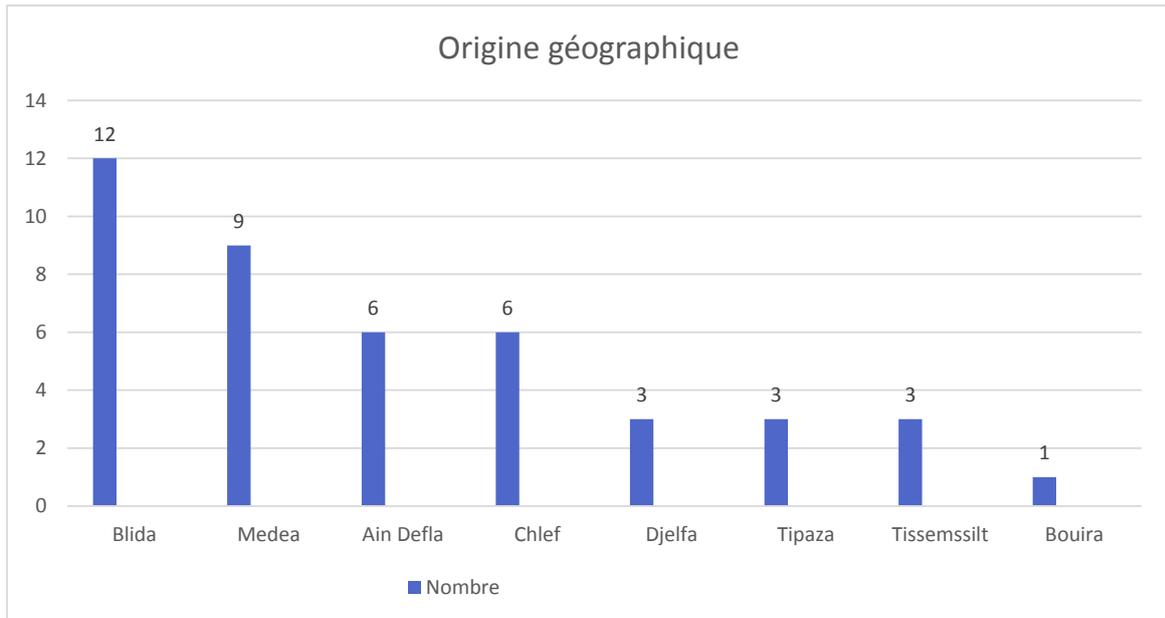


Figure 18 : Répartition des patients selon l'origine géographique

III.1.1.4. Répartition des patients selon la profession

La profession a été précisée chez 40 patients dont la répartition est établie dans la figure 19. Les sans-emplois, fellah et fonctionnaires sont les catégories les plus représentées.

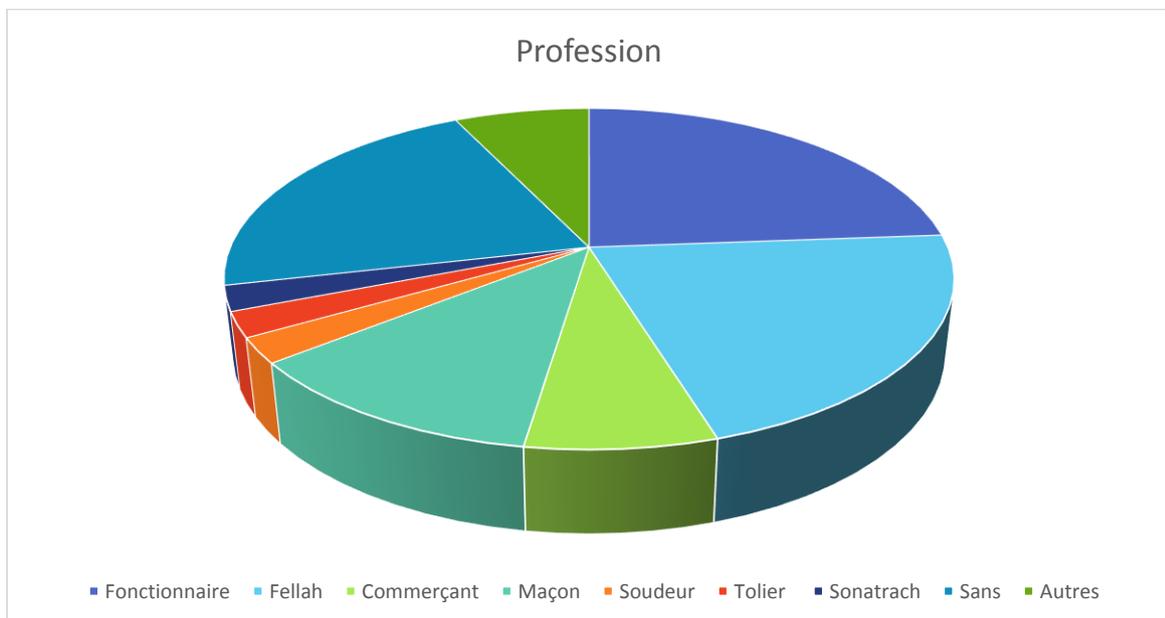


Figure 19 : Répartition des patients selon la profession

III.1.1.5. Comorbidités

19/43 patients (44%) présentent une ou plusieurs comorbidités représentées essentiellement par l'hypertension artérielle, diabète et les cardiopathies (**Figure 20**).

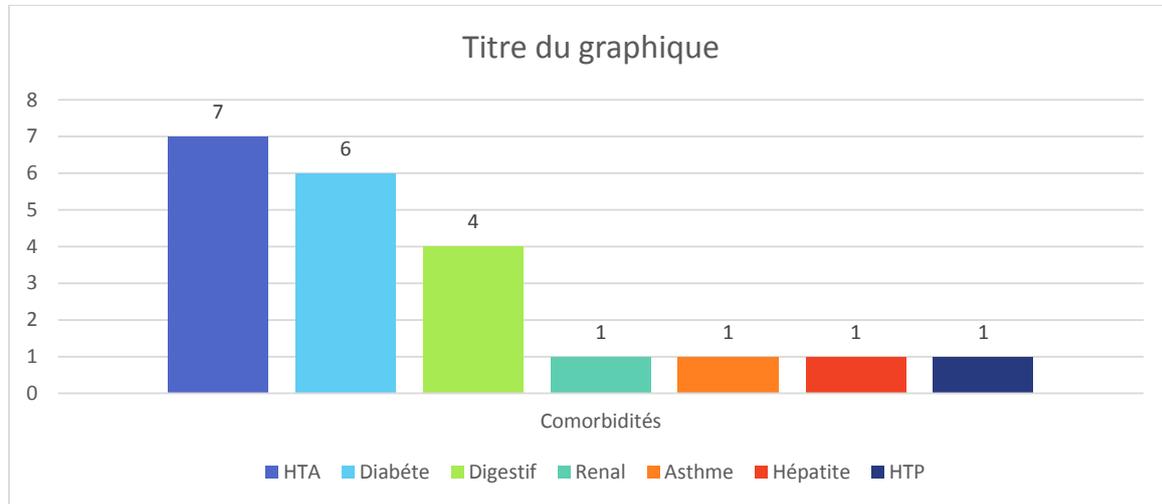


Figure 20 : représentation des comorbidités

III.1.1.6. Cancer personnel et/ou familial :

Dans notre étude, un seul cas masculin de 46 ans a développé une leucémie lymphoïde chronique à la fin du traitement d'entretien (2 ans de traitement) d'une LAL B. 8 cas parmi 43 (18,6%) patients ont des antécédents familiaux de cancers :

- Hématologique : 3 cas :
 - Leucémie aigüe chez le neveu
 - LLC chez le père
 - Myélome Multiple chez un frère
- Non hématologique : 11 cas
 - 4 cas de néoplasies du sein (Filles, mère et tante):
 - 4 néoplasies digestives (Estomac chez un frère, colon chez une fille, Foie chez un frère et un type non précisé chez un oncle maternel)
 - Un ostéosarcome chez une sœur
 - Adénocarcinome de la prostate chez le père
 - Néoplasie du cerveau chez un fils

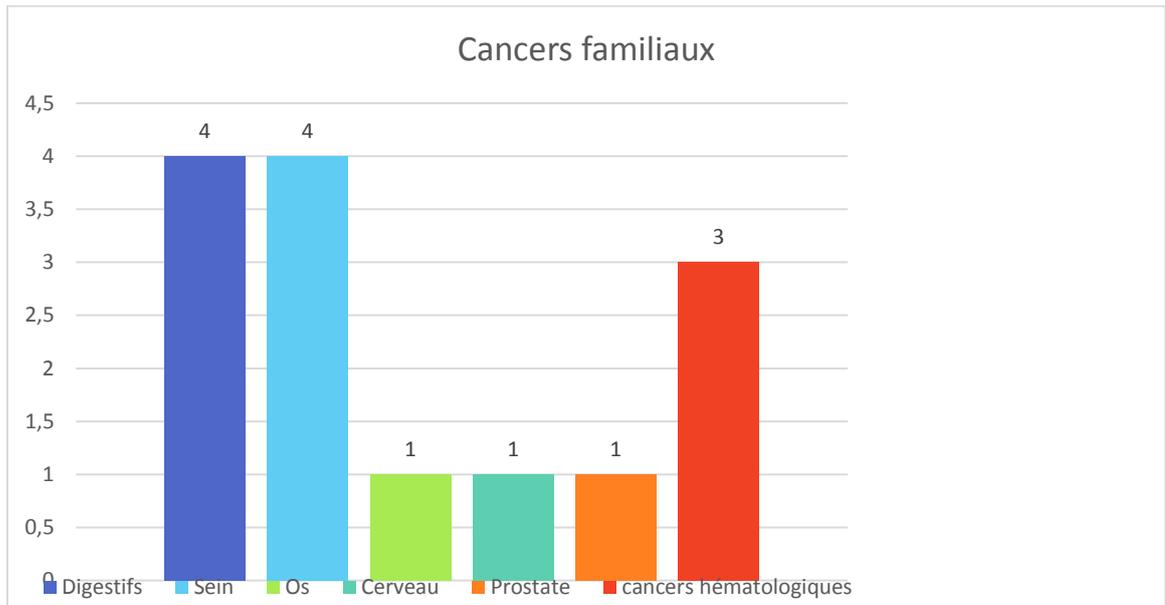


Figure 21 : Répartition des cancers familiaux

III.1.1.7. Circonstances de découverte :

Les circonstances de découvertes de la maladie dans notre cohorte sont de 3 types (**Figure 22**):

- Syndrome tumoral : dans 60,4%
 - o Adénopathie : 24 cas (55,8%)
 - o Splénomégalie : 1 cas (2,3%)
 - o Hypertrophie amygdalienne : 1 cas (2,3%)
- Hyperleucocytose (Hémogramme) : 12 cas (27,9%)
- Infection (pulmonaire/urinaire) : 03 (7%)

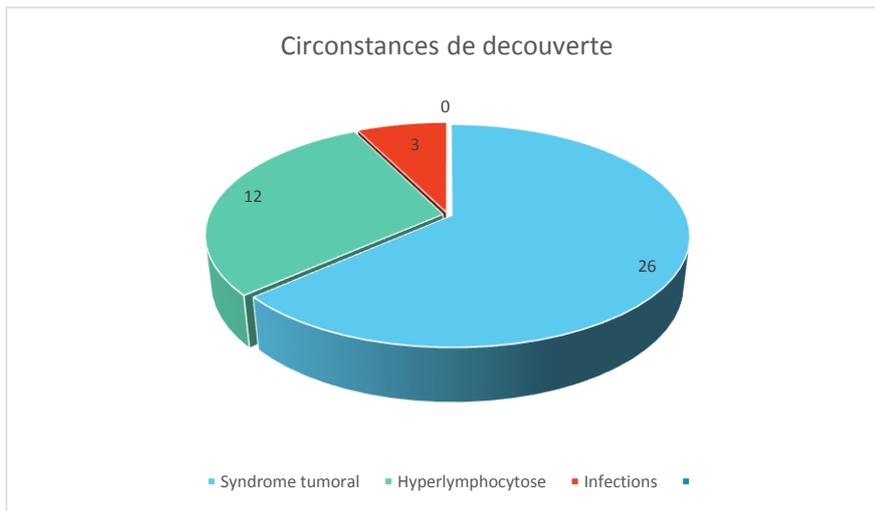


Figure22 : Circonstances de découverte

III.1.1.8. Délai diagnostique

Le délai moyen de diagnostic est de 6,7 mois (0-48 mois). La découverte de la maladie a été fortuite à l'occasion :

- D'un bilan préopératoire pour lithiase vésiculaire
- D'un adénome de la prostate
- D'une cure de cataracte
- D'un bilan de routine en Médecine de travail

Ce délai était étendu à 4 ans chez des patients asymptomatiques au stade A ou au stade B avec un syndrome tumoral peu important.

III.1.2. Critères diagnostiques

Les critères de diagnostics reposent sur les résultats de l'hémogramme, du frottis sanguin ainsi que de la Cytométrie en flux. Les résultats sont représentés dans les tableaux VI et VII ainsi que les figures de 23 à 26.

➤ **Hémogramme**

Tableau VI: données de l'hémogramme

	Moyenne	Extrêmes
Globules Blancs	225500/ μ l	8300 - 960000/ μ l
Lymphocytes	99137/ μ l	5400 – 900000/ μ l
Hémoglobine	12,7 g/dl	4,8 g/l – 16 g/dl
Plaquettes	160400/ μ l	44000 – 385000/ μ l

➤ **Frottis sanguin : aspects cytologiques :**

L'examen cytologique des frottis sanguins a montré :

- Une cytologie typique avec présence de petits lymphocytes d'allure mature chez 35 cas (81,4%) (**Figure 23**)

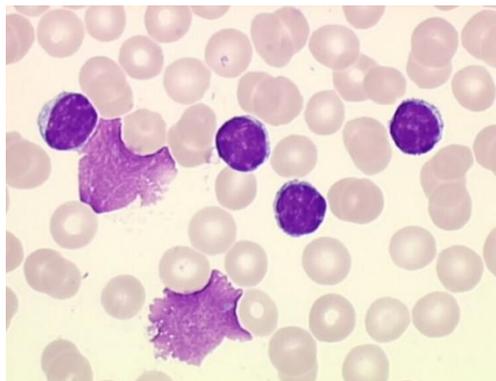


Figure 23 : Frottis sanguin de LLC typique

- Une cytologie atypique avec présence de pro lymphocytes ou lymphocytes à noyaux encochés dans 8 cas (18,6%) (**Figure 24**)

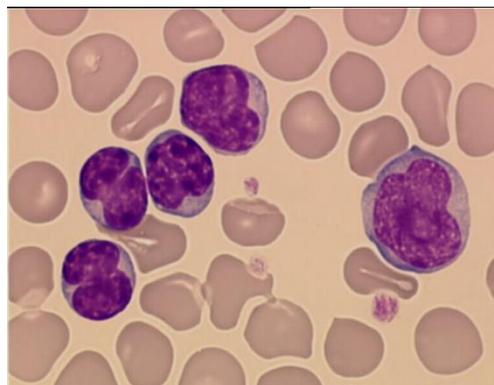


Figure24 : Frottis sanguin de LLC atypique

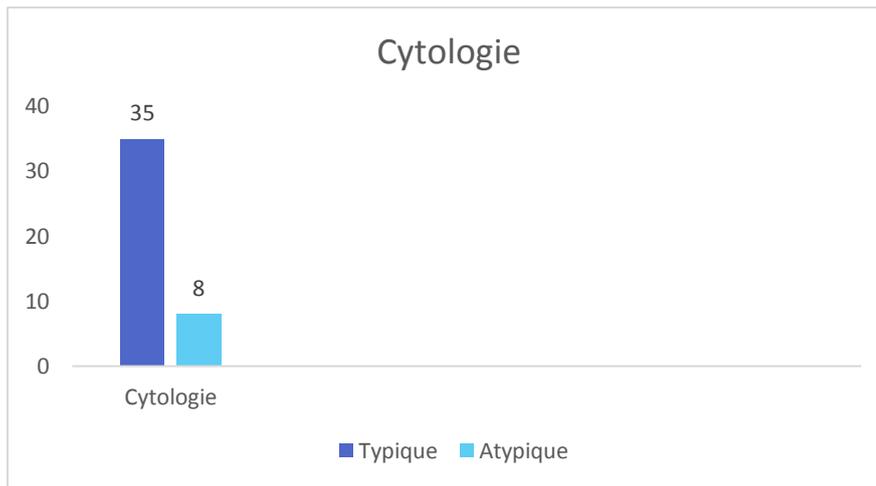


Figure 25 : Répartition des types cytologiques de LLC

➤ **Cytométrie en flux**

L'étude des antigènes membranaires lymphocytaires par cytométrie en flux a révélé les résultats exprimés dans le tableau suivant

Tableau V : Score de Matutes des patients

Matutes	Nombre de cas	Pourcentage
3	5	11,6%
4	14	32,6%
5	24	55,8%

III.1.3. Résultats de l'analyse cytogénétique

Sur 43 patients typés par FISH selon les anomalies récurrentes habituellement étudiées dans la LLC, nous avons retrouvé :

- Absence d'anomalies ciblées dans 9 cas (21%)
- Anomalies récurrentes dans 34 cas (79%)

III.1.3.1. Dans le groupe des patients sans anomalies cytogénétiques ciblées nous retrouvons les caractéristiques suivantes :

- **Sexe :**
 - Hommes = 7
 - Femmes = 2
 - Sex ratio = 3,5

- **Age moyen** : 64 ans (46-76)
- **Cytologie** :
 - Typique : 7 cas
 - Atypique : 2 cas
- **Score de Matutes** :
 - Score 4 : 3 cas
 - Score 5 : 6 cas
- **Stade clinique** :
 - A : 2 cas
 - B : 3 cas
 - C : 4 cas

III.1.3.2. Dans le groupe de patients ayant présenté des anomalies récurrentes

Nous retrouvons des anomalies qui sont soit isolées, soit associées. Les anomalies isolées sont celles qui sont importantes à relever du fait de leur impact pronostique dans cette affection ces anomalies sont représentées dans la **figure 26**.

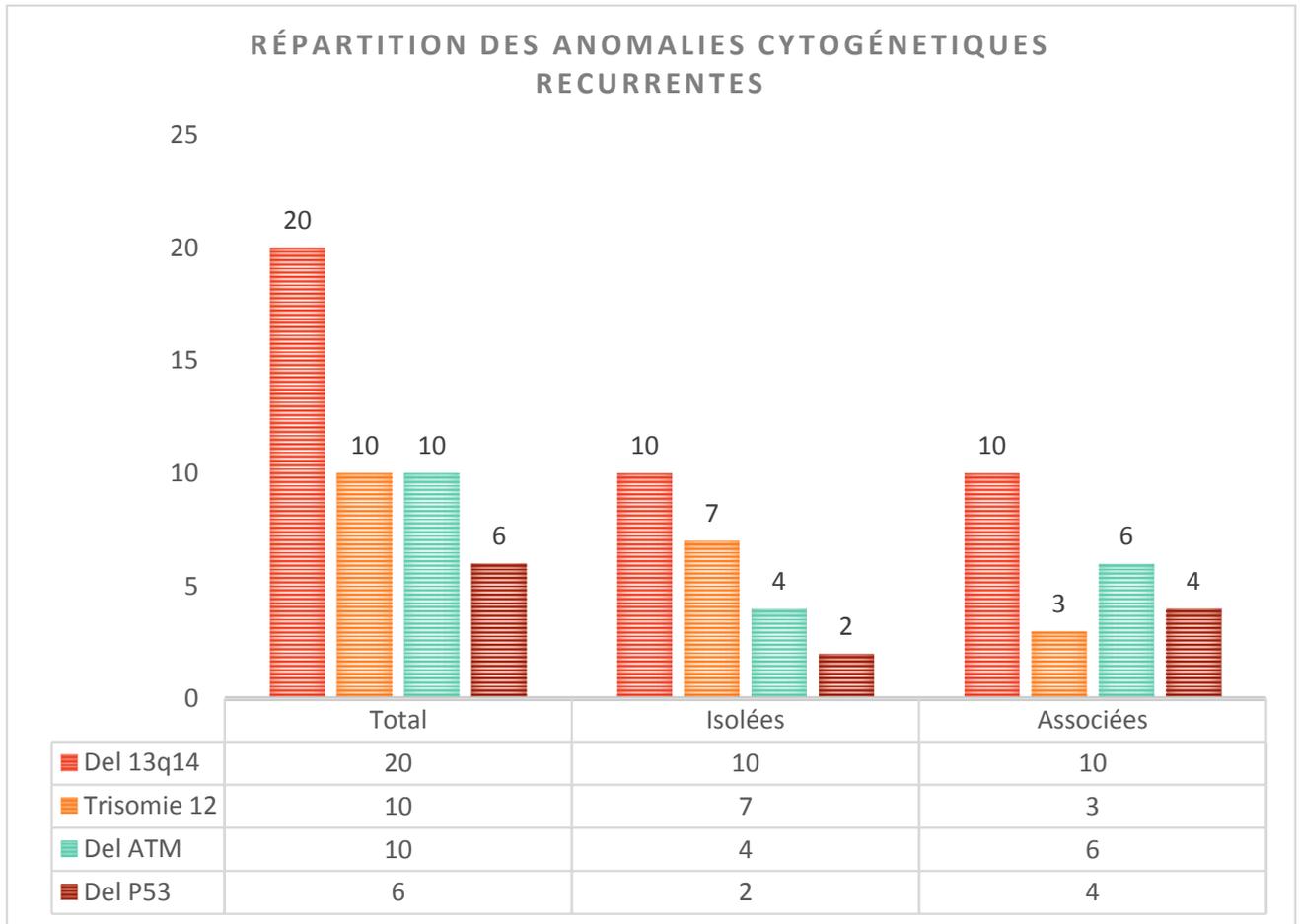


Figure 26 : Répartition selon les anomalies cytogénétiques

III.1.3.2.1. La délétion 13q14q34

- Elle est retrouvée dans 20 cas qui représentent 46,5%.
- Toutes les del 13q14 sont mono alléliques et interstitielles avec un pourcentage de délétion qui s'étend de 22% à 99% des noyaux et mitoses.
- Elle est isolée dans 10 cas qui représentent 23,2%.
- Elle est associée à des anomalies haut risque :
 - del P53 dans 2 cas
 - delATM = 5 cas
 - del ATM+ del P53 = 1 cas (complexe)

- L'âge moyen de cette population au diagnostic est de 72 ans.
- Sexe : dans les délétions isolées.
 - o Hommes = 8
 - o Femmes = 2
 - o Sex ratio = 4
- Le délai diagnostique moyen est de 9 mois (0-48)
- Toutes les del 13q14 sont retrouvées dans le groupe cytologie typique, avec un score de Matutes ≥ 4 .
- Cette délétion est retrouvée dans 4 stades A, 4 stades B et 2 stades C.

III.1.3.2.2 La trisomie 12

Elle est retrouvée dans 10 cas, ce qui représente 23,2%

- Elle est isolée dans 7 cas : 16,3%
- Elle est associée à une del P53 dans un cas
- L'âge moyen au diagnostic dans cette catégorie = 65 ans
- Sexe :
 - o Hommes = 7
 - o Femmes = 2
 - o Sex ratio = 3,5
- Délai diagnostique = 4,8 mois (0-12)
- Cytologie atypique dans 5/10 cas (50%)
- Matutes :
 - o = 3 (5 cas = 50%)
 - o = 4 (2 cas)
 - o = 5 (3 cas)

- Stade A = 1 cas
- Stade B = 4 cas
- Stade C = 5 cas.
- Le niveau de trisomie s'étend de 21% à 81%

III.1.3.2.3 Délétion 11q ATM

- Elle est retrouvée dans 10 cas : 23,2%
- Elle est isolée dans 4 cas
- Elle est associée à une del 13q14 dans 5 cas et dans le cadre d'une anomalie complexe (del ATM+ del P53+ del 13q14) dans un cas.
- L'âge moyen au diagnostic dans ce groupe est de 59 ans.
- Sexe :
 - o Hommes = 7
 - o Femmes = 2
 - o Sex ratio = 3,5
- Délai diagnostique : 8,6 mois (1-48)
- Tous les patients ont une cytologie typique
- Matutes ≥ 4 dans tous ces cas.
- Stade A = 2
- Stade B = 5
- Stade C = 2

III.1.3.2.4 Délétion P53

- Elle est retrouvée dans 6 cas = 13,9%
- Isolée dans 2 cas
- Associée à une del13q14 dans 2 cas, à une trisomie 12 dans un cas, et dans le cadre d'une anomalie complexe dans un cas (del P53 + delATM + del 13q14)
- L'âge moyen au diagnostic = 65,5 ans
- Sexe :
 - o Hommes = 5
 - o Femmes = 1
 - o Sexe ratio = 5
- Délai diagnostique = 7 mois (1-24)
- 2 cytologies atypiques /6 dans ce groupe, une del P53 isolée et une associée à une tri 12)
- Matutes ≥ 4 dans tous les cas de ce groupe
- Stade B = 3
- Stade C = 3

Le tableau VI donne un récapitulatif des anomalies cytogénétiques.

Tableau VI: récapitulatif de l'analyse cytogénétique

Type d'anomalie	Age moyen	Sexe	Délai Dc mois	Cytologie	Matutes	Stade	Fréquence
Del 13q14 Isolée	72 ans	H=8 F=2 S.r=4	9	Typiques	≥ 4	A = 4 B = 4 C = 2	Isolée 23,2% Total 46,5%

Trisomie 12	65 ans	H=8 F=2 S.r=4	4	5 aty /10	3 = 5 4 = 2 5 = 3	A = 1 B = 4 C = 5	23,2%
Del ATM	59 ans	H=8 F=2 S.r=4	8,6	typique	≥ 4	A = 2 B = 5 C = 3	23,2%
Del P53	65,5 ans	H=5 F=1 S.r=5	7	2 aty/6	≥ 4	B = 3 C = 3	13,9%

III.1.4. Illustration par des cas cliniques

III.1.4.1. Cas n° 1: Absence d'anomalies

Homme de 46 ans originaire de Blida, maçon, sans antécédents personnels et familiaux. Il présentait les résultats suivants :

➤ **Hémogramme**

Hyperleucocytose : GB= 77500/ μ l, hyper lymphocytose : L = 70525/ μ l, Hb = 12,4 g/dl, Plaquettes = 115000/ μ l.

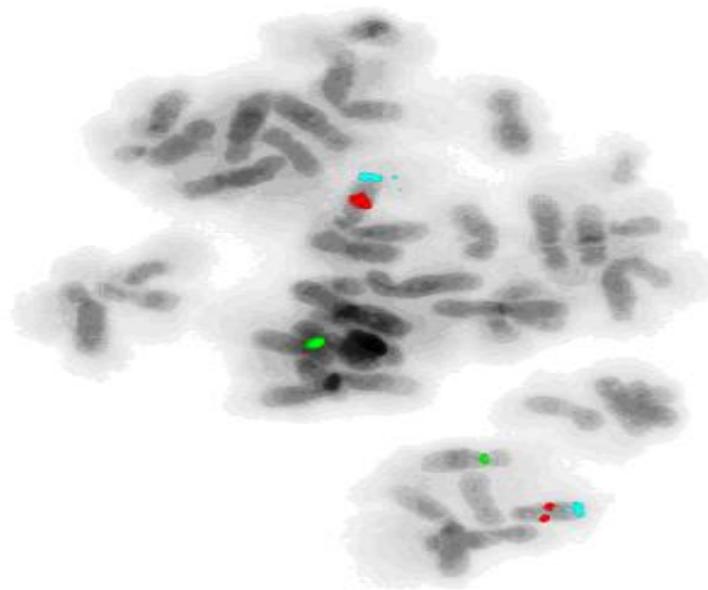
➤ **Frottis sanguin** : 91% de lymphocytes de petite taille typique.

Diagnostique de LLC très probable à confirmer par une cytométrie en flux. En **cytométrie en flux** sur lymphocytes périphérique : Matutes = 5

Vu la présence d'un syndrome tumorale périphérique et le résultat de l'Hg, le patient est classé stade B de Binet.

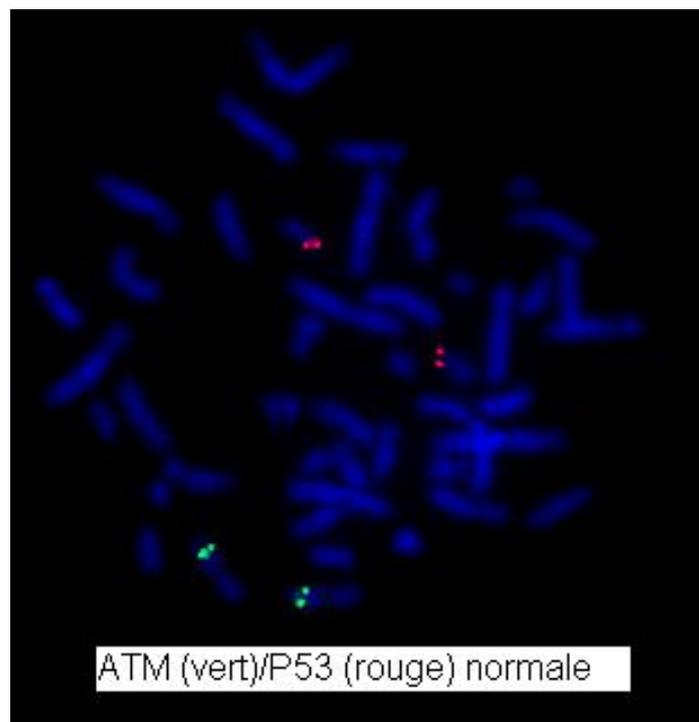
FISH faite pour les 4 sondes : absence d'anomalies sur les noyaux et mitoses.

Patient toujours vivant en rémission complète



CEP12 (vert)/13q14 (rouge)q34 (bleu) : normal

Figure 27 : CEP 12/13q14q34 normale



ATM (vert)/P53 (rouge) normale

Figure 28 : ATM/P53 normale

III.1.4.2. Cas n° 2 : Del 13q14 isolée

Homme de 77 ans originaire de Bouira, fellah, suivi pour asthme et néphropathie chronique et aux antécédents familiaux d'ostéosarcome et de leucémie aigüe chez les neveux. Depuis deux mois, le patient a présenté une infection pulmonaire et puis une infection urinaire, hémogramme demandé par son médecin généraliste retrouvait une hyperleucocytose adresse en consultation spécialisée. Il présentait les résultats suivants :

➤ **Hémogramme**

Hyperleucocytose = 61000/ μ l, hyper lymphocytose = 50800/ μ l, Hb = 14 g/dl, Plaquettes = 174000/ μ l.

➤ **Frottis sanguin** : 84% de lymphocytes de petite taille typique.

Diagnostique de LLC très probable à confirmer par une cytométrie en flux. En **cytométrie en flux** sur lymphocytes périphérique : Matutes = 5.

Vu l'absence du syndrome tumorale périphérique et le résultat de l'Hg, le patient est classé stade A de Binet.

FISH faite pour les 4 sondes : del 13q14 à 47% des noyaux et mitoses.

Patient toujours vivant stable au stade A

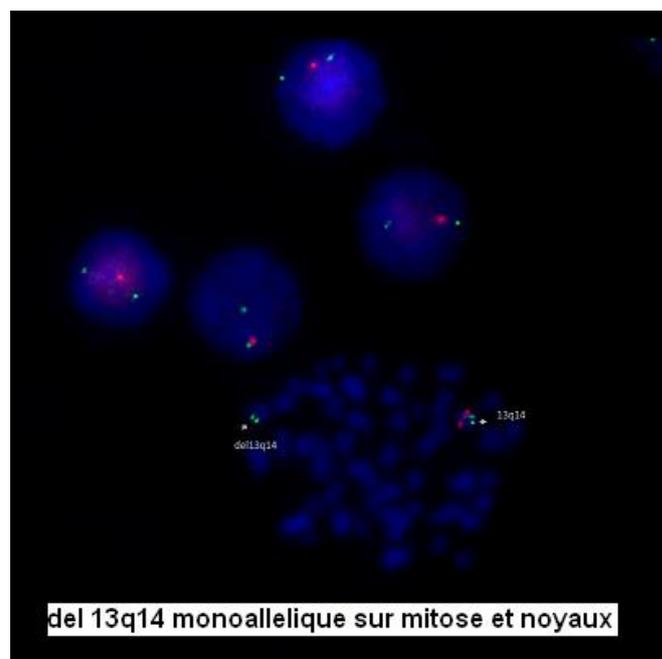


Figure 29: délétion 13q14 sur mitose et noyaux

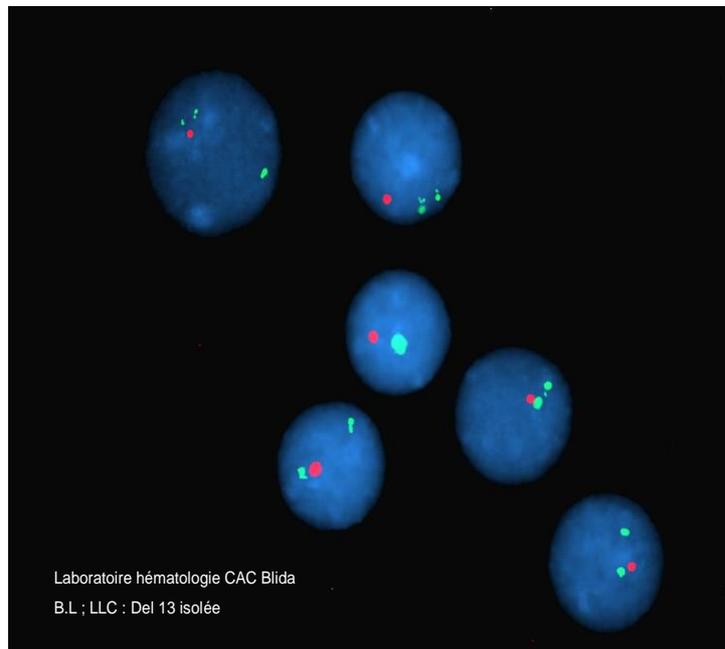


Figure 30: délétion 13q14 sur noyaux

III.1.4.3. Cas n° 3 : Trisomie 12 isolée

Homme de 72 ans, originaire de Chlef, maçon en retraite, présente des adénopathies généralisées et une fatigue depuis un mois. Il présentait les résultats suivants :

➤ **Hémogramme**

Hyperleucocytose = 443300/ μ l, hyperlymphocytose = 412300/ μ l,

Hb = 6,6 g/dl, plaquettes = 177000/ μ l

➤ **Frottis sanguin**

Une lymphocytose 93% avec présence de petits lymphocytes matures + lymphocytes avec un noyaux encoché + lymphocyte à cytoplasme chevelu : atypique

Le diagnostic de LLC ou SLPC est suspecté, à confirmer par une cytométrie en flux.
Cytométrie faite sur sang périphérique : Matutes = 3 : avec expression forte du CD79b fort et des chaînes légères K fort.

Le diagnostic de LLC est retenu vu l'absence des marqueurs des autres SLPC.

Stade C de Binet sur la présence de l'anémie à 6,6 g/dl

FISH : présence d'une trisomie 12 à 54% des noyaux et des mitoses

Patient a développé une tuberculose pulmonaire une année après la fin de sa chimiothérapie puis perdu de vue.

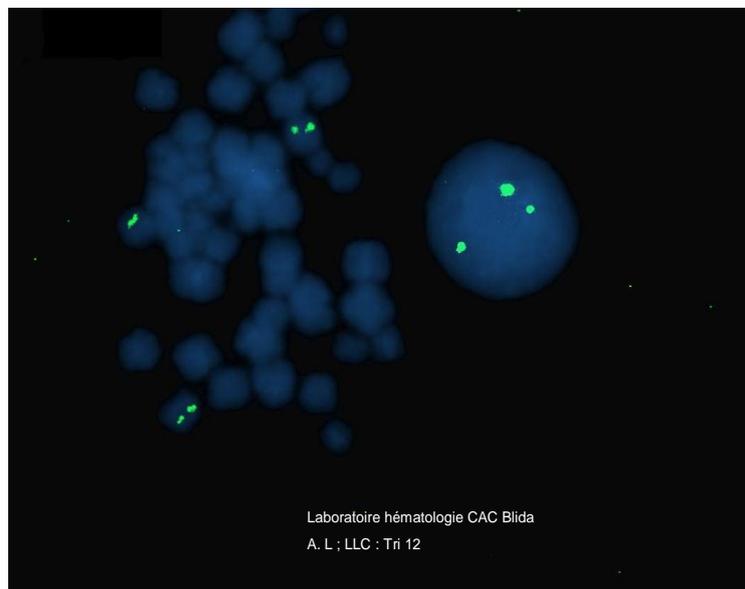


Figure 31 : Trisomie 12 sur mitose et noyau

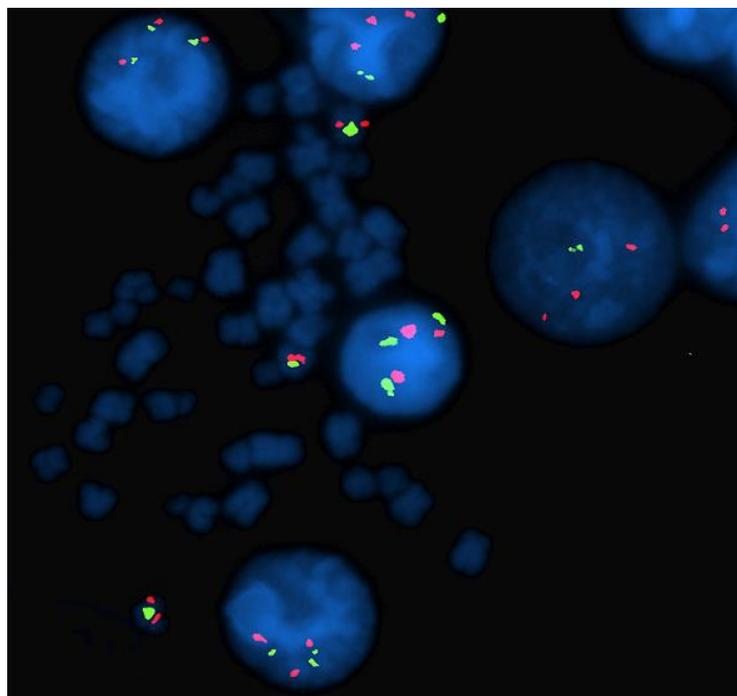


Figure 32 : Trisomie 12 sur mitose et noyaux (Sonde centromère 12/MDM2)

III.1.4.4. Cas n° 4 : Del ATM isolée

Femme de 76 ans originaire de Chlef, sans profession, hypertendue et diabétique, ses deux filles ont eu des cancers solides (sein et colon).

Pendant 7 mois, elle a présenté des adénopathies qui augmentaient de volume avec une difficulté à avaler son alimentation.

➤ **Consultation** : adénopathies généralisées 4 cm de diamètre et une hypertrophie amygdalienne bilatérales importante

➤ **Hémogramme** : hyperleucocytose = 29800/ μ l, Hyper lymphocytose = 21500/ μ l
Hb = 13,7 g/dl, plaquettes = 227000/ μ l

➤ **Frottis sanguin** : petits lymphocytes matures à 75% : typique

Au total : forte suspicion de LLC

➤ **Cytométrie en flux** : Matutes = 5

Stade B de Binet avec forte masse tumorale

➤ **FISH** : del ATM à 50% des noyaux et des mitoses

La patiente a développé deux années après sa chimiothérapie un carcinome papillaire de la thyroïde traité par ira thérapie.

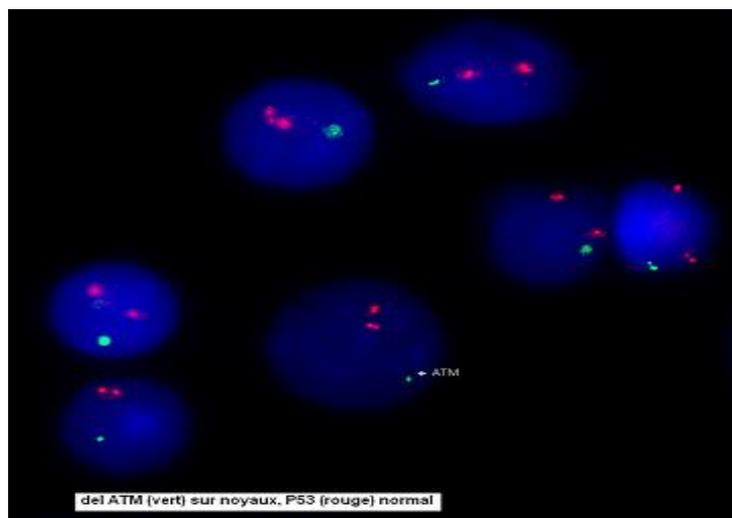


Figure 33 : del ATM sur noyaux

III.1.4.5. Cas 5 : Del P53 isolée

F. A homme de 66 ans, originaire de Blida, fonctionnaire, aux antécédents d'Infarctus du myocarde, présente des adénopathies depuis 5 mois.

Consultation : adénopathies généralisées à 3 cm de diamètre avec splénomégalie,

➤ **Hémogramme**

Hyperleucocytose 39700/ μ l, Hyperlymphocytose 37300/ μ l

Hb = 12,2 g/gl, Plaquettes = 199000/ μ l

➤ **Frottis sanguin** = petits lymphocytes matures 94% : typique

Au total : forte suspicion d'une LLC

➤ **Matutes** = 4

Stade de Binet : B

➤ **FISH** : del P53 isolée à 79% des noyaux

Décédé en échec thérapeutique à 14 mois du diagnostic

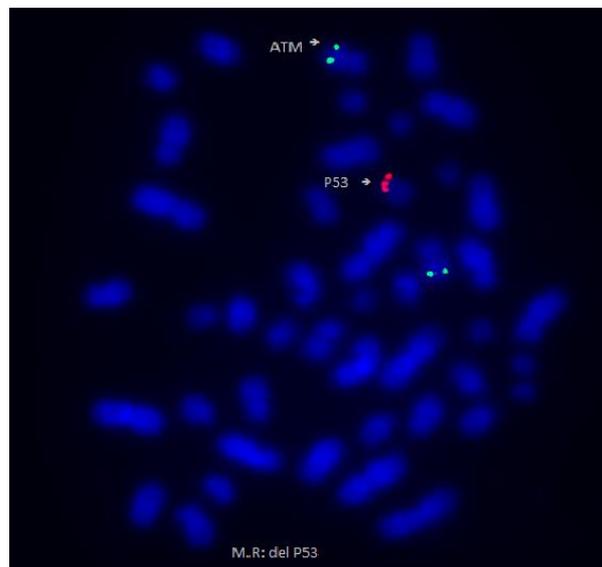


Figure n° 34 : del P53 isolée sur mitose

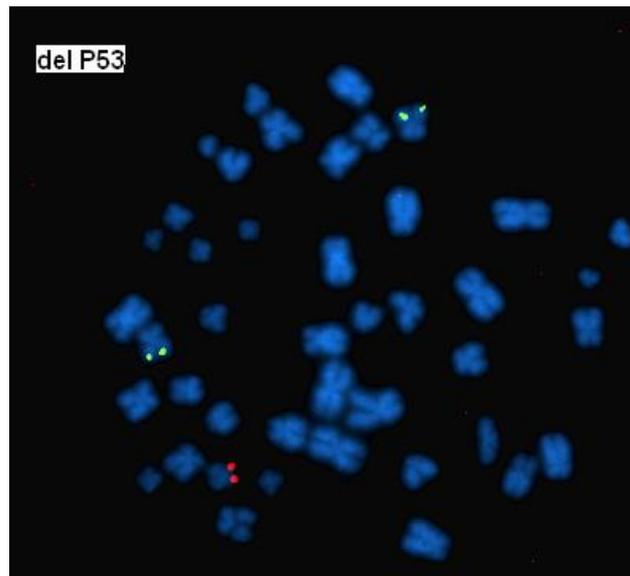


Figure n° 35 : del P53 isolée sur mitose

III.1.4.6. Cas n° 6 : Anomalies complexes

B. B homme de 58 ans originaire de Médéa, soudeur, présente depuis 3 mois des adénopathies.

➤ **Consultation**

Adénopathies généralisées, les plus volumineuses au niveau cervical à 10/8 cm de diamètre.

➤ **Hémogramme**

Hyperleucocytose à 13500/ μ l, Hyper lymphocytose à 9000/ μ l, Hb = 14,2 g/dl, Plaquettes = 91000/ μ l

➤ **Frottis Sanguin** : 62% de petits lymphocytes matures : typique

Suspicion de LLC forme tumorale ou lymphome non hodgkinien

➤ **Cytométrie en flux** : Matutes 4

➤ **FISH** : del P53 = 35%, del ATM = 69%, del 13q14 74% = complexe à 3 anomalies

Le patient est à sa troisième rechute en 4 ans d'évolution, traité par immunochimiothérapie car la thérapie ciblée Anti BTK ou anti BCL2 n'est pas disponible en Algérie à ce jour.

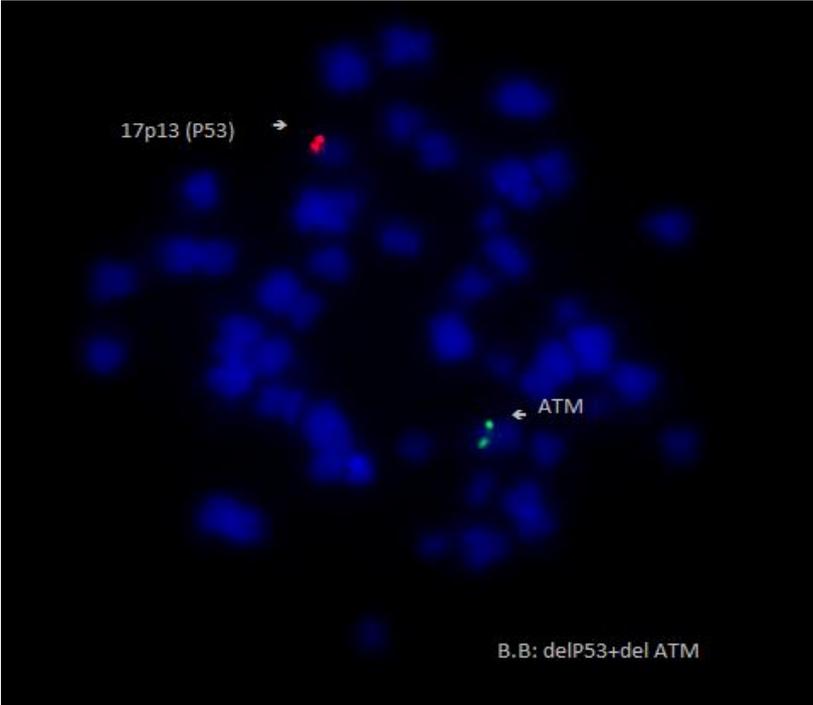


Figure 36 : Anomalies complexes (del ATM + del P53)

Chapitre IV

Discussion

IV. Discussion

Sur l'échantillon de patients atteints de LLC étudiés, la prédominance masculine est nette avec un **Sexe ratio à 3,7** ; nos données rejoignent celles de la littérature avec un sex ratio > 2 dans plusieurs études (**Yamamoto et Goodman, 2008**)

L'âge moyen au diagnostic est de 65 ans, celui de l'étude national est de 67,2 ans. L'âge moyen de notre population est plus jeune que celui rapporté dans les grandes séries de la littérature (72 ans aux USA et 72 en Europe). (**Yamamoto et Goodman, 2008**). Ceci est probablement dû à l'architecture démographique de notre population ; la pyramide des âges de notre population est encore nettement décalée vers la gauche.

Concernant **l'origine géographique** des patients ; les régions de recrutement les plus importantes restent Blida, Ain Defla et Chlef (régions agricoles par excellence)

Dans l'étude nationale présentée en 2015, la région sanitaire de Blida occupait la 3^{ème} place dans la région centre après Alger et Tizi Ouzou.

Les professions qui dominent sont l'agriculture et la maçonnerie ; un cas d'exposition au benzène (Sonatrach) et aux toxiques chimiques comme la soudure ont été rapportés (**Hagmar et al., 1995**).

Dans la profession fonctionnaire nous avons regroupés les enseignants, les militaires et les agents de service ou de sécurité qui à priori n'ont pas d'exposition particulière à un toxique.

La présence de **cancers familiaux** est marquée dans cet échantillon de patients (18,6%), et concerne des liens de premier degré (parents, enfants ou frères et sœurs)

Il s'agit en majorité de cancers solides : sein chez les femmes et digestifs chez les hommes.

Un fait important à noter ; concernant les hémopathies familiales relevées : toutes concernent des pathologies du lymphocyte B à différents stades de maturation (LALB, LLC et MM).

Le délai diagnostic est long de 6,7 mois avec un maximum de 4 ans attestant d'un retard diagnostique considérable, expliquant que le motif de consultation dominant est représenté par le syndrome tumoral dans plus de 60% des cas.

Ce retard diagnostique est aussi traduit par la présence de stades de Binet avancés B et C dans près de 80% des cas. Cet état est différent des LLC recrutées en occident qui sont représentées dans près de la moitié des cas par des stades A. **(Dohner et al ., 2000)**

Tous les patients ont bénéficié en plus de l'hémogramme et du frottis sanguin, d'une étude par cytométrie en flux, ce qui assure un diagnostic de certitude de cette affection.

Notons une cytologie atypique chez 8 pts (18,6%), et un score de Matutes à 3 chez 5 patients (11,6%) ce qui rejoint la littérature. **(Matutes et al .,1996)**

Quatre patients/5 avec un score de Matutes à 3 ont une cytologie atypique, ce qui est rapporté dans la littérature. **(Matutes et al ., 1994)**

Concernant les anomalies cytogénétiques : tableau IX

Il n'a pas été retrouvé d'anomalies cytogénétiques ciblées dans 21% des cas étudiés. Ceci est en accord avec les données de la littérature **(Glassman et al ., 2005) (Donher et al ., 2000)**

Le nombre d'anomalies cytogénétiques récurrentes retrouvées par FISH représente 79%, rejoint celles relevées dans la littérature (64% à 82%). **(Glassman et al ., 2005) (Donher et al .,2000)**

Tableau VII: Comparaison des résultats de notre étude FISH avec la littérature.

Références	Anomalies	del 13q	Tri 12	del ATM	del P53
Notre série : 43 pts	79 %	46,5 %	23,2 %	23,2 %	13,9 %
DohnerH : 325 pts	82 %	55 %	16 %	18 %	7 %
Qiu HX: 143 pts	72,7 %	47,6 %	21,7 %	11,9 %	12,6 %
GlassmanAB : 100 pts	64 %	44 %	11 %	23 %	12 %
AounP: 72 pts	72 %	46 %	21 %	7 %	3 %

La proportion de délétion 13q14 représente 46,5%, ce qui rejoint celle de la littérature (44% à 63%) **(Glassman et al ., 2005) (Dohner et al ., 2000) (Qiu et al ., 2008) (Aoun et al ., 2004)**. Lorsqu'elle est isolée , elle est reconnue comme étant de bon pronostic.

Le clone délété s'étale de 22% à 99% des noyaux, avec seulement 2 patients avec plus de 80% de noyaux délétés, ce taux est reconnu comme élément pronostique négatif. **(Hernandez et al .,2009)**.

L'âge moyen au diagnostic dans la catégorie del 13q14 isolée est de 72 ans, plus important que l'âge moyen de tout l'échantillon. Cela est expliqué par le fait La LLC avec del 13q14 est Particulièrement indolente et de ce fait ne s'exprime que tard dans la vie d'un patient. (**Guarini et al ., 2003**)

Le délai diagnostique dans cette catégorie est de 9 mois, un peu plus long que le délai moyen de l'échantillon

Tous les patients avec 13q14 ont une cytologie typique et un score de Matutes ≥ 4 , ce qui rejoint la littérature (**Guarini et al ., 2003**)

La trisomie 12 est retrouvée dans 10 cas (23,2%), rejoint la littérature (11% à 25% (**Glassman et al ., 2005 ; Dohner et al ., 2000 ; Qiu et al ., 2008 ; Aoun et al ., 2004**)).

Elle est isolée dans 7 cas, l'âge moyen au diagnostic dans cette catégorie est de 65 ans, avec un délai moyen de diagnostic de 4 mois plus court que la moyenne de l'échantillon total.

Le clone de trisomie s'étend de 21% à 81% des noyaux.

La moitié des cas (5/10) présente un Matutes à 3 et une cytologie atypique, corrélé aux données relevées dans la littérature (**Matutes et al ., 1996**)

On retrouve dans ce groupe un seul stade A, les 9 qui restent sont des stades B et C, ce qui permet de dire que cette anomalie est survenue dans les stades évolutifs de la maladie.

La del ATM reconnue de mauvais pronostic, se voit dans les formes tumorales ; elle est survenue dans notre échantillon dans 10 cas (23,2%). Elle est isolée dans 4 cas.

Cette fréquence est légèrement plus élevée que dans la littérature (6% à 20) (**Glassman et al ., 2005 ; Dohner et al ., 2000 ; Qiu et al ., 2008 ; Aoun et al ., 2004**) et ceci est expliqué par l'importance des patients présentant un syndrome tumoral (79,9%) dans notre échantillon, due au retard diagnostique.

L'âge moyen au diagnostic dans cette catégorie est plus jeune (59 ans), avec 20% qui ont moins de 50 ans ; ce qui a été décrit dans la littérature (**Reddy et al ., 2006**)

Le délai diagnostique est de 8,6 mois, plus long que la moyenne de l'échantillon.

Tous les cas avaient une cytologie typique et un Matutes ≥ 4 . La moitié exprime un CD38 positive souvent rapporté par la littérature.

Dans ce groupe on a 2 stades A qui ont rapidement progressés en B, 5 stades B et 2 stades C : elle est survenue dans 80 % des cas dans les stades évolutifs.

La délétion P53 est survenue dans 6 cas (13,9%) dont 2 isolées, taux élevé par rapport à la littérature (7 à 12%) (**Glassman et al .,2005 ; Dohner et al ., 2000 ; Qiu et al ., 2008 ; Aoun et al .,2004**).

Elle est associée à une trisomie 12 dans un cas, à une del 13q14 dans 2 cas et dans le cadre d'une anomalie complexe dans un cas.

Le taux élevé de la delP53 est expliqué par l'importance des stades avancés B et C dans cet échantillon

Toutes les delP53 sont survenues aux stades B et C (3/3) ; aucun stade A dans ce groupe, attestant que cette anomalie est de mauvais pronostic et souvent elle survient tard dans l'évolution.

L'âge moyen est 65,5 ans, le délai diagnostique est allongé (7 mois). 2/6 ont une cytologie atypique, par contre tous ont un Matutes ≥ 4

Le clone de délétion s'étalait de 35% à 87% des noyaux.

Chapitre V

Conclusion générale

Conclusion générale

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une hémopathie maligne dont le pronostic est évalué par une étude cytogénétique ciblée, l'hybridation in situ par fluorescence (FISH) qui a un rôle primordial dans la stratification des anomalies récurrentes et un impact sur l'indication thérapeutique dans cette pathologie.

Les anomalies cytogénétiques sont des facteurs pronostiques importants et indépendants de la progression et de la survie dans cette pathologie.

Elles aident à indiquer une stratégie thérapeutique adaptée selon les groupes à risque.

Nous avons entrepris une étude de la LLC au plateau technique de cytogénétique hématologique au laboratoire d'hématologie de l'EHS ELCC, CAC Blida, dont les objectifs étaient :

1- De nous initier à l'Hybridation In Situ Fluorescente (FISH) et de réaliser durant notre stage une étude cytogénétique en ciblant quatre anomalies récurrentes dans la LLC.

2- De préciser la répartition de ces anomalies dans une cohorte de patients du centre-ouest Algérien dans la LLC.

Au terme de notre stage, ces objectifs techniques du stage pratique ont été atteints par la maîtrise de la technologie (FISH).

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

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

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

Dans l'étude qui a été menée, il ressort deux arguments importants : la fréquence des anomalies récurrentes rejoint celle de la littérature. (79% vs > 64 à 82%) et la fréquence élevée des délétions ATM et P53 dans notre population.

Cela a une implication importante, vu que leur pronostic est mauvais, il est nécessaire de disposer de médicaments innovants ciblés pour les traiter convenablement dans notre pays.

Chapitre VI

Références bibliographiques

Aguilar-Santelises M, Rottenberg ME, Lewin N, Mellstedt H, Jondal M. (1996). Bcl-2, Bax and p53 expression in B-CLL in relation to in vitro survival and clinical progression. *Int J Cancer*; 69(2): p114-119.

Aoun P, Blair HE, Smith LM, et al. Fluorescence in situ Hybridization detection of cytogenetic abnormalities in B-CLL/ Small Lymphocytic lymphoma. *Leukemia and lymphoma*, August 2004; 45:1595-1603.

Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitch MJ, Lebeau MM, Bloomfield CD, Cazolla M, Vardiman JW. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127 (20): p2391-2405.

Bay JO, Uhrhammer N, Hall J, Stoppa-Lyonnet D, Bignon Y-J. (1999). Fonctions de la protéine ATM et aspects phénotypiques de l'ataxie-télangiectasie. *Médecine/science*, 15 : p1086-1095.

Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguet H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Thomas M, Tchernia G, Jacquilat C, Boivin P, Lesty C, Duault M T, Monconduit M, Bellabes S, Gremy F. (1981). A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, 48 (1): p198-206.

Brochet X. (2008). Conception et intégration d'un système d'information dédié à l'analyse et à la gestion des séquences réarrangées des récepteurs d'antigènes au sein d'imgt® : Application à la leucémie lymphoïde chronique. Thèse de Doctorat en Bioinformatique. Université de Montpellier 1. France. p 228.

Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ. (2000). Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood*, 96(8): p2655-2663.

Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri SA, Stein H, Jaffe ES. (2011). The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*; 117(19): p5019–5033.

Chauzeix J. (2018). Impact des anomalies moléculaires dans l'histoire naturelle de la leucémie lymphoïde chronique. Thèse de Médecine 309 pages. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02405662>.

Chu CC, Catera R, Hatzi K, Yan XJ, Zhang L, Wang XB.(2008). Chronic lymphocytic leukemia antibodies with a common stereotypic rearrangement recognize non muscle myosin heavy chain IIA. *Blood*, 112(13): p5122-5129.

Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M.(2005). MiR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(39): p13944- 13949.

Corcoran MM, Rasool O, Liu Y, Lyengar A, Grandeur D, Ibbotson R E, WU X, Brodyansky Gardiner AC, Juliusson G, Einhorn S.(1998). Detailed molecular delineation of 13q14.3 loss in B-Cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 91: p1382-1390.

Cosson A. (2015). Caractérisation d'anomalies cytogénétiques et moléculaires dans la Leucémie lymphoïde chronique. Thèse de doctorat en Physiologie et Physiopathologie. Université pierre et marie curie. France. 167 pages

Crombie J, Davids M. (2017). IGVH mutational status testing in chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol*, 92 (12): p1393-1397.

Dali. N et al.(2015). Approche épidémiologique de la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) en Algérie. Travail coopératif et multicentrique sur 1210 cas (2009-2013). XII^{ème} congrès Maghrébin d'Hématologie. Tunisie.

De Leeuw N Trijnie Dijkhuizen2, Jayne Y. Hehir-Kwa1, Nigel P. Carter3, Lars Feuk4, Helen V. Firth3,5, Robert M. Kuhn6, David H. Ledbetter7, Christa Lese Martin8, Conny M. A. van Ravenswaaij-Arts2, Steven W. Scherer9,10, Soheil Shams11, Steven Van Vooren12, Rolf Sijmons2, Morris Swertz2, and Ros Hastings. Diagnostic Interpretation of Array Data Using Public Databases and Internet Source *Hum Muta* 13(2012) ; 33(6): 930–940.

Dembla V, Somaiah N, Barata P, Hess K, Fu S, Janku F, Karp DD, Naing A, Piha-Paul SA, Subbiah V, Tsimberidou AM, Shaw K, Meric-Bernstam F, Hong DS.(2018). Prevalence of MDM2 amplification and coalterations in 523 patients advanced cancer patients in the MD Anderson Phase 1 Clinic. *Oncotarget*, 9(69): p33232-33243.

Dicker F, Schnittger S, Haferlach T, Kern W.(2006). Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: a study of 132 cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression. *Blood*, 108: p3152-3160.

Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Dohner K, Bentz M, Lichter P. (2000). Genomic Aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 343: p1910-1916.

Gahrton G, Juliusson G, Robert K H, Friberg K.(1987). Role of chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev*, 1(3): p183-92.

Glassman Armand, Kimberly J Hayes. (2005). The value of fluorescence in situ hybridization in the diagnosis of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 158(1): 88-91.

Guarini A, Marinelli M, Tavolaro S, Bellacchio E, Magliozzi M, Chiaretti S, De Propris MS, Peragine N, Santangelo S, Paoloni F, Nanni M, Del Giudis I, Mauro FR, Torrente I, Foa R.(2012). ATM gene alterations in chronic lymphocytic leukemia patients induce a distinct gene expression profile and predict disease progression. *Haematologica*, 97(1): 47-55.

Hagmar Lars, Zoli Mikoczy, Hans Welinder.(1995). Cancer incidence in Swedish sterilant workers exposed to ethylene oxide. *Occupational and Environmental Medicine*, 52:154-156.

Hendriks Rudi W., Saravanan Yuvaraj and Laurens P. Kil.(2014). Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies *NATURE REVIEWS CANCER*, 14 : 219-232

Cours (http://campus.cerimes.fr/hematologie/enseignement/hematologie_163/site/html/1.html)

Hernandez JA, Rodriguez AE, Gonzalez M, Benito R, Fontanillo C, Sandoval C, Romero M, Martin-Nunez G, De Coca A G, De Las Viras G. (2009). A high number of losses in 13q14 chromosome band is associated with worse outcome and biological differences in patients with B-cell chronic lymphoid leukemia. *Haematologica*, 94: p364-371.

Kikushige Y, Miyamoto T, Akashi K. (2010). Hematopoietic stem cells are primarily involved in pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Rinsho Ketsueki the Japanese journal of clinical hematology*, 51(8): p679-684.

Kodelja V, Müller C, Politz O, Hakij N, Orfanos CE, Goerdt S. (1998). Alternative macrophage activation associated CC-chemokine-1, a novel structural homologue of macrophage inflammatory protein-1 alpha with a Th2-associated expression pattern. *J Immunol*, 160(3): p1411- 1418.

Law PJ, Houston RS.(2019). Genetic predisposition to chronic lymphocytic leukemia. *HemaSphere Educational Update in hematology Book*, 3 (S2): p37-39.

Leblanc V, May P.(2002). Activation et modifications post-traductionnelles de p53 après dommage de l'ADN. *Medecine/science*, 18 : p577-584.

Marchenko ND, Wolff S, Erster S, Becker K, Moll UM. (2007). Mono-ubiquitylation promotes mitochondrial P53 translocation. *The EMBO Journal*, 26 (4): p923-934.

Matutes E, Oscier D, Garcia Marco JGJ. (1996). Trisomy 12 defines a group of CLL with atypical morphology : correlation between cytogenetique, clinical and laboratory features in 544 patients. *Br J Haematol*, 92: p382-388.

Matutes E, Owusu-Ankomah K, Morilla R, Marco JG, Houlihan A, Que TH, Catovsky D. (1994). The immunological profile of B-cell disorders and proposal of a scoring system for the diagnosis of CLL. *Leukemia*, 8(10): p1640–1645.

Matutes E, Polliack A.(2000). Morphological and immunophenotypic features of chronic lymphocytic leukemia. *Rev Clin ExpHematol*, 4: p22-47.

May P. May E. Rôles de P53 dans le cycle cellulaire, l'apoptose et le cancer. *RFL*.1999; 311: 35-42.

Mian M, Rinaldi A, Mensah A, Rossi D, Ladetto M, Forconi F, Marasca R, Bertoni F. (2013). Large genomic aberrations detected by SNP array are independent prognosticators of a shorter time to first treatment in chronic lymphocytic leukemia patients with normal FISH. *Annals of Oncology*, 24: p1378-1384.

Montillo. M, Hamblin. T, Hallek. M, Montserrat. E, Morra. E. (2005). Chronic lymphocytic leukemia: novel prognostic factors and their relevance for risk-adapted therapeutic strategies. *Haematologica*; 90(3): 391-399.

Montserrat E, Sanchez-Bisono J, Vinolas N, Rozman C. (1986). Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia: analysis of it's prognostic significance. *Br J Haematol*, 62: p567-575.

Moreau EJ, Matutes E, A'Hern R, Morilla RM, Owusu-Ankomah KA, Seon BK, Catovsky D. (1997). Improvement of the chronic lymphocytic leukemia scoring system with the monoclonal antibody SN8 (CD79b). *Am. J. Clin. Pathol*, 108 (4): p378–382.

Nguyen-Khac F, Borie C, Callet-Bauchu E, Eclache V, Strutski S. (2016). Place de la cytogénétique dans la prise en charge de la leucémie lymphoïde chronique : actualisation du groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH). *F. Ann Biol Clin*, 74 (5) : p561-567.

Ning-Bo H, Lu MH, Fan Y-H, Cao Y-L, Ren-Zhang Z et Yang SM. (2012). “Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors.” *Clinical and Developmental Immunology*. Vol 2012 ;11p

Panagiotis B, Jeromin S, Iskas M, Puiggros A, Plevova K, Nguyen-Khac F, Haferlach C, Stamatopoulos K.(2019). Cytogenetic complexity in Chronic Lymphocytic Leukemia: definitions, associations, and clinical impact. *Blood*, 133 (11): p1205-1216.

Pekarsky Y, Balotti V, Croce CM.(2018). BCL2 and miR-15/16: from gene discovery to treatment. *National Library of Medicine, Cell Death Differ*, 25 (1): p21-26.

Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N. (2011). Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, 475(7354): p101-105.

Puiggros A, Blanco G, Espiret B. (2014). Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: where we are and where we go. *Bio Med Research International, Biomed Res Int* 2014: 1-13.

Puiggros A, Collado R, Calasanz MJ, Ortega M, Ruiz-.Xiville N, Alfredo R-D, Luno E, Gonzalez T, Espinet B. (2017). Patients with chronic lymphocytic leukemia and complexe karyotype show an adverse outcome even in absence of TP53/ATM FISH deletions. *Oncotarget*; 8 (33): p54297-54303.

Qiu HX, Wei Xu, Cao XS, Zhou M, Shen YF, Xu YL.Cytogenetic characterisation in Chinese patients with chronic lymphocytic leukemia: A prospective, multicenter study on 143 cases analysed with interphase fluorescence in situ hybridisation. *Leukemia& lymphoma*. 2008; 49:

Rai KR, Sawitsky A, Crokite G, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. (1975). Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 46: p219-234.

Rampazzo E, Bonaldi L, Trentin L, Visco C, Keppel S, Giunco S.(2012). Telomere length and telomerase levels delineate subgroups of B-cell chronic lymphocytic leukemia with different biological characteristics and clinical outcomes. *Haematologica*, 97(1): p56-63.

Rebora P, Lee M, Czene K, Valsecchi MG, Reilly M. (2012). High risks of familial CLL for specific relatives: signposts for genetic discovery? *Leukemia*, 26(11) : p2419-2421.

Riscal R. L'oncogène Mdm2 : nouvelles fonctions et implications dans le métabolisme des cellules cancéreuses *MolecularCell*. 2016 ; 62 : 890–902 .

Reddy KS. (2006). CLL profiled for prognosis using a fluorescence in situ hybridisation panel. *Br J Haematol*, 132 : p705-722.

Robert J. (2010). Bases biologiques de la cancerologie. Signalisation cellulaire et cancer. **Livre LavoisierMédecine Sciences.**

Roos-Weil D, Nguyen-Khac F, Chevret Y, Roux C, Touzeau C, Cosson A, Cymbalista F, Feugier P, Lepretre S, Bene M-C, Raynaud S, Sutton L, Davi F, Leblond V. (2013). Mutational and cytogenetic analyses of 177 CLL patients with trisomy 12: A retrospective study of the CLL French intergroup. *Blood*, 122 (21): p4144.

Rosati E, Baldoni S, De Falco F, Del Papa B, Dorillo E, Rompietti C, Albi E, Falzetti F, Di Ianni M and Sportoletti P. (2018). NOTCH aberration in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Front Oncol*, 8: p229.

Rossi D, Rasi S, Spina V, Brusca A, Monti S, Ciardullo C, Deambrogi C, Gaidano G.(2013). Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 121(8): p1403-1412.

Rushton L, Schnatter AR, Tang G, Glass DC. (2014). Acute myeloid and chronic lymphoid leukaemias and exposure to low-level benzene among petroleum workers. *Br J Cancer* ; 110(3) : p783-787.

Sant M, Allemani C, Tereanu C, De Angelis R, Capocaccia R, Visser O, Marcos-Gragera R, Maynadié M, Simonetti A, Lutz JM, Berrino F. (2010). Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood*, 116: p3724.

Stockero KJ, Fink SR, Smoley SA, Paternoster SF, Tait DS, Timothy GC, Clive SZ, Van Dyke DL, Key NE, Dewald GW. (2006). Metaphase cells with normal G bands cryptic interstitial deletions in 13q14 detectable by fluorescence in situ hybridization in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 166: p152-156.

Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES. 2016. The 2016 revision of the World Health Organization Classification of lymphoid neoplasms. *Blood*, 127: p2375-2390.

Soussi.T (2000). Cycle cellulaire et apoptose : Le gène suppresseur de tumeur P53. *Medecine/science*, 16: p469-472.

Troussard X.(1999). Les Syndromes Lymphoprolifératifs Chroniques. *La Lettre du Cancérologue* - volume VIII - n° 1.

Walid D, Krabchi K, Gadj M, Lavoie J, Bronsard M, Fetni R. (2006). Activité dominante négative des protéines p53 mutées. et Regen Drouin. *Med Sci (Paris)*, 22 : p301-307.

Wan L, Wu CJ. 2013; SF3B1 mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*; 123 (23): 4627-4634

Yamamoto JF, Goodman MT.(2008). Patterns of leukemia incidence in the United State by subtype and demographic characteristics, 1997-2002. *Cancer Control*, 19: p379.

Zhang W, Feng L, Pelicano H, Huang P. 2013. Resistance of chronic lymphocytic leukemia cells in apoptosis: key role of stromal cells in maintaining the redox potential of CLL cells. *Med Sci (Paris)*, 29: p36-38.

Annexes

1- Equipement pour la culture cellulaire

Hotte à flux laminaire.
Hotte chimique
Incubateur à CO₂.
Centrifugeuse.
Etuve sèche à 37°C.
Agitateur magnétique.
PH mètre.
Frigidaire à + 4° C
Congélateur à - 20° C

2 -Réactifs

Conservés à température ambiante :

Méthanol pur.
Acide acétique glacial.

Conservés à + 4° c :

RPMI avec ou sans glutamine 1640 Sigma
Colcémid 10µg/mlEurobio, Sigma.
KCL à 5,6 g/l (0,0075M)
Héparine lithium.

Conservés à – 20° c :

Sérum de veau fœtal.
L glutamine + pénicilline- streptomycine
DSP 30
Interleukine 2

Consommables

Tubes Falcon 20 ml
Flasques de culture à bouchon ventilé ou non.
Pipettes pasteur.
Pipettes en plastic de transfert de 15 ml.
Portoirs tubes Falcon
Lames superfrost
Plateaux inox.
Chronomètres.

Eprouvettes 100, 500 et 1000 ml.

Becher 1000 ml.

Pince.

Distributeur-doseurs.

3-Milieus et solutions à préparer

3-1-Milieu de culture (RPMI complet) : 400 ml de RPMI 1640 + 100 ml SVF + 1 ml

héparine lithium + 5 ml pénicilline-streptomycine-L glutamine.

A conserver à + 4°C.

3-2-IL2 : mettre le lyophilisat avec 2 ml d'eau distillée stérile, centrifuger une minute.

Aliquoter par 20 µl dans des tubes eppendorff ; conserver à -20°C.

3-3-DSP30 : mettre le lyophilisat avec 5 ml d'eau distillée, centrifuger une minute puis conserver par 10 µl dans des tubes eppendorff, conserver à - 20°C.

3-4 -KCl : dissoudre 5,6 g dans un litre d'eau distillée. Conserver à + 4° C.

Préchauffer à 37° C avant emploi.

3-5 -Fixateur : mélanger 3 volumes de Méthanol + 1 volume d'acide acétique.

Conservation TA.

Consommables

- Bacs à lames en porcelaine avec couvercle.
- Lames superfrost et lamelles 24 x 60 mm ou 22 x 22 mm.
- Graveur diamant
- PH mètre.
- Portoirs pour lames en verre.
- Eprouvettes.
- Pipettes de précision : 10, 100, 200, 500, et 1000 µl et pipette réglable de 2 à 10 µl et 10 µl à 100 µL
- Carton range lame avec rabat.
- Para film

4-Equipements pour la FISH

- En plus du matériel nécessaire à la mise et sortie de culture, on aura besoin de :
- Etuve à 37°C sèche.
- Bain marie à 37°C et 72°C.
- Balance de précision.
- Agitateur magnétique
- Thermobrite (chambre humide avec plaque chauffante réglable pour dénaturation et hybridation)

- Microscope à fluorescence muni de filtres appropriés à chaque fluorochrome et un filtre triple bandes (DAPI/FITC/Rhodamine) pour lire en multicolore :
- Logiciel pour le traitement d'images et l'archivage : Metasystems.

5- Réactifs

5.1 Réactifs : Conservation à température ambiante

- 20 SSC (VWR)
- Ethanol à 70%, 85% et 100%.
- Igepal.
- Tween 20
- Eau distillée.
- Huile pour microscope.

5.2 Réactifs : Conservés à + 4°C : Le DAPI.

5.3 Réactifs à conserver à -20°C

Les sondes (Cytocell)

6- Solutions de travail : à préparer

6-1- 2 SSC : reconstituer 100 ml de 20 SSC + 900 ml d'eau distillée.

6-2- 0,3 Igepal : mettre 1,5 ml Igepal + 475 ml eau distillée, dans un bécher ; mélanger à l'aide d'un aimant sur l'agitateur magnétique ; ajuster le PH entre 7 et 7,5. Cette solution se conserve 6 mois à +4°C.

6-3- 0,1 Igepal : mettre 1 ml Igepal + 850 ml eau distillée ; mélanger avec un aimant sur un agitateur magnétique ; ajuster le PH entre 7 et 7,5. Cette solution se conserve 6 mois à température ambiante.

6-4- Tween 20 : 500 µl de Tween + 20 SSC : 100 ml ; compléter à 1000 ml par l'eau distillée

6-5- Ethanol 100% : verser 200 ml d'éthanol pur

6-6- Ethanol 75% : 30 ml éthanol, compléter à 200 ml avec de l'eau distillée.

6-7- Ethanol 80% : 40 ml éthanol, compléter à 200 ml avec de l'eau distillée.



Figure 37 : Le microscope à fluorescence