



Année Universitaire : 2012- 2013



Master Sciences et Techniques : Biotechnologie microbienne  
**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**  
Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

**LE CHROMOSOME PHILADELPHIE aspects  
cytogénétique et moléculaire**

**Présenté par: Samba Ndoucoumane NDIAYE**

**Encadré par: Pr OULDIM (CHU Hassan II)**

**Pr HAGGOURD (FST Fès)**

**Soutenu Le 19 Juin 2013 devant le jury composé de:**

- Pr. A. HAGGOURD (FST Fès)
- Pr. K. OULDIM (CHU Fès et Faculté de médecine)
- Pr. S. BENNIS (CHU Fès et Faculté de médecine)
- Pr. S. GUISSI (FST Fès)
- Pr. M.H. IRAQUI (FST Fès)

**Lieu du stage : Laboratoire de génétique médicale et oncogénétique  
(CHU Hassan II, Fès)**



## TABLE DES MATIERES

**REMERCIEMENT**  
**PRESENTATION DU LIEU DU STAGE**  
**LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS**  
**TABLE DES ILLUSTRATIONS**

### SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE :

**I. Préambule.....2**  
**II. Introduction générale.....4**  
**III. Historique.....6**  
**IV. Les anomalies chromosomiques :**  
    A. Les anomalies de nombres.....9  
    B. Les translocations chromosomiques.....10  
    C. Les origines des translocations.....10  
    D. Intérêt de la recherche de la translocation chromosomique.....11  
        1. Intérêt dans la prise en charge des patients .....11  
        2. Intérêt scientifique.....13  
    E. Les protéines tyrosines kinases.....13  
        1. Structure des TIK cytoplasmiques.....13  
        2. Activation des TIK cytoplasmiques.....14  
    F. Translocations chromosomiques et tyrosines kinases.....15  
**V. Les syndromes myéloprolifératifs.....15**  
**VI. Épidémiologie de Leucémie myéloïde chronique.....15**  
    1. Fréquence.....15  
    2. Sexe .....16  
    3. Age.....16  
**VII. Les facteurs de risque la leucémie myéloïde chronique .....17**  
    A. Les radiations ionisantes.....16  
    B. Les facteurs non ionisants.....16  
        1. Benzène et solvants organiques.....17  
        2. Les immunosuppresseurs.....17  
**VIII. Physiopathologie de la translocation t (9 ;22) (q34 ;q11) :**  
    A. Les gènes impliqués dans la translocation.....19  
        1. Le gène *ABL* et sa protéine.....19  
        2. Le gène *BCR* et sa protéine.....20  
        3. Le gène *BCR-ABL* et la protéine de fusion.....21  
        4. Voies de signalisations intracellulaires conduisant à la leucémogénèse.....22  
    B. Les mécanismes d'action de la protéine de fusion.....22  
        1. Altération des propriétés d'adhésions induites par la protéine *BCR-ABL*  
            dérégulé.....22  
        2. Activation des signaux mitotiques .....23  
        3. Inhibition de l'apoptose.....23



---

4. Dégradation de la protéine par les protéasomes.....	23
5. Instabilité génomique ou génétique.....	24
D. Autres gènes et mécanismes potentiellement impliqués dans la LMC.....	25
1. Le protooncogène <i>C-MYC</i> .....	25
2. le gène <i>P53</i> .....	26
3. L'oncogène <i>BCL-2</i> .....	26
4. Le protooncogène <i>C-MYB</i> .....	26
5. Le gène <i>AXL</i> .....	27

## IX. Diagnostic :

A. Anomalies hématologiques orientant le diagnostic.....	28
1. hémogramme.....	28
2. Myélogramme.....	28
3. Examens nécessaires au diagnostic.....	29
B. Diagnostic différentiel.....	29
1. lors de la phase chronique.....	29
2. Lors de la phase aiguë.....	30
C. Apports récents de la biologie moléculaire et de la cytogénétique .....	31
1. Étude cytogénétiques et moléculaires au diagnostic .....	31
2. LMC Ph négatives.....	32
3. Transcrits atypiques et LMC.....	32
4. Transcrits <i>BCR-ABL</i> et sujets normaux.....	33

## X. Aspect clinique et biologique de la leucémie myéloïde chronique :

A. Signes cliniques.....	33
B. Signes biologiques .....	35

## XI. Les facteurs pronostiques.....36

## XII. Traitements de la LMC :

A. Traitement de première ligne : imatinib.....	37
1. Mécanisme d'action de l'imatinib.....	38
B. Surveillance des patients : critères de réponse.....	39
C. Résistances à l'imatinib : raisons et solutions possibles.....	40
D. Les complications liées au traitement.....	44

## MATERIEL ET METHODES :

### I. Matériel :

A. Patients.....	44
1. Prélèvement sanguin.....	44
2. Prélèvement médullaire.....	44
B. Milieu de culture.....	44

### II Méthode :



---

A. Analyse cytogénétique.....	45
1. Stérilisation.....	45
B. Milieu de culture.....	45
C. Caryotype par bande R.....	45
1. principe.....	45
2. Réactif nécessaire.....	46
3. Protocole expérimental.....	46
D. Hybridation in situ fluorescente(FISH) .....	49
1. Principe.....	49
2. Réactifs nécessaires.....	50

## RÉSULTATS :

### I- Description de tous les résultats des patients présentant la LMC :

A. Données épidémiologiques.....	56
1. Répartition du nombre de cas en fonction du sexe.....	56
2. Répartition du nombre de cas en fonction de l'âge.....	57
3. Répartition du nombre de cas par sexe en fonction des tranches d'âge...	58
B. Les facteurs favorisant la LMC.....	59
C. Étude clinique.....	59
1. Splénomégalie.....	59
2. Adénopathies.....	59
3. Hépatomégalie.....	59
D. Étude para-clinique des signes biologiques.....	60
1. Hémogramme.....	60
2. Myélogramme.....	61
E. Les résultats de la cytogénétique classique : caryotype médullaire.....	62
F. Résultats de la cytogénétique moléculaire : FISH.....	67
G. Aspects thérapeutiques.....	70
1. Evaluation de l'efficacité du traitement.....	71

## DISCUSSION :

### CONCLUSION ET PERSPECTIVES

I. Conclusion générale.....	88
II. Perspectives.....	89

Annexes

Glossaire

Références bibliographiques



# SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE:

## I. Préambule:

La dérégulation de l'homéostasie hématopoïétique peut être à l'origine des hémopathies malignes (Hanhan et Weinberg, 2000; Sawyers et al., 1991). L'hématopoïèse dont le nom signifie «



formation du sang » est le processus par lequel l'organisme produit et renouvelle tous les éléments figurés du sang. Ce processus s'effectue au sein de la moelle osseuse par étapes successives. Toutes les cellules sanguines sont produites à partir d'une même cellule indifférenciée : la cellule souche hématopoïétique. Cette cellule a deux propriétés essentielles : l'auto-renouvellement et le pouvoir de différenciation. En réponse à un signal exogène, elle est capable de se différencier en globule rouge (ou hématie), en globule blanc (lignée myéloïde ou lymphoïde) ou en plaquettes (ou thrombocyte).

L'hématopoïèse nécessite un micro-environnement médullaire adapté à l'intervention de facteur de croissance tels que l'IL-7, l'EPO, le TPO ou le GM-CSF. Enfin, les cellules hématopoïétiques se différencient et déterminent leur lignage sous l'influence de facteurs de transcription tels que PAX-5 (Paired-box gene 5), PU-1 ou GATA-1. La perturbation de l'hématopoïèse peut donc être à l'origine d'une hémopathie maligne. Ce dysfonctionnement peut être consécutif à une expression inadaptée ou à des altérations structurales de certains gènes suite à des mutations ponctuelles ou à des anomalies de structures telles que les translocations chromosomiques. On entend par hémopathie maligne un groupe de pathologies regroupant les leucémies et les lymphomes.

Les lymphomes sont des hémopathies lymphoïdes caractérisées par une infiltration ganglionnaire ou extra-ganglionnaire, par des cellules lymphoïdes malignes et monoclonales issues soit de la lignée B (70% des cas) soit de la lignée T. La morphologie des cellules lymphomateuses et l'architecture de la prolifération définissent le type histologique du lymphome (exemple : lymphome de Burkitt, lymphome de Hodgkin) (DeVita et Canellos, 1999).

Parmi les leucémies, on distingue les leucémies aiguës des leucémies chroniques. Les leucémies aiguës sont caractérisées par un blocage de la maturation des cellules médullaires. Cette immaturité traduit une anomalie de la différenciation. De plus, les leucémies aiguës diffèrent des leucémies chroniques par leur rapidité évolutive spontanée. Les leucémies sont également classées selon le type cellulaire affecté et sont, le plus fréquemment, divisées en leucémies lymphoblastiques et myéloblastiques (Rabbitts, 1991).

Les hémopathies malignes sont classées en fonction de leur degré de sévérité et du stade de maturation représenté. Dans le cadre de notre étude nous allons détailler uniquement la leucémie myéloïde chronique qui fait partie du groupe des syndromes myéloprolifératifs (SMP).



## II. Introduction :

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est un syndrome myéloprolifératif rare dû à la prolifération clonale d'une cellule souche hématopoïétique, conduisant à une expansion principalement myéloïde (Sawlers, 1999). Elle évolue typiquement en trois phases : une phase chronique, une phase d'accélération, et une phase de leucémie aiguë ou crise blastique particulièrement rebelle aux traitements (Kantarjian, 1993).

Le diagnostic est souvent fait précocement sur un hémogramme systématique, ce qui permet une prise en charge rapide des patients. La LMC est caractérisée par un marqueur chromosomique spécifique : le chromosome Philadelphie (Ph) retrouvé dans les cellules médullaires de 90 à 95 % des malades (Virginie et Françoise, 2001).

Bien qu'une greffe allogénique de moelle osseuse soit considérée comme le seul traitement curatif disponible, le pronostic s'est considérablement amélioré grâce au développement de



l'imatinib mésylate. Il s'agit d'un inhibiteur compétitif de l'activité tyrosine kinase BCR-ABL ayant reçu l'autorisation européenne de mise sur le marché (AMM) en tant que médicament orphelin pour le traitement de la LMC en 2001 (Druker et al., 2006).

Les progrès cytogénétiques ont permis de caractériser précisément cette hémopathie, puisque Peter C. Nowell et Hungerford ont décrit, dès 1960, un chromosome de petite taille appelé : chromosome Philadelphie (Nowell, 1960). L'étude par banding a démontré que ce chromosome correspondait à un chromosome 22 raccourci sur son bras long et qu'il s'y associait systématiquement un gain sur le bras long du chromosome 9 (Rowley, 1973 ; Yunis, 1983).

Le gène néoformé est fonctionnel, puisqu'il est transcrit en acides ribonucléiques (ARN) messagers, eux-mêmes traduits en protéine BCR-ABL. Les différentes protéines de fusion BCR-ABL ont une activité tyrosine kinase plus ou moins importante (Lugo, 1990). La protéine de fusion de 210 kDa est majoritairement retrouvée chez des patients atteints de LMC, tandis que la protéine de fusion de 190 kDa est, le plus souvent, présente chez les patients atteints d'une leucémie aiguë lymphoblastique à chromosome Philadelphie (LAL Ph+).

La responsabilité directe de la translocation t(9;22) et de la protéine de fusion BCR-ABL de 210 kDa dans la leucémogénèse de la LMC a été démontrée secondairement par George Daley et al., qui ont reproduit chez la souris un syndrome myéloprolifératif évoluant vers une leucémie aiguë (Daley et al., 1990).

Ces avancées thérapeutiques récentes ont créé un besoin de techniques biologiques donnant des résultats fiables et reproductibles. Une évaluation quantitative de la maladie résiduelle est devenue indispensable.

Nous insisterons plus particulièrement sur les apports récents de la cytogénétique et de la biologie moléculaire dans le diagnostic de la LMC ainsi que pour le suivi des patients, puis nous évoquerons les nouvelles options thérapeutiques apparues ces dernières années seront évoquées.

Notre étude, rétrospective se fera sur 32 cas de LMC multicentrique recensés entre 2010 et 2012 associée à une étude prospective de 5 cas débutant du mois de janvier au mois de mai 2013. Les techniques de la cytogénétique classique (caryotype) et de la cytogénétique moléculaire (FISH) nous permettront de rechercher le chromosome Ph.





### III. Historique :

La LMC a été premièrement décrite par Hugues Bennett, un médecin d'Edinburgh qui pensait que la maladie était une infection (Bennett, 1845). Quelques semaines plus tard, Rudolf Virchow, qui a publié un cas similaire, a postulé que la maladie n'était pas infectieuse. Il a estimé que la cause de la maladie était une altération dans l'hématopoïèse et a inventé le terme descriptif « Weisses blut » ou « sang blanc » qui est devenu en allemand « Leukeamie » (Virchow, 1845). Le fait que les cellules leucémiques proviennent de la moelle osseuse a été reconnu par Neumann seulement en 1870 (Neumann, 1870). La prochaine étape importante dans l'histoire de la LMC s'est produite 100 ans plus tard. Au début des années 1960, et avec l'apparition de la cytogénétique, deux chercheurs de Philadelphie ; Peter Nowell (université de Pennsylvanie) et David Hungerford (Fox Chase Cancer Center) ont identifié un chromosome de petite taille dans les cellules tumorales des patients atteints de LMC, auquel ils ont donné le nom de la ville d'origine de sa découverte : **le chromosome Philadelphie** (Ph) (Nowell et Hungerford, 1960). Ce fut la première fois qu'une anomalie chromosomique a été associée à une maladie maligne. Ensuite, en 1973, Janet Rowley a reconnu que le chromosome Philadelphie était en effet le produit d'une translocation réciproque avec échange de matériel chromosomique entre les bras longs des chromosomes 9 et 22 (Rowley, 1973). En 1977, Fialkow et al., ont mis en évidence la nature clonale de la maladie. En fait, le chromosome Philadelphie n'est retrouvé que dans les lignées hématopoïétiques (Fialkow et al.,



1977). La présence de la translocation t(9;22) dans presque toutes les cellules de la moelle osseuse des patients atteints de LMC a montré que cette anomalie génétique était impliquée dans l'initiation de la maladie. Plus tard et grâce à la biologie moléculaire, le début des années 1980 a vu l'identification de deux gènes qui encadrent le point de fusion de la translocation. Le gène *ABL* situé sur le chromosome 9, dont le nom est dérivé de son homologue viral, le gène Abelson (*v-ABL*) responsable d'une leucémie chez les souris, code pour une protéine ayant une activité tyrosine kinase strictement régulée (Abelson et al., 1970 ; Bartram et al., 1983). John Groffen, Heisterkamp et leurs collègues ont cloné l'ADN génomique des patients atteints de LMC et ont identifié la majorité des points de cassure dans une région chromosomique limitée sur le chromosome 22, qu'ils ont surnommé « Breakpoint cluster région » ou gène *BCR* (Groffen et al., 1984). La translocation t(9;22) conduit à la formation de deux gènes de fusion : *BCR-ABL* sur le chromosome 22q et *ABL-BCR* sur le chromosome 9q.

La découverte du chromosome Philadelphie a été importante dans la compréhension de la pathogénèse, de la biologie et plus tard, de la biologie moléculaire de la LMC. D'une importance primordiale, a été la découverte que la protéine dérivée du gène de fusion *BCR-ABL*, avait une activité tyrosine kinase accrue, dérégulée par rapport à la protéine normale *ABL*. Cette activité tyrosine kinase a été corrélée avec la capacité de *BCR-ABL* à transformer les cellules vers un phénotype malin (Lugo et al., 1990). Plusieurs études ont démontré le rôle clé de l'oncogène *BCR-ABL* dans différents modèles biologiques. En 1990, plusieurs groupes ont indiqué qu'une maladie ressemblant à la phase chronique de LMC pourrait être induite chez les souris greffées avec la moelle osseuse infectée par un rétrovirus codant pour *BCR-ABL* (Daley et al., 1990 ; Heisterkamp et al., 1990). D'autres groupes ont indiqué que des souris transgéniques portant un gène de fusion *BCR-ABL* avaient une tendance accrue à développer une leucémie (Groffen et al., 1993). En conséquence à cette augmentation de l'activité tyrosine kinase, la protéine *BCR-ABL* active continuellement un certain nombre de voies de signalisation qui vont permettre une prolifération non-contrôlée des cellules, une indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance hématopoïétique, une résistance à l'apoptose et une modification des interactions avec le stroma médullaire (Goldman et Melo, 2003).

Ainsi la présence de la protéine de fusion *BCR-ABL* avec son activité tyrosine kinase aberrante dans les cellules leucémiques de pratiquement tous les patients atteints de LMC a



fourni des preuves solides sur son rôle pathogénique mais aussi a démontré qu'elle est un marqueur de la maladie.

#### IV. Les anomalies chromosomiques :

L'expression anormale de gènes normaux, l'expression de gènes anormaux soit par mutation soit par fusion entre deux gènes ou la disparition de gènes (gènes suppresseurs de tumeur) contrôlant le processus mutagène représentent les trois mécanismes principaux de la transformation maligne dans les hémopathies malignes. Ces anomalies génétiques acquises ont été généralement identifiées à partir d'anomalies chromosomiques décelables au microscope.

Les cellules malignes contenant des anomalies chromosomiques proviennent toutes d'un même clone cellulaire (Hanahan et Weinberg, 2000). Ces anomalies chromosomiques peuvent être de nombre (perte / gain d'un chromosome) ou de structure (cassures suivies de réarrangements, d'amplifications ou de délétions) (**Figure 1**).

Parmi les anomalies de structure, on retrouve les translocations chromosomiques qui se définissent par le transfert d'un segment d'ADN d'un chromosome vers un autre. Elles peuvent être réciproques, impliquant deux chromosomes (échange de matériel chromosomique) et équilibrées, c'est à dire sans perte de fragment d'ADN ou déséquilibrées avec perte ou duplication de matériel.

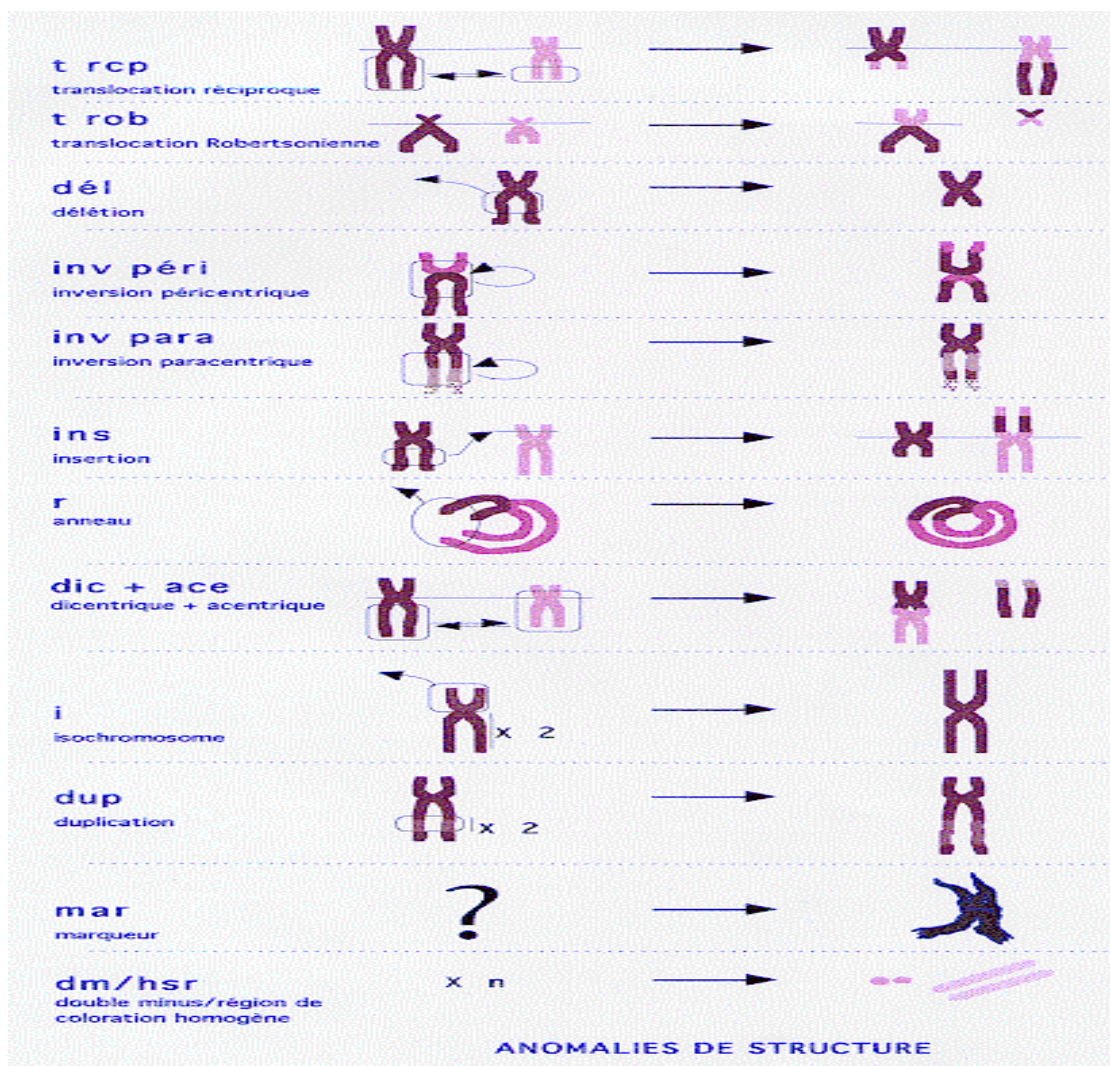


Figure 1 : Les anomalies de structure ( Huret, 2000)

## A. Anomalies de nombre :

Le nombre modal d'une tumeur est le nombre de chromosomes retrouvé dans le plus grand nombre de métaphases anormales ; il correspond donc au clone majoritaire dans la tumeur. Par définition, le caryotype est dit :

- **normal ou diploïde**, s'il n'existe pas d'anomalie chromosomique ; la formule s'écrit 46, XY ou 46, XX si le patient est de sexe masculin ou féminin respectivement (22 paires d'autosomes et une paire de chromosomes sexuels ou gonosomes), suivie du nombre des métaphases analysées noté entre crochets : 46, XY [20].

- **pseudodiploïde** si le nombre modal est de 46 mais il existe une ou plusieurs anomalies de nombre ou de structure.



- **haploïde(n)**, si le nombre de chromosomes est égal à 23.
- **hypodiploïde**, si le nombre de chromosomes est entre 45 et 35 ( $46 - 11$ ).
- **hyperdiploïde**, si le nombre de chromosomes est entre 47 et 57 ( $46 + 11$ ).
- **triploïde (3n)**, si le nombre de chromosomes est égal à 69 ( $3 \times 23$ ).
- **tétraploïde (4n)**, si le nombre de chromosomes est égal à 92 ( $4 \times 23$ ).

On emploie le terme de :

- **trisomie** quand il y'a gain d'un chromosome. Par exemple, chez un patient masculin un caryotype de leucémie lymphoïde chronique comportant une trisomie 12 sera noté 47, XY, +12 ;

- **monosomie** quand il y a perte d'un chromosome ; le caryotype d'une patiente de sexe féminin présentant une leucémie aiguë myéloïde avec monosomie 7 s'écrira 45, XX, - 7.

S'il existe plusieurs clones au sein de la tumeur, ils seront séparés par un « slash », le clone présentant un caryotype normal sera écrit en dernier. **Exemple** : 47, XY, +12[9]/ 46, XY [11].

## B. Les translocations chromosomiques :

Les translocations conduisent à un réarrangement au niveau de l'organisation des gènes. Dans certains cas, l'expression de ces gènes peut être modifiée. En effet, certaines translocations sont à l'origine de nouveaux gènes de fusion transcrits en un ARNm chimérique, lui-même traduit en une nouvelle protéine hybride douée de propriétés oncogéniques (anomalie qualitative). La translocation d'un gène dans une région active en transcription peut aussi conduire à une surexpression de ce gène ou à une expression ectopique dans un type cellulaire où il est normalement absent (anomalie quantitative).

Ces gènes donnant lieu à un avantage prolifératif sont généralement des gènes qui contrôlent la survie et/ou la croissance cellulaire (Hanahan et Weinberg, 2000). Ainsi, les oncogènes ou proto-oncogènes ont été classiquement définis comme des gènes qui, lorsque leur expression est dérégulée ou lorsque leur structure est altérée, contribuent à l'apparition d'un phénotype malin.

## C. Origine des translocations chromosomiques :



Actuellement, il est particulièrement difficile de définir avec certitude l'origine des translocations chromosomiques. Toutefois, l'apparition d'une translocation donnée est dépendante à la fois, de la probabilité de rapprochement spatial des deux régions et de la probabilité de réalisation de cassures doubles brins. On estime ainsi que les cellules humaines génèrent environ 10 cassures ADN double brin à chaque division (Haber, 1999). L'apparition de translocation peut cependant être favorisée par certaines structures chromatiniennes (despiralisation), par des sites spécifiques de coupure des ADN topo-isomérase II, par des sites hypersensibles à la DNase I ou par des séquences répétées du type *ALU* (Strissel et al., 1998). Les erreurs de réparation des cassures doubles brins par le système de recombinaison homologue via des séquences de reconnaissance de type RSS (Recombination Signal Sequence) ou le système non homologue (Non Homologous et Joining), peut également être à l'origine de ces translocations (Richardson et Jasin, 2000). Il est à noter que de nombreuses translocations impliquent les gènes des immunoglobulines (Ig) ou des récepteurs des lymphocytes T (TCR). L'immunité adaptative dépend de la génération d'un vaste répertoire d'Ig et de TCR exprimés respectivement par les lymphocytes B et T. La diversité de ces récepteurs antigéniques est générée grâce à un processus de réarrangement somatique par les recombinaisons RAG1 et RAG2 (Recombination-Activating Gene 1 et 2). Il s'agit de la recombinaison VDJ (Variable, Diversité, Jonction) (Gellert, 1997). Ainsi, des accidents de recombinaison somatique peuvent être à l'origine de translocations chromosomiques (Hiom et al., 1998) (Exemple : réarrangement BCL2-IGH dans des lymphomes folliculaires porteurs de la translocation t(14;18). BCL2 code une protéine anti-apoptotique. Sa juxtaposition à l'enhancer des immunoglobulines conduit à une surexpression de BCL2 (Tsujimoto et al., 1984).

#### **D. Intérêt de la recherche de translocations chromosomiques :**

La recherche des anomalies chromosomiques acquises dans les hémopathies malignes est un élément essentiel dans la prise en charge de ces maladies. Les anomalies sont détectées par des techniques de cytogénétique conventionnelle et moléculaire (caryotype, FISH) réalisées sur prélèvement médullaire ou à partir du sang périphérique dans les leucémies, ou ganglionnaire s'il s'agit des lymphomes. Les modifications du caryotype sont des modifications acquises (limitées aux cellules malignes), clonales (un clone se définit par deux métaphases au moins ayant le même chromosome surnuméraire ou la même anomalie de structure, ou de trois métaphases



dépourvues d'un chromosome identique), primaires ou secondaires, qu'elles soient numériques et/ou de structure, elles ne se font pas toujours au hasard : elles sont non-aléatoires, certaines sont spécifiques d'une entité pathologique. La découverte des anomalies chromosomiques dans les hémopathies malignes est primordiale à double titre: d'une part intérêt clinique dans la prise en charge du patient, d'autre part intérêt scientifique.

## 1. Intérêt clinique dans la prise en charge du patient :

### 1-a. Diagnostic :

Les anomalies primaires observées représentent un critère majeur du classement de ces affections. Par exemple, dans la leucémie myéloïde chronique (LMC), le chromosome Philadelphie (ou Ph) a été la première anomalie identifiée spécifique d'un processus malin (Nowell et Hungerford, 1960). C'est en 1973 que Rowley découvre que ce Ph est issu d'une translocation  $t(9;22)(q34;q11)$  présente dans 90 à 95% des cas. Cette translocation conduit à un réarrangement entre le gène *BCR* et la kinase Abelson (*ABL*) (Rowley, 1973). L'observation au caryotype d'un chromosome Ph associé à une hyperleucocytose conduit au diagnostic de LMC. La cytogénétique est une approche essentielle dans le diagnostic de ces pathologies, cependant, les techniques de biologie moléculaire sont parfois indispensables lorsqu'il s'agit d'anomalies cryptiques, comme cela est le cas dans 5% des LMC pour la translocation *BCR-ABL*, ou encore dans la recherche de transcrits résiduels par RT-PCR (Pelz et al., 2002).

### 1-b. Pronostic et traitement:

La cytogénétique apporte souvent un paramètre pronostique et un élément de choix du traitement. Dans les cas de LAL de l'enfant, les formes associées à un Ph, à une translocation  $t(4;11)$  ou à une translocation  $t(1;19)$  ont une potentialité de rechute élevée et un espoir de curabilité faible justifiant le recours à une allogreffe de moelle osseuse dès l'obtention d'une première rémission complète. Dans les LAM, les formes avec inversion du 16 ou translocation  $t(8;21)$  ont au contraire une potentialité de curabilité importante avec la chimiothérapie seule. L'identification des gènes impliqués dans ces translocations peut également permettre une orientation thérapeutique plus ciblée. Par exemple dans la leucémie aiguë promyélocytaire (LAP), la translocation  $t(15;17)(q22;q11)$  est aujourd'hui reconnue comme étant associée de façon spécifique à cette pathologie. Elle juxtapose un gène appelé *PML* (promyelocytic leukemia) situé normalement en 15q23 au gène codant pour le récepteur de l'acide rétinoïque



(*RARalpha*) en 17q21. La protéine hybride PML-RAR $\alpha$  résultant de cette fusion empêche l'action des rétinoïdes endogènes sur la différenciation de la lignée promyélocytaire qui reste bloquée à un stade précoce. L'utilisation d'acide rétinoïque dans le traitement de cette affection permet de cibler spécifiquement les cellules porteuses de la translocation (Chen et al., 1996).

### 1-c. Le suivi :

La cytogénétique permet d'apprécier l'évolution de la maladie (maladie résiduelle ou rémission complète) et d'apprécier l'efficacité d'un traitement. Dans la LMC, au cours de l'évolution de la maladie des anomalies additionnelles peuvent apparaître témoignant d'une évolution clonale (duplication du Ph, trisomie 8, isochromosome du 17, perte du chromosome Y), phénomènes de mauvais pronostic. Inversement, la reprise d'une hématopoïèse Ph négative sous interféron constitue une amélioration pronostique. La cytogénétique peut également être complétée par les techniques de biologie moléculaire telle que la RT-PCR. En effet, la recherche de maladie résiduelle après traitement peut être appréhendée par RT-PCR si l'on connaît la nature du transcrit de fusion résultant de la translocation.

## 2. Intérêt scientifique :

La caractérisation de nouvelles translocations chromosomiques a toujours mis au jour des gènes importants pour comprendre l'oncogenèse (*MYC*, *BCL2*, *BCL1*, *PML*, *MLL*, *ABL*, *PDGFR $\beta$* ...). Les deux familles de gènes majoritairement impliqués dans les translocations sont: les gènes codant des tyrosines kinases et les gènes codant des facteurs de transcription. Enfin il y'a aussi les micro-ARNs, classe de petits ARN non codants, qui manifestement pourraient jouer un rôle prépondérant en oncologie.

Pour rester dans le cadre du sujet la famille codant des tyrosines kinases sera étudiées.

### E. Les tyrosines kinases :

Les protéines kinases représentent environ 2% des protéines codées par le génome des eucaryotes. Elles représentent la 3ème catégorie de protéines la plus commune dans le génome humain. Il existe plus de 500 protéines avec une activité kinase mais seulement 90 sont des tyrosines kinases (Manning et al., 2002). Ces dernières catalysent le transfert du dernier phosphate (en position  $\gamma$ ) de l'ATP sur des résidus tyrosines (Tyr) de protéines cibles. Les protéines tyrosines kinases interviennent dans le contrôle du cycle cellulaire, de la migration





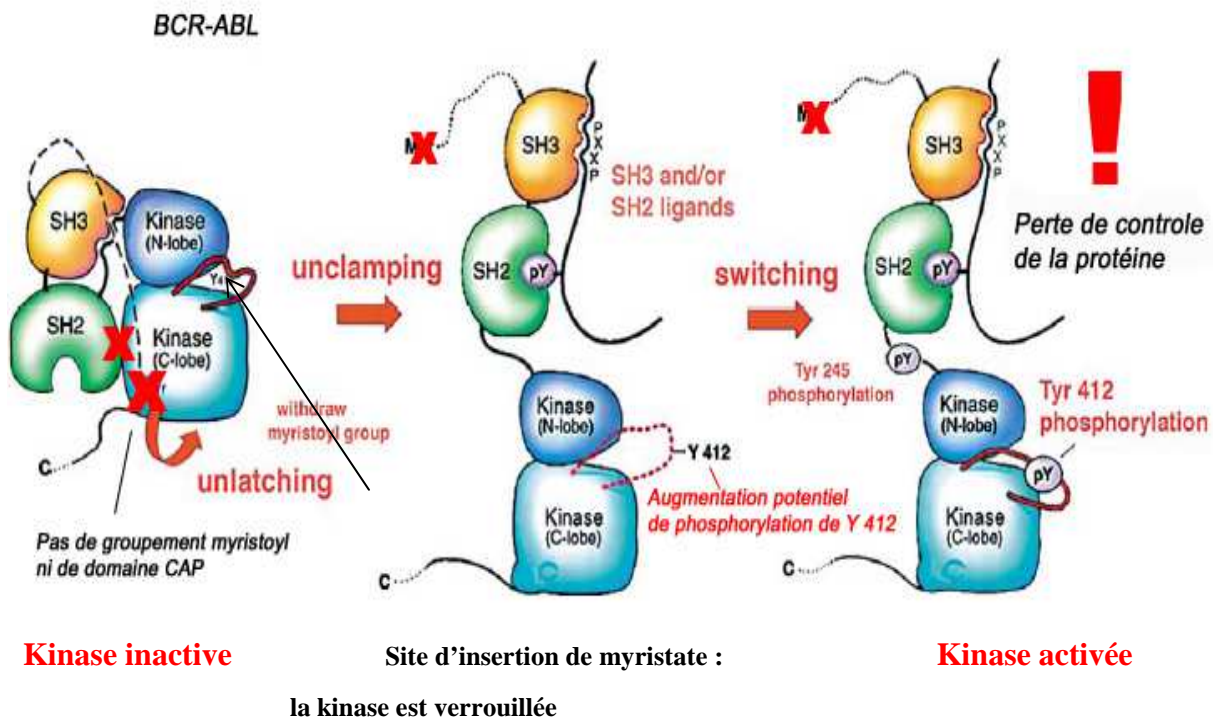
cellulaire, du métabolisme cellulaire, de la prolifération et la différenciation cellulaire. On distingue deux types de protéines tyrosines kinases : les protéines tyrosines kinases cytoplasmiques et nucléaires et les récepteurs transmembranaires. Seulement les tyrosines kinases cytoplasmiques seront étudiées.

### **1. Structure des KIT cytoplasmiques :**

Les protéines kinases cytoplasmiques contiennent dans certains cas en plus de leur domaine catalytique, des domaines de type SH2 et SH3. Les domaines de type SH2 ont la particularité de se fixer sur des séquences caractéristiques contenant un résidu tyrosine phosphorylé. Les domaines SH3 interagissent avec des séquences riches en prolines. (Lewin, 1998)

### **2. Activation des KIT cytoplasmiques :**

Les protéines tyrosines kinases cytoplasmiques vont être recrutées au niveau des récepteurs activés via leur domaine SH2 (**Figure 2**). Ces domaines jouent un rôle essentiel dans les phénomènes de relocalisation intracellulaire en reconnaissant spécifiquement les tyrosines phosphorylées. Les domaines SH2 ne présentent pas d'affinité pour des résidus non phosphorylés. Ce domaine a une structure tridimensionnelle compatible avec celle du récepteur. Pour que la fixation se fasse de manière stable, on observe au sein du domaine SH2 une suite d'acides aminés créant un environnement de charge positive. C'est dans cette "poche" que vient se loger le phosphate de charge négative porté par la tyrosine du récepteur. L'attraction des charges contraires assure ensuite une forte stabilité à cette association ce qui entraîne une phosphorylation des tyrosines kinases cytoplasmiques qui permet la transmission du signal. (Lewin,1998)



**Figure 3:** Activation de la tyrosine kinase cytoplasmique ABL. Le domaine SH2 de ABL se fixe sur le résidu phosphorylé et/ ou le domaine SH3 se fixe sur les séquences consensus, entraînant ainsi une phosphorylation sur ses tyrosines 245 et 412. (D'après Cayatte PA, 2006)

## F. Translocations chromosomiques et tyrosines kinases :

Les gènes codant des protéines tyrosine kinase sont fréquemment réarrangés dans les hémopathies malignes. Les gènes de fusion issus de ces translocations sont composés dans la majorité des cas d'une partie 5' codant pour des domaines d'oligomérisation et d'une partie 3' codant pour les domaines catalytiques des tyrosines kinases (Rodrigues et Park, 1994). Les domaines d'oligomérisation vont permettre la dimérisation des protéines et donc le rapprochement des domaines catalytiques ce qui va entraîner une transphosphorylation constitutive des tyrosines kinases.

## V. Les syndromes myéloprolifératifs :

Les syndromes myéloprolifératifs sont des affections clonales des cellules souches caractérisées par une hématopoïèse «effective» s'exprimant par l'élévation dans le sang



périphérique d'une ou plusieurs lignées cellulaires et par une moëlle hypercellulaire avec une maturation (Albitar et Freireich, 2000; Dickstein et Vardiman, 1995). Contrairement aux leucémies aiguës, les SMP sont chroniques c'est-à-dire que les cellules gardent leur potentiel de différenciation terminale normal ou quasi-normal. Parmi les SMP le prototype est la leucémie myéloïde chronique (LMC) Ph positive (*BCR-ABL*<sup>+</sup>). Les autres entités de ce groupe sont la polyglobulie de vaquez, la myélofibrose idiopathique et la thrombocytémie essentielle.

Bien que l'origine de ces pathologies ne soit pas toujours connue. Cependant, il a clairement été démontré que les hémopathies malignes sont fréquemment associées à des anomalies. Dans notre étude nous allons parler en détails de la leucémie myéloïde chronique.

## VI. Épidémiologie de la leucémie myéloïde chronique :

### 1. Fréquence :

La LMC représente 7 à 15% des leucémies de l'adulte, avec environ dix nouveaux cas par an pour un million d'habitants.

### 2. Sexe :

Cette affection touche préférentiellement les hommes, avec une sex-ratio proche de 2.

### 3. Age :

Son incidence augmente avec l'âge pour atteindre trois cas par million d'habitants chez les sujets âgés. L'âge médian au diagnostic se situe entre 30 et 50 ans. L'absence de registre national rend cependant l'évaluation de son incidence approximative.

## VII. Les facteurs de risque la leucémie myéloïde chronique :

### A. Les radiations ionisantes :

Dans la grande majorité des cas, aucune étiologie n'est retrouvée. Cependant, l'exposition à des radiations ionisantes pourrait jouer un rôle favorisant. Cette hypothèse, suggérée par l'augmentation de l'incidence de la LMC chez les survivants de la bombe atomique d'Hiroshima, est confortée in vitro par l'augmentation de la fréquence de détection du réarrangement *BCR-ABL* après irradiation de lignées cellulaires initialement *BCR-ABL* négatives (Deininger et al., 1998). De même qu'une étude récente portant sur les travailleurs du nucléaire (Rocket dyne



Atomics International) (Ritz et al., 1999) aux États-Unis montre un risque élevé de mortalité par leucémies

Le seul effet actuellement reconnu de l'inhalation du radon est l'induction de cancer du poumon (IARC, 1988; NRC,1999). Néanmoins, des études dosimétriques récentes indiquent qu'une partie de la dose due au radon et à ses descendants radioactifs peut être délivrée en dehors des poumons, en particulier à la moëlle osseuse (Rommens et al., 2000 ; Kendall et Smith, 2002).

Des excès de leucémies ont été observés chez des patients ayant reçu des injections de Thorotrast (produit de contraste utilisé en diagnostic médical) (van Kaick et al., 1999).

## **B. Radiations non ionisantes :**

### **1. Benzène et solvants organiques :**

Le benzène a été très largement utilisé comme élément de base de nombreuses synthèses chimiques, comme diluant des encres, des peintures et des colles ou encore comme dégraissant. Les secteurs de l'industrie de la chaussure, de l'industrie chimique, de l'industrie du caoutchouc et de l'imprimerie ont donné lieu à de très fortes expositions. L'essence utilisée comme carburant contient 1 à 5 % de benzène et est aujourd'hui à l'origine d'expositions nettement plus faibles mais très fréquentes en population générale. La responsabilité du benzène dans les leucémies a été clairement établie sur des arguments expérimentaux et épidémiologiques (Austin, 1988).

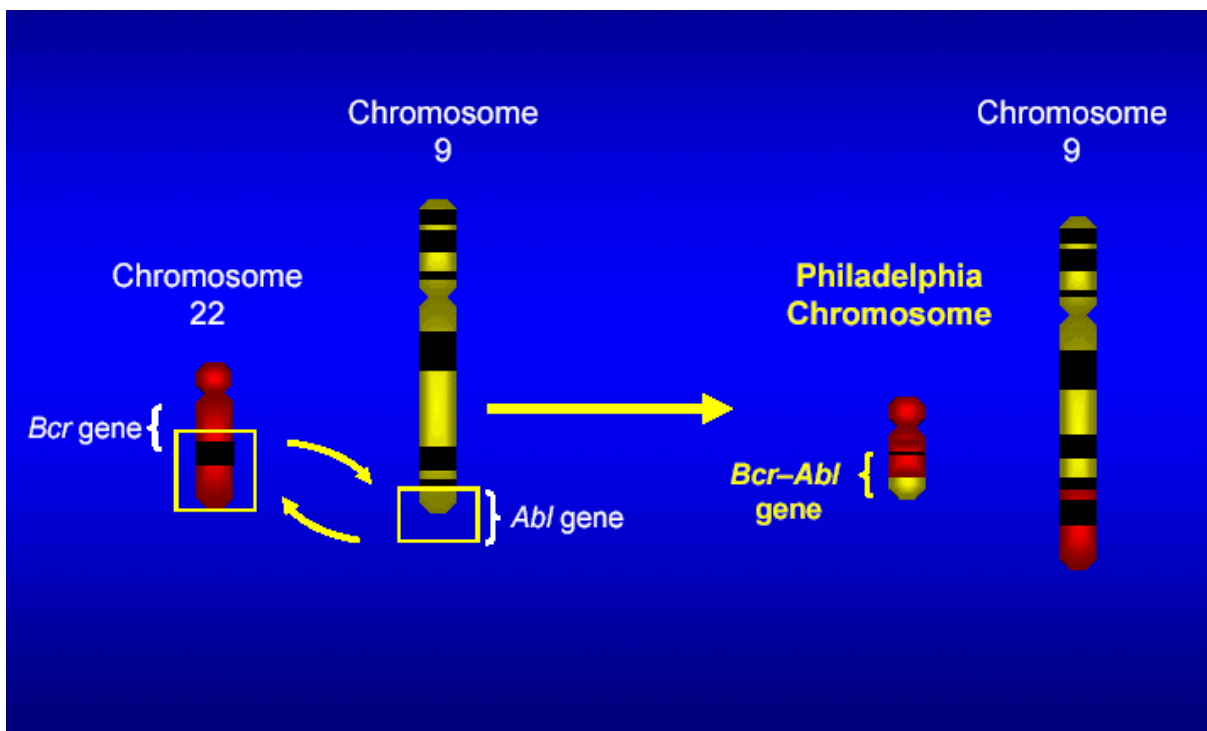
### **2. Les immunosuppresseurs :**

Le traitement par immunosuppresseurs expose également au risque de LMC. Ce risque est estimé être 10 à 15 fois celui de la population non traitée, avec un risque accru si :

- âge avancé
- sexe masculin
- et durant les 15 premières années après le traitement (Najab, 1981).

## **VIII. Physiopathologie de la translocation t (9 ; 22) (q34 ; q11) :**

La translocation  $t(9;22)(q34;q11)$  mise en évidence dans les précurseurs myéloïdes des patients atteints de LMC est aussi présente, dans certains cas, dans les lymphocytes montrant l'atteinte d'une cellule souche pluripotente (Rowley, 1990). Du point de vue moléculaire la translocation réciproque fusionne l'oncogène *ABL* (localisé sur le bras long du chromosome 9) avec la région *BCR* (localisée sur le chromosome 22) (**figure 3**). Le résultat de cette fusion est un gène hybride codant pour une protéine de 210kb à activité tyrosine kinase jouant un rôle majeur dans le développement de la leucémie par son action sur le cycle cellulaire (Daley et al., 1990). Des modèles de souris transgéniques ont permis de confirmer le potentiel oncogénique de la protéine p210. Les animaux transfectés développent un syndrome myéloprolifératif après un certain temps de latence (Heisterkamp et al., 1990).



**Figure 3 : Chromosome Philadelphie.** La translocation réciproque  $t(9;22)$  entraîne la formation d'un chromosome 22 de taille plus petite appelé : chromosome Philadelphie ; ceci conduit à la formation d'un gène de fusion spécifique *BCR-ABL*. ( Leguay et Mahon, 2005)



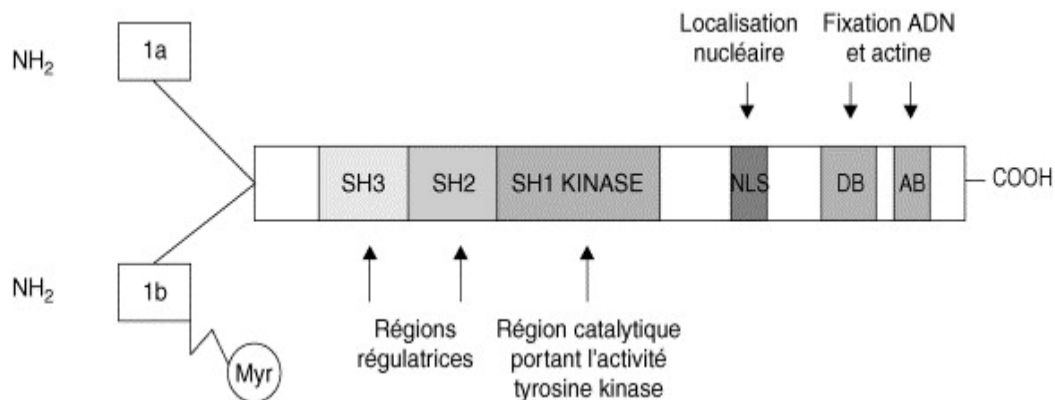
## A. Les gènes impliqués dans la translocation :

### 1. Le gène *ABL* et sa protéine :

L'oncogène Abelson (*c-ABL*) est localisé sur le chromosome 9 en position 9q34. Son nom est dérivé de son homologue viral, le gène Abelson (*v-ABL*), responsable d'une leucémie chez la souris (De Klein et al., 1982). Il existe deux variantes possibles pour le premier exon, 1a et 1b, et les ARN messagers produits mesurent respectivement 6 et 7 kb. Deux variétés de protéines d'environ 145 kDa sont synthétisées en fonction du premier exon, **1a ou 1b**. (Thijssen et al., 1999). La protéine contenant l'exon 1b est « myristoylée » (c'est-à-dire modifiée par un groupement lipide de type acide gras saturé sur un résidu glycine), ce qui entraîne sa localisation à la membrane plasmique. L'absence de ce résidu glycine dans la forme **1a** (majoritaire) entraîne une localisation nucléaire prédominante. La structure de la protéine cellulaire ABL est hautement conservée. Comme la plupart des protéines induisant un signal intracellulaire, la protéine ABL possède des domaines d'homologie SH (Src homology) semblables à ceux de la protéine Src. Le domaine SH3 est un régulateur négatif du domaine SH2, qui est pour sa part un régulateur positif du domaine SH1, support de l'activité tyrosine kinase de la protéine ABL (**Figure 4**). Dans la partie C-terminale de la protéine, il existe une séquence de localisation nucléaire (NLS pour nuclear localization signal) ainsi que des domaines lui permettant de se fixer aux filaments d'actine et à l'acide désoxyribonucléique (ADN). On peut remarquer que la protéine ABL est dotée d'une dualité structurale et fonctionnelle, avec des domaines de régulation qui lui permettent de jouer un rôle à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme de la cellule et de transiter entre les deux compartiments. **Son action dépend de sa localisation nucléaire ou cytoplasmique.** (Hantschel et Superti-Furga, 2004)

\* Dans le compartiment nucléaire, ABL joue un rôle de régulateur négatif du cycle cellulaire. Lors de la phase G<sub>0</sub>, ABL se lie à l'ADN et forme un complexe avec des protéines inhibitrices du cycle telle que PRB (protéine du rétinoblastome). Lors de la transition G<sub>1</sub>/S, la protéine PRB est phosphorylée et se dissocie d'ABL, ce qui permet son activation.

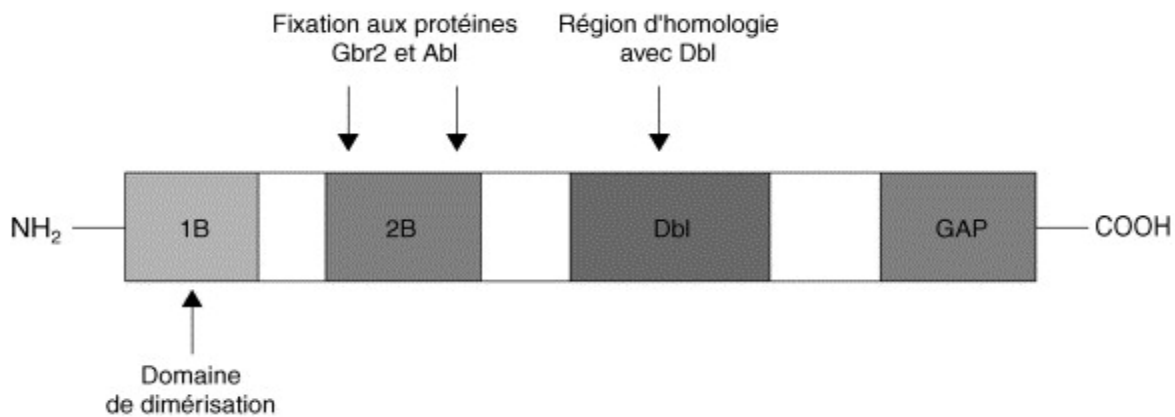
\* Quand elle est localisée dans le cytoplasme, la protéine ABL joue un rôle important dans la croissance et la prolifération cellulaire, participant à la transduction du signal initiée par certains récepteurs aux facteurs de croissance.



## 2. Le gène *BCR* et sa protéine :

Le gène *BCR*, positionné sur le bras long du chromosome 22, a été découvert en clonant la région appelée major-breakpoint cluster région (*M-BCR*) où a lieu la majorité des points de cassure dans la LMC. Il s'étend sur 135 kb, comprend 23 exons et permet la transcription de deux types d'ARN messagers dont les poids moléculaires sont respectivement de 4,5 et 6,7 kb et qui codent une protéine de 160 kDa, d'expression ubiquitaire. Cette protéine, de localisation cytoplasmique lorsque la cellule n'est pas en cycle, est exprimée de manière péri-chromosomique lors de la mitose, ce qui suggère qu'elle joue un rôle dans le cycle cellulaire (Goldman et Melo, 2003). La protéine *BCR* est constituée de plusieurs domaines (**Figure 5**). Dans la partie N-terminale, le domaine 1B constitue une région importante puisqu'il permet la dimérisation de la protéine *BCR-ABL* conduisant à l'ouverture de l'activité kinase, et le domaine 2B comprend deux sites de liaison aux domaines SH2 comme ceux portés par la protéine *ABL* et la protéine *Grb2*. La région centrale présente un domaine d'homologie avec les protéines *Dbl* (facteur d'échange guanosine triphosphate [GTP]/guanosine diphosphate [GDP]). La partie C-terminale de *BCR*, absente dans la protéine de fusion *BCR-ABL*, a une fonction GAP (GTPase activating protein) pour les protéines G de type *Rac*. Cette deuxième partie, qui n'intéresse pas la protéine chimérique *BCR-ABL*, joue en réalité un rôle dans la bactéricidie des polynucléaires. Les fonctions réelles de la protéine *BCR* sont, néanmoins, peu connues.

**Figure 4 : Représentation schématique de la protéine ABL.** La forme 1b possède un groupement myristoylé (Myr), qui joue un rôle important dans l'auto-inhibition de la protéine. NLS est un domaine de localisation nucléaire, DB (DNA binding) est un domaine de fixation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et AB (actin binding) de fixation de l'actine. (Leguay et F Mahon, 2005)



**Figure 5 : Représentation schématique de la protéine BCR.** La région 1B correspond aux 63 premiers acides aminés de BCR et elle est nécessaire à la dimérisation de la protéine. (Leguay et Mahon, 2005)

### 3. Le gène *BCR-ABL* et sa protéine de fusion :

Les réarrangements les plus fréquemment retrouvés au cours de la LMC sont les produits de fusion du gène *ABL* rompu entre les exons 1 et 2 et du gène *BCR* rompu dans une région où les points de cassure sont variables, appelée *M-BCR* (Major *BCR*). Cette région, qui correspond aux exons 12 à 16 du gène *BCR*, est subdivisée en cinq bandes, de b1 à b5, qui correspondent aux cinq exons impliqués (exons 12 = b1, exon 13 = b2..., exon 16 = b5). La coupure au sein de cette région se produit préférentiellement entre les exons b2 et b3 ou b3 et b4 (Melo, 1996). (Figure 6). Ainsi se forment, respectivement, les produits de fusion **b2a2** et **b3a2**. Les ARN messagers ainsi produits codent tous deux une protéine chimérique de 210 kDa. Cependant, la protéine codée par le variant **b3a2** est plus fréquente et comprend 25 acides aminés de plus que celle du variant **b2a2** ; aucune étude n'a permis de démontrer une différence d'évolution clinique ou biologique entre ces deux variantes. Il existe d'autres variantes de la translocation t(9;22), responsables, dans la majorité des cas, de phénotypes leucémiques différents.

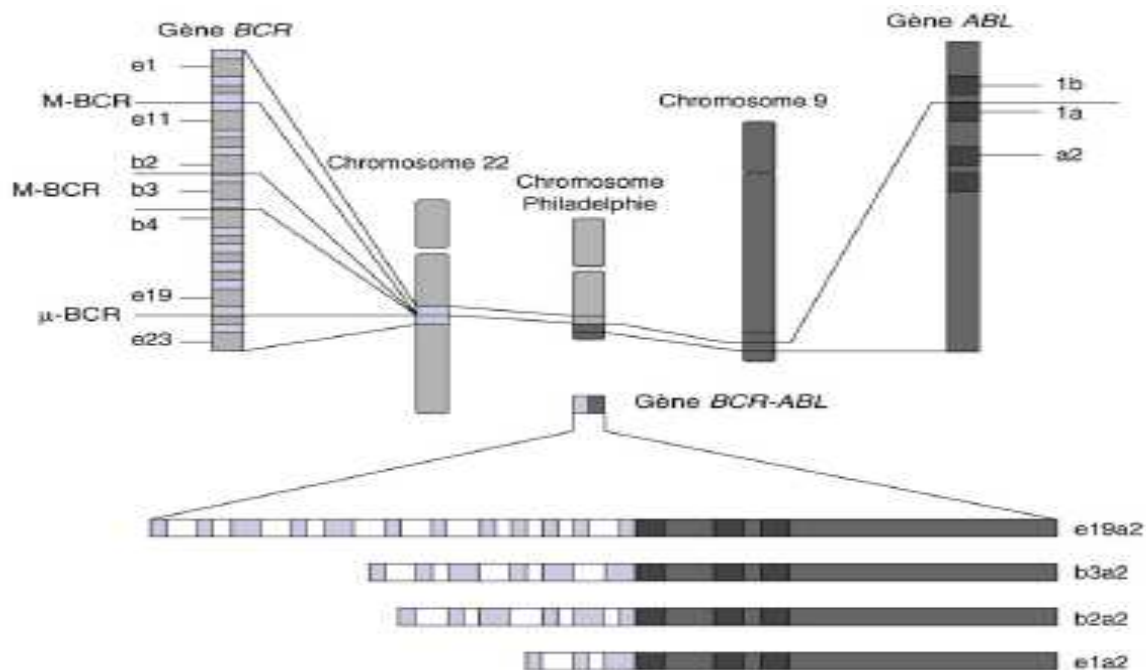
Il faut mentionner la fusion **e1a2**, issue d'une cassure dans la *m-BCR* (minor *BCR*), c'est-à-dire entre les exons 1 et 2 de *BCR*. Elle produit une protéine chimérique de 190 kDa dont l'activité tyrosine kinase serait plus intense que celle de la protéine de 210 kDa. Ce variant moléculaire est majoritairement retrouvé dans la leucémie aiguë lymphoblastique à chromosome Philadelphie.

Un autre variant, qui comporte un gène *BCR* interrompu dans la *μ-BCR* (micro-*BCR*), entre les exons 19 et 20, permet la synthèse d'une protéine chimérique de 230 kDa. Cette dernière forme moléculaire correspondrait à des hémopathies d'évolution lente, marquées par une



hyperleucocytose modérée à polynucléaires neutrophiles, associées ou non à une thrombocytose (Pane et al., 1996) (**Figure 6**). La protéine BCR-ABL de 210 kDa comprend les trois domaines SH1, SH2, SH3 et tous les autres domaines d'ABL. Du côté BCR, le motif de dimérisation est la partie la plus importante. Cette partie de BCR conduit à la dimérisation de la protéine BCR-ABL et à son autoactivation par transphosphorylation.

De plus, la perte de la partie N-terminale d'ABL supprime son auto-inhibition. Ces deux modifications protéiques expliquent l'activation permanente de la tyrosine kinase de BCR-ABL. La protéine tyrosine kinase ABL physiologiquement est autorégulée de manière physique, c'est-à-dire par modification conformationnelle. Sa fusion avec BCR modifie cette auto-inhibition et active en permanence la kinase.



**Figure 6 :** Chromosomes 9 et 22, gènes *BCR*, *ABL* et *BCR-ABL* avec les différents sous-types d'acide ribonucléique (ARN) transcrits en fonction des points de cassure. Description schématique des différents points de cassure dans les exons des gènes *BCR-ABL*, expliquant les différents sous-types d'ARN messagers transcrits. (Leguay, et Mahon, 2005)

#### 4. Voies de signalisation intracellulaire conduisant à la leucémogénèse :

La phosphorylation d'un nombre très important de substrats est responsable des propriétés de la cellule leucémique, ce qui la distingue d'une cellule normale. En effet, l'autoactivation et la perte



de la régulation de l'activité tyrosine kinase entraînent l'activation, directe ou indirecte, et le recrutement de voies de signalisation impliquées dans les processus de prolifération, d'apoptose, de différenciation et d'adhésion cellulaire.

## **B. Mécanismes d'action de la protéine de fusion :**

### **1. Altérations des propriétés d'adhésion induites par la protéine**

#### **BCR-ABL dérégulée :**

Les cellules tumorales immatures présentent une diminution de leur adhésion au stroma médullaire et à la matrice extracellulaire (Gordon et al., 1987). L'adhésion cellulaire est médiée par différentes familles de molécules comme les intégrines. L'expression de ces molécules d'adhésion n'est pas modifiée mais leur fonction et le signal qu'elles induisent sont dérégulés. Ainsi, la phosphorylation par BCR-ABL de protéines comme CRKL, la paxilline ou la talline, jouerait un rôle important dans cette dérégulation (Deininger et al., 2000) .

### **2. Activation de signaux mitotiques:**

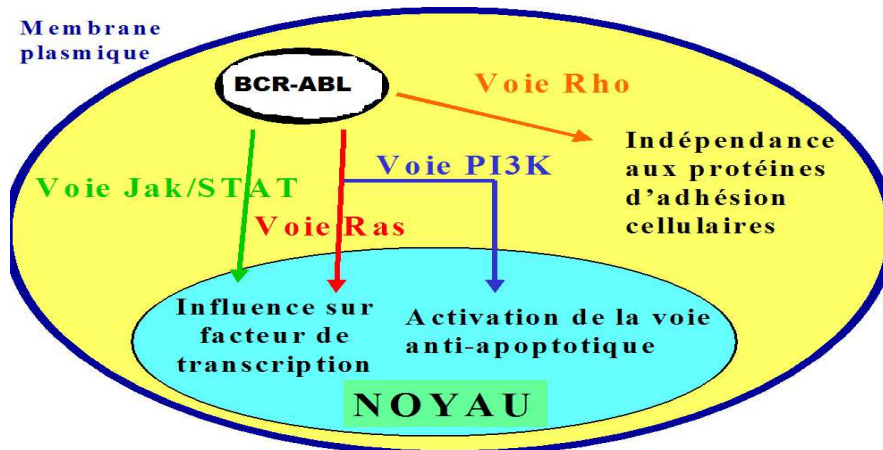
L'autophosphorylation du résidu tyrosine 177 de la protéine BCR-ABL permet la fixation de la protéine GRB-2 qui, liée à SOS, stabilise la forme activée de RAS (Pendergast et al., 1991). Cependant, deux autres protéines, substrats de BCR-ABL, peuvent aussi activer Ras : SHC se liant à SH2 et CRKL se liant à SH3 (Oda et al., 1994 ; Pelicci al.,1995). Ras activée peut, via les protéines RAF, MEK et ERF, activer à son tour d'autres gènes induisant un signal prolifératif. Une autre voie, celle de Jak Kinase, joue aussi un rôle important. En effet, BCR-ABL peut activer, via GRB-2, les protéines STAT sans passer par la phosphorylation des Jak kinases (De Groot et al., 1999). De même, la voie des PI3 kinases peut, aussi, être activée (Skorski et al., 1997) via Grb-2, induisant un signal prolifératif et antiapoptotique via AKT (del Peso et al., 1997). (**Figure 7**).

### **3. Inhibition de l'apoptose :**

BCR-ABL bloque le relargage du cytochrome C par la mitochondrie, ce qui induit l'inactivation de la voie des caspases (Dubrez et al., 1998 ; Amarante et al., 1998) Cet effet est dû en partie à la phosphorylation de la protéine pro-apoptotique BAD ou à l'hyper-expression de la protéine antiapoptotique BCL-2 via des voies de signalisation RAS ou PI3 kinase-dépendantes (**Figure 7**). D'autres partenaires moléculaires, telles les protéines STAT ou encore la voie NFKB, interviennent dans l'inhibition d'apoptose induite par BCR-ABL.

#### 4. Dégradation de protéines par le protéasome :

La protéine BCR-ABL, comme la protéine ABL, induit la dégradation via le protéasome des protéines ABI-1 et ABI-2 (Dai et al., 1998) inhibiteurs physiologiques de l'activité kinase d'ABL. Elle induit aussi la dégradation des protéines participant à la réparation de l'ADN, ce qui pourrait expliquer en partie l'instabilité génétique que présentent les cellules leucémiques *BCR-ABL* positives.



#### Les 4 voies affectées par BCR-ABL

**Figure 7: Voies de signalisation cellulaire.** La protéine BCR-ABL active différentes voies de signalisation. Pour simplifier sont représentées ici les principales. Cependant, de très nombreux substrats protéiques ont été identifiés comme étant directement ou indirectement phosphorylés par l'activité kinase de BCR-ABL. (Nadia et al., 2006).

#### 5. Instabilité génomique ou génétique :

Cette instabilité génétique est illustrée par la progression de la maladie vers les crises blastiques. Elle peut être mise en évidence par les expériences suivantes : la méthode des microsatellites et l'étude de la perte d'hétérozygotie. Les microsatellites sont des séquences d'ADN contenant un nombre variable de répétitions de bases nucléiques en tandem (VNTR) (Thijsen et al., 1999). Ces séquences étant non codantes, elles subissent de manière définitive les mutations induites par une instabilité génétique ; elles en sont donc un miroir direct (Robledo et al., 1995). La perte d'hétérozygotie reflète tout autant cette instabilité. En effet, tout gène muté sur un seul de ses allèles peut être désactivé, afin qu'il ne soit plus transcrit. Dans ce cas, toute transcription et donc toute traduction protéique ne provient plus que d'un seul allèle, ce qui définit la perte



d'hétérozygotie (Mori et al., 1997 ; Silly et al., 1994) Dans le cas de la LMC, on détecte cette instabilité génétique qui se manifeste de manière accrue lors du passage de la phase chronique vers les phases avancées (accélérée et blastique) de la maladie (Wada et al., 1994).

La responsabilité directe de BCR-ABL n'est pas entièrement démontrée. Cependant, une activité mutationnelle plus intense a été récemment démontrée lors d'apparition de résistances à l'imatinib mésylate dues à des mutations dans le domaine tyrosine kinase. Enfin, de nombreuses protéines oncogéniques peuvent coopérer avec BCR-ABL et participer à la progression de la maladie, par exemple les SRC kinases, qui semblent jouer un rôle important dans les transformations lymphoblastiques (Hu et al., 2004)

Autre exemple, le gène *EVI-L* a été retrouvé dans des crises blastiques, avec une dysmégacaryopoïèse. De même, de rares mutations du gène *RAS* ont été rapportées, corrélées avec les transformations blastiques et l'apparition d'atteintes extramédullaires (Le Maitre et al., 1989 ; Tanaka et al., 1994). L'amplification du gène *C-MYC* ou du gène *BCR-ABL* lui-même, est aussi, parfois, retrouvée dans les phases avancées de la maladie (Ohyashiki K. et al., 1997). Des gènes suppresseurs de tumeurs, tels *P16* et *RB* (gène du rétinoblastome), sont parfois inactivés respectivement dans des crises lymphoblastiques ou mégacaryocytaires. Des anomalies du gène *P53* ont été détectées au cours des phases avancées de la maladie (Ahuja et al., 1989).

La translocation  $t(9;22)$  entraîne la synthèse d'une protéine à activité tyrosine kinase accrue, induit une augmentation de la survie cellulaire par inhibition de l'apoptose et une prolifération cellulaire avec maintien de la différenciation. Cependant, l'instabilité génomique observée, probablement responsable de l'apparition d'anomalies cytogénétiques surajoutées et de l'activation de divers gènes dont la coopération avec *BCR-ABL* est indispensable, explique le passage de la maladie vers une phase plus avancée (accélération ou crise blastique).

Récemment, une équipe, en étudiant les voies intracellulaires responsables de l'autorenouvellement cellulaire, a montré que les progéniteurs des patients en phase blastique pouvaient s'autorenouveler, propriété qui normalement concerne exclusivement la cellule souche (Jamieson et al., 2004)

## **D. Autres gènes et mécanismes potentiellement impliqués dans la LMC :**

### **1. Le protooncogène *C-MYC* :**



Il pourrait lui aussi jouer un rôle dans la LMC puisque sa surexpression entre en synergie avec *BCR-ABL* pour provoquer la transformation cellulaire (Lugo et Witte, 1989) et à l'opposé, des mutants transdominants négatifs de *C-MYC* bloquent le potentiel oncogène de *BCR-ABL* (Sawyers et al., 1992).

## 2. Le gène *P53* :

Il code pour une phosphoprotéine nucléaire qui se lie à l'ADN, modifiant l'expression de plusieurs gènes, et impliquée dans le contrôle de la prolifération cellulaire ainsi que l'apoptose (Vogelstein et al., 1992 ; Levine et al., 1991). Les anomalies directement visibles en cytogénétique ou en analyse par southern blot de *P53* sont assez rares (< 10 % des cas) dans la LMC en phase chronique, mais des réarrangements du chromosome 17 (Mashal et al., 1990; Kelman 1989) ou bien des mutations ponctuelles (Ahuja et al., 1989) sont retrouvés dans plus du quart des LMC en phase blastique ou accélérée. Ces mutations ponctuelles sont généralement associées à la perte de l'autre allèle, qu'elles s'accompagnent ou non d'une délétion 17p visible en cytogénétique. Ces anomalies semblent liées à la physiopathologie de la transformation blastique. On note par exemple le cas d'un patient chez qui la mise en évidence d'une mutation de *P53* coïncide avec le passage en phase blastique, cette altération disparaissant avec le retour en phase chronique (Foti et al., 1991). L'implication de *P53* dans le passage de la phase chronique vers l'acutisation est néanmoins encore discutée, notamment en raison de l'observation de la persistance d'un allèle de *P53* de structure normale dans plusieurs cas de transformation blastique (Schutte et al., 1993).

## 3. L'oncogène *BCL-2* :

L'implication de l'oncogène *BCL-2* dans la LMC n'est pas prouvée. Néanmoins, il existe de hauts niveaux d'expression de *BCL-2* dans les cellules de LMC (Zutter, 1991).

## 4. Le protooncogène *C-MYB* :

Le protooncogène *C-MYB* (Ness et al., 1989; Nakagoshi et al., 1990) est un facteur de transcription dont l'expression est limitée aux cellules hématopoïétiques en prolifération, et qui est nécessaire tant à la croissance des cellules hématopoïétiques normales que leucémiques (Gewirtz et al., 1988; Calabretta et al., 1991). Les progéniteurs leucémiques présenteraient une plus grande sensibilité au blocage de l'expression de *C-MYB* par des oligonucleotides antisens



que leurs équivalents normaux ce qui ne démontre pas l'implication directe et spécifique de *C-MYB* dans la LMC (Calabretta et al., 1991).

### 5. Le gène *AXL*:

Un gène impliqué probablement dans la progression blastique de la LMC a été identifié et cloné (Liu et al., 1988; Neubauer et al., 1993; O' Bryan et al., 1991) et dénommé *AXL*. Ce gène est localisé sur le chromosome 19 en q13.2. Il code pour un récepteur à tyrosine-kinase, qui présente dans son domaine kinase des séquences différentes par rapport aux autres récepteurs à tyrosine kinase. La classe de récepteur à laquelle *AXL* serait le plus proche est celle des récepteurs type insuline. Le gène *AXL* est exprimé dans de nombreux tissus d'origine mésenchymateuse, épithéliale ou hématopoïétique. La surexpression d'*AXL* induit l'apparition d'une phosphoprotéine de 140 kDa, qui est peut-être en fait *AXL* lui-même. Cette surexpression est corrélée avec l'induction d'une transformation maligne des cellules transfectées. Le potentiel oncogène du gène *AXL* semble lié plus à son niveau d'expression qu'à des phénomènes de mutation, la surexpression du gène *AXL* normal présentant un potentiel oncogénique important. Le travail de Partanen et al., analyse l'expression des tyrosine kinases sur la lignée K562, et met en évidence probablement l'expression de ce même gène *AXL*, l'ADNc d'un des clones identifiés, *JTK 11*, présentant une séquence correspondant exactement aux acides aminés 669 et 736 d'*AXL* (région du domaine kinase). Le mécanisme d'oncogénèse évoquant une surexpression plutôt qu'une altération des séquences codantes du gène invite à s'intéresser au contrôle transcriptionnel de ce gène (Partanen et al., 1990).

Cette liste d'oncogènes impliqués dans la LMC n'est pas exhaustive et on peut imaginer une coopération du système  $P210^{BCR-ABL}$  avec de nombreux autres gènes.

Une activité anti-apoptotique a été proposée pour  $P210^{BCR-ABL}$ . Il semble que  $P210^{BCR-ABL}$  et l'IL-3 empruntent des voies de signalisation en partie communes (Matulonis et al., 1993). Or la transfection de  $P210^{BCR-ABL}$  sur des lignées cellulaires IL-3 dépendantes inhibe la mort par apoptose qui survient habituellement lors de leur sevrage en IL-3 (Bedi et al., 1994). De même la transfection de *BCR-ABL* inhibe l'apoptose induite par des agents cytostatiques ou la privation en sérum (Mc Gahan et al., 1994).

De plus, sur ce modèle, l'utilisation d'oligonucléotides antisens anti-*BCR-ABL*, qui permettent une inhibition sélective de la prolifération des cellules exprimant *BCR-ABL*

restaure cette mort apoptotique (Szczylik et al., 1991; Skorski et al., 1993). Le mécanisme de l'inhibition de l'apoptose par P210<sup>BCR-ABL</sup> reste à définir.

## IX. Diagnostic:

### A. Anomalies hématologiques orientant le diagnostic :

#### 1. Hémogramme :

L'hémogramme ou numération formule sanguine (NFS) est l'examen le plus important car il permet à lui seul d'évoquer le diagnostic.

- L'hyperleucocytose est franche, supérieure à  $20.10^9/l$ , majoritairement composée de polynucléaires neutrophiles, associée à une basophilie et à une éosinophilie. La myélémie est constante et harmonieuse, sans hiatus de différenciation, et la blastose est faible lors de la phase chronique (< 5 %).

(normocytaire et normochrome) est peu courante et modérée.

- La thrombocytose est habituelle et souvent supérieure à  $500\ 000/mm^3$ .

Parfois très élevée, elle est rarement responsable d'incidents thrombotiques par thrombopathie associée. (Figure 8)

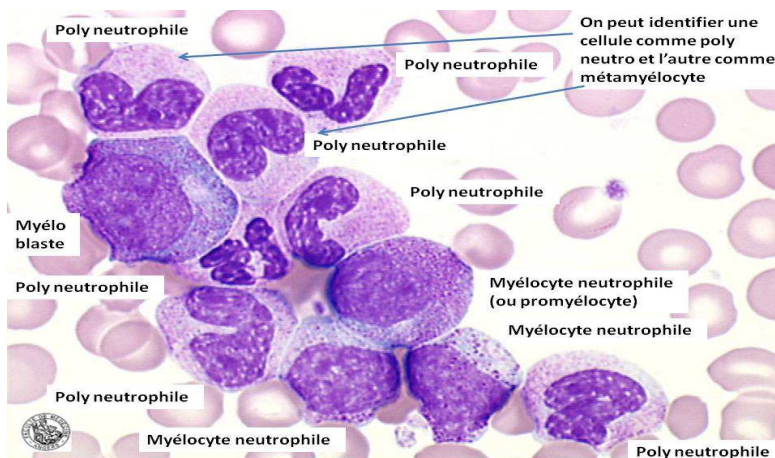
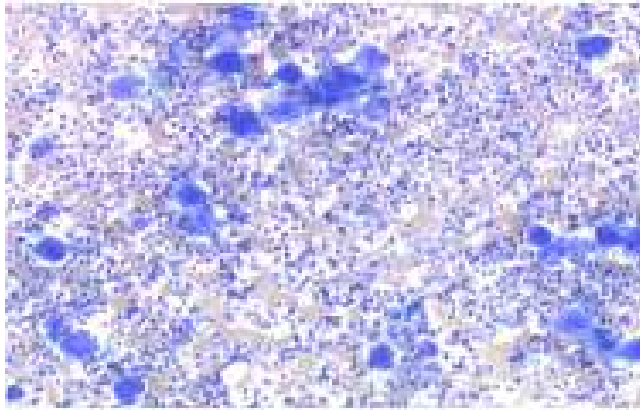


Figure 8 : Aspect du frotti sanguin (Mohamad, 2009)

#### 2. Myélogramme :

Il montre une moelle dont la richesse cellulaire est augmentée, avec une hyperplasie granuleuse marquée et une blastose médullaire inférieure à 10 % en phase chronique. On peut trouver, comme dans le sang, une basophilie, voire une éosinophilie (Figure 9). Les mégacaryocytes sont souvent en nombre augmenté et de petite taille. Inutile pour le diagnostic de

LMC, le myélogramme permet cependant de confirmer la phase de la maladie pour ensuite réaliser le caryotype initial.



**Figure 9 :** Aspect de l'étalement médullaire montrant une hyperplasie granuleuse en pour LMC en phase chronique (Mohamad 2009)

### 3. Examens nécessaires au diagnostic :

Le critère fondamental du diagnostic est la présence du gène de fusion *BCR-ABL* détecté par cytogénétique classique et moléculaire (**Voir C-1**).

#### B. Diagnostic différentiel :

##### 1. Lors de la phase chronique :

Avant la mise en évidence de la translocation  $t(9;22)$  par analyse cytogénétique (caryotype) ou la mise en évidence du transcrite de fusion *BCR-ABL* en biologie moléculaire, les diagnostics différentiels sont ceux d'une hyperleucocytose associée à une myélémie.

##### 1-a. Myélémies réactionnelles :

Elles sont secondaires à une infection, souvent grave, une corticothérapie ou des métastases médullaires. Elles sont caractérisées par l'absence de blastes circulants et le faible nombre de promyélocytes. De plus, on n'observe jamais le chromosome Philadelphie.

##### 1-b. Autres syndromes myéloprolifératifs : splénomégalie myéloïde ou myélofibrose primitive :

Elle se développe plus couramment chez des sujets âgés de plus de 60 ans. Elle se caractérise par une hyperleucocytose avec myélémie et surtout une érythroblastose sanguine aboutissant à





l'érythromyélocytose très caractéristique. La moëlle est le siège d'une fibrose plus ou moins importante, rendant difficile la réalisation du myélogramme, et le chromosome Philadelphie n'est jamais retrouvé à l'analyse cytogénétique.

### **1-c. Thrombocytémie essentielle :**

Elle se caractérise par une thrombocytose importante avec hyperleucocytose modérée. C'est un diagnostic d'élimination et les autres syndromes myéloprolifératifs doivent être tout d'abord éliminés (pas de chromosome Philadelphie en faveur d'une LMC, pas de myélofibrose en faveur d'une splénomégalie myéloïde primitive, pas de masse sanguine augmentée en faveur d'une polyglobulie vraie).

### **1-d. Leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) :**

C'est probablement l'un des diagnostics différentiels les plus difficiles : il s'agit d'une entité frontière entre le syndrome myéloprolifératif et le syndrome myélodysplasique. Il existe une hyperleucocytose avec myélémie dont l'élément caractéristique est une monocytose ( $> 1000/mm^3$ ). Des signes cytologiques de myélodysplasie sont également présents. Le diagnostic de LMC peut être exclu par l'absence de chromosome Philadelphie et surtout par l'absence de transcrite de fusion *BCR-ABL* en biologie moléculaire.

## **2. Lors de la phase aiguë :**

Le problème de diagnostic est celui des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) à chromosome Philadelphie. La LAL à chromosome Ph constitue le diagnostic différentiel possible d'une LMC en phase de transformation aiguë de phénotype lymphoïde. Si la présence d'une splénomégalie et d'une myélémie associée à une basophilie oriente plutôt vers un diagnostic de LMC acutisée, seul le caryotype réalisé lors de la rémission après chimiothérapie d'induction permettra de trancher, en montrant dans le cas d'une LMC acutisée la persistance du chromosome Ph dans toutes les métaphases analysées.

## **C. Apports récents de la biologie moléculaire et de la cytogénétique :**

### **1. Étude cytogénétique et moléculaire au diagnostic**

La cytogénétique conventionnelle est la technique de référence pour la détection du chromosome Ph, cependant l'existence de rares cas de translocations cryptiques et variantes ont



favorise le développement des techniques de biologie moléculaire et d'hybridation in situ en fluorescence (FISH) (Arnoldus et al., 1990).

### 1-a. Le caryotype :

Environ 1 million de cellules médullaires, obtenues par ponction sternale ou iliaque, sont mises en culture stérilement pendant 24 à 48 heures ; les mitoses sont alors bloquées en métaphase. Une dénaturation des chromosomes fait apparaître des bandes, ce qui permet, après coloration, leur reconnaissance et leur classement. Le caryotype est établi sur photographies, en tenant compte des recommandations internationales (ISCN 1995). Pour le diagnostic, un nombre de 20 mitoses caryotypées est requis. Pour le suivi des malades, 20 à 30 mitoses sont examinées. Le résultat dépend de la qualité des mitoses obtenues, ce qui peut poser problème chez les patients sous traitement antiprolifératif (Dewald, 1998).

### 1-b. Technique d'hybridation in situ en fluorescence (FISH) :

La FISH utilise les propriétés des séquences d'ADN de se fixer spécifiquement sur leurs homologues cellulaires. Des sondes spécifiques sont fabriquées après clonage des gènes et marquées chimiquement à l'aide de fluorochromes. Les culots de cellules conservés congelés sont étalés sur des lames. Les lames sont prétraitées pour permettre l'accessibilité des sondes aux cibles cellulaires, puis dénaturées. Les sondes sont également dénaturées et l'hybridation est réalisée en chambre humide pendant 18 à 24 heures à 37°C. La lecture se fait, après révélation, au microscope épifluorescence équipé de filtres adaptés. Les métaphases sont repérées au DAPI (contre-colorant) et analysées, les noyaux sont ensuite examinés et comptés, un score est réalisé. Les sondes de première génération qui couvrent spécifiquement les gènes *BCR* et *ABL* sont marquées à l'aide de deux fluorochromes différents (vert et rouge). La présence de la translocation est alors visualisée par un spot de fusion vert-rouge ou jaune localisé sur le dérivé 22q- (Dewald et al., 1998).

## 2. LMC Ph négatives :

Environ 5 % des patients présentant un tableau identique à la LMC Ph+ n'ont pas de chromosome Ph. Environ 30 à 40 % des patients ont un réarrangement *BCR-ABL* détectable par southern-blot et/ou RT-PCR. Les LMC ph négatives *BCR* positives ont le même pronostic, le même degré de réponses à l'interféron et la même évolution vers la TA que les LMC Ph+ et, par conséquent, doivent être traitées de façon identique. Les LMC Ph négatives *BCR* négatives sont



rares (moins de 1% des LMC) et représentent un groupe assez hétérogène au sein duquel différentes entités ont été décrites (leucémie chronique neutrophile, leucémie chronique atypique) (Bennett,1994). L'analyse de la littérature montre qu'un certain nombre de leucémies myélomonocytaires (LMM) chroniques ont été incluses dans la série ancienne de LMC sans Ph.

### 3. Transcrits atypiques et LMC :

Dans environ 1% des cas, un transcrit *BCR-ABL* différent des transcrits canoniques **b2-a2** et **b3-a2** est présent (Melo,1996) Il existe de rares cas de LMC qui expriment le transcrit *m-BCR* rencontré dans les leucémies aiguës avec chromosome Ph. Ce type de transcrit a également été rapporté dans certaines myéloïdes chroniques dites atypiques présentant des caractères cytologiques intermédiaires entre la LMC Ph+ classique et les leucémies myélomonocytaires chroniques (LMMC). Un transcrit dont le point de fusion est situé en 3' de la jonction *m-bcr* (jonction **e6-a2**) a été décrit chez un sujet atteint de LMC Ph négative.

Tout récemment, un nouveau transcrit ayant un point de fusion très distal **e19-a2** et codant pour une protéine P230 a été rapportée au cours de trois cas de leucémies à polynucléaires (Melo, 1996). Le démantèlement de ces nouveaux transcrits semble indiquer que la localisation des points de cassure au niveau des gènes *BCR* et *ABL* soit susceptible de déterminer dans une certaine mesure le phénotype des hémopathies observées. Le transcrit correspondant au gène de fusion réciproque *ABL-BCR* est présent chez 2/3 des patients. Cependant, la signification de ce phénomène demeure peu claire, la protéine correspondant à cet ARN n'a pas été retrouvée.

### 4. Transcrits *BCR-ABL* et sujets normaux :

Une équipe a rapporté récemment que l'ARN chimérique *BCR-ABL* pouvait être détecté chez 30 % des sujets sains au moyen d'une méthode de RT-PCR hautement sensible. Le transcrit était présent à des taux très faibles équivalant  $1/10^8$  cellules. La signification de ces données demeure mal comprise à ce jour et surtout demande une confirmation des résultats par d'autres équipes.( Melo, 1996)

## X. Aspects clinique et biologiques de la leucémie myéloïde chronique



## A. Signes cliniques

L'histoire naturelle de la LMC comprend trois phases évolutives : une première phase dite « chronique », paucisymptomatique, suivie d'une deuxième phase, caractérisée par une accélération de la maladie, et enfin une troisième phase, appelée « transformation aiguë », prenant l'aspect d'une leucémie aiguë secondaire, résistante ou réfractaire au traitement, conduisant au décès du patient en quelques semaines. Il existe donc un passage progressif d'une hyperproduction chronique d'éléments matures variés à une prolifération rapide de cellules immatures (arrêt de la différenciation et emballement d'un ou plusieurs sous-clones). Cette évolution est partiellement expliquée par la physiopathologie de la maladie précédemment décrite. La phase chronique peut parfois passer inaperçue et les malades se présentent directement en phase accélérée ou blastique.

- **Phase chronique :**

Cette première phase est d'installation progressive ; elle dure en moyenne 4 à 5 ans. Les signes cliniques sont souvent insidieux et de nombreux patients sont asymptomatiques au moment du diagnostic, suspecté devant un hémogramme réalisé à titre systématique (40 % des cas). Cependant, trois grands syndromes peuvent se rencontrer :

- une altération de l'état général, liée à l'hypermétabolisme, associant asthénie, amaigrissement et plus rarement une fébricule et des sueurs ;
- un syndrome tumoral, largement caractérisé par une splénomégalie (50 %), parfois responsable d'une symptomatologie digestive ;
- des signes de leucostase, avec en particulier un priapisme, sont aujourd'hui assez exceptionnels.

- **Phase accélérée**

Elle correspond à la transition entre la phase chronique et la phase blastique. Sa durée est de 12 à 18 mois en moyenne. Elle peut cependant être quasi inexistante, la phase blastique étant alors « explosive » (environ 20 % des cas). L'international Bone Marrow Transplantation Registry (IBMTR) a défini des critères cliniques et biologiques de l'accélération, qui précède de peu la phase blastique réfractaire à tout traitement (**Tableau I**) (Speck et al., 1984).

**Tableau I : Critères clinico-biologiques d'accélération selon le registre international des greffes de moelle osseuse (IBMTR) (Speck et al., 1984).**



- Leucocytose difficile à contrôler avec un traitement conventionnel : hydroxyurée ou busulfan
- Doublement rapide du taux de leucocytes (5 j)
- Présence de plus de 10 % de blastes sanguins ou médullaires
- Présence de plus de 20 % de blastes + promyélocytes sanguins ou médullaires
- Présence de plus de 20 % de polynucléaires basophiles ou éosinophiles sanguins
- Anémie ou thrombopénie non due au traitement
- Thrombocytose persistante
- Anomalies cytogénétiques surajoutées
- Majoration brutale de la splénomégalie
- Développement d'une myélofibrose ou d'un chlorome
- Patient en phase chronique mais ayant présenté une crise blastique

- **Phase d'acutisation ou crise blastique**

Elle survient avec un délai médian de 4 ans et se définit par la présence de plus de 20 % de blastes médullaires ou plus de 30 % de blastes et promyélocytes sanguins ou médullaires. Elle s'accompagne en général d'une majoration des signes cliniques d'accélération :

\*altération de l'état général,

\*splénomégalie,

\*anémie,

\*thrombopénie

\*fibrose médullaire et parfois d'une symptomatologie propre :

\*fièvre,

\*hépatomégalie

\*adénopathies et douleurs osseuses.

Comme toute leucémie aiguë, elle est possiblement accompagnée d'un syndrome tumoral et de signes d'insuffisance médullaire. Des localisations blastiques extra médullaires peuvent également se voir, notamment une atteinte méningée ou des chloromes des tissus mous. Deux tiers des acutisations sont de phénotype myéloblastique et un tiers est de phénotype lymphoblastique. La probabilité d'obtenir une seconde phase chronique est faible et celle-ci est de courte durée. Avec des chimiothérapies intensives, elle est de 20 à 30 % pour les transformations myéloblastiques, avec une durée médiane de deuxième phase chronique de 2 à 3 mois, et 60 à 80 % pour les transformations lymphoblastiques, avec une médiane de 6 à 9 mois.

## **B. Signes biologiques:** (Enright, 1995)



L'hyperleucocytose est habituelle, généralement supérieure  $100\,000/\text{mm}^3$ . Il existe une myélémie importante dans laquelle tous les stades de la maturation granuleuse du blaste au polynucléaire sont représentés. La morphologie des cellules est sensiblement normale. Une augmentation du nombre de polynucléaires basophiles est habituelle. La monocytose est en règle élevée en valeur absolue, mais inférieure à 3%. Une anémie normochrome est présente dans environ 50 % des cas. Les constantes érythrocytaires sont faussées en cas de forte hyperleucocytose. Une thrombocytose est présente dans environ la moitié des cas. Des noyaux de mégacaryocytes et des micro-mégacaryocytes sont parfois observés sur le frottis sanguin. La moëlle osseuse est habituellement très riche avec raréfaction des adipocytes et hyperplasie granuleuse considérable (le ratio cellules myéloïdes/érythroïdes étant habituellement entre 10 et 30). Les mégacaryocytes sont très nombreux, parfois dystrophiques. Des macrophages spumeux ayant la morphologie de cellules de Gaucher sont parfois présents. En fait, l'intérêt essentiel du myélogramme est de permettre le prélèvement pour l'analyse cytogénétique.

- Le score des phosphatases alcalines leucocytaires est classiquement égal à zéro.
- Les transcobalamines (I surtout) et la vitamine B12 sont généralement élevées en relation avec l'hyperleucocytose.
- L'uricémie et le taux de LDH sont généralement augmentés.

## IX. Les facteurs pronostiques :

L'étude internationale dirigée par Sokal sur un millier de malades traités selon les pratiques des années 1965-75 a abouti à la définition d'un indice de risque relatif (IR) qui prend en compte quelques éléments simples. C'est l'IR le plus utilisé mais le score d'Hasford serait plus performant en cas de traitement par l'IFN. Le score de Sokal distingue trois catégories de LMC, de gravité dite faible (inférieur à 0,8), intermédiaire (de 0,8 à 1,2) et haute (supérieur à 1,2), avec une survie médiane qui a été de respectivement 66, 52 et 35 mois pour les malades de moins de 45 ans de cette étude. Il permet de comparer la composition de séries de malades entre elles, de comprendre comment les disparités de résultats entre équipes sont dues à des différences de recrutement, et aussi d'introduire une stratification des choix thérapeutiques dans les protocoles en fonction des risques catégoriels. Il ne peut pourtant prédire le sort d'un malade donné : ainsi, dans la série de Sokal où la médiane de survie pour les malades d'indice inférieur à 0,8 a été de 72 mois, 20 % de ceux-ci sont



morts en 33mois, et inversement, 10 % de ceux d'indice supérieur à 1,2 survivaient à 9 ans pour une médiane de leur groupe de 35 mois. On tend cependant à le prendre en compte pour décider, par exemple, du traitement d'un individu : un indice élevé, notamment, peut représenter un argument pour une allogreffe précoce. Par la suite, les modalités de la réponse au traitement initial viennent apporter de nouveaux arguments pronostiques importants. Ainsi l'obtention d'une rémission hématologique dite complète (RCH) (**Voir tableau VII**), stable à 3 ou 6 mois, est primordiale. C'est une condition préalable à une réponse chromosomique à l'IFN, elle-même d'intérêt capital pour la survie (Guilhot et al., 1997 ; Talpaz et al.,1997).

### Indice de Sokal

\*IR = exp {0,0116 (âge - 43,4) + 0,0345 (rate - 7,51) + 0,188 [(plaquettes/700) 2 - 0,563] + 0,0887 (blastés sanguins - 2,10)}.

Pour les sujets d'âge inférieur à 45 ans (limite des greffes à l'époque), une deuxième formule fait intervenir l'hématocrite et le sexe :

\*IR = exp {0,0225 (rate - 8,14) + 0,0324 (blastés - 2,22) + 0,1025 [(plaquettes/700)2 - 0,627] - 0,0173 (hématocrite - 34,2) - 0,2682 (sexe - 1,40)}.

L'âge est en années, le débord de la rate en cm, les plaquettes en milliers/ $\mu$ l, les blastés en %, le sexe en chiffre (masculin=1; féminin = 2).

## XI. Traitements de la LMC :

### A. Traitement de première ligne

L'imatinib à 400 mg/j constitue le traitement de première ligne de la quasi-totalité des patients. L'hydroxyurée est parfois utilisé pendant quelques jours avant la confirmation du diagnostic ou en présence d'un taux de leucocytes très élevé. Le recours à l'allogreffe seul traitement curateur est exceptionnellement envisagé chez de rares patients très jeunes (moins de 20 ans) présentant une LMC de mauvais pronostic avec un score de Sokal élevé. Dans de rares cas de LMC diagnostiqués au stade accéléré ou acutisé, des posologies plus élevées sont prescrites : 600 mg/j ou 800 mg/. Le recours à l'allogreffe médullaire doit alors être envisagé très rapidement. (Michel, 2007).

En général, le traitement des patients atteints de LMC en phase chronique permet de ramener le taux de cellules sanguines à la normale. La rate reprend sa taille normale. La majorité des patients n'ont pas d'infections ni de saignements inhabituels.



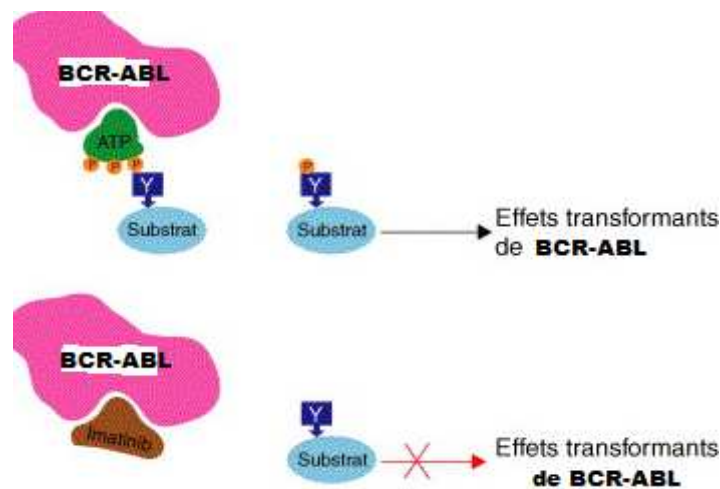
La majorité des patients traités en phase chronique de LMC peuvent poursuivre leurs activités quotidiennes. Avec la pharmacothérapie, la plupart des patients sont asymptomatiques pendant de très longues périodes (rémissions).

Cependant, la pharmacothérapie ne guérit pas les patients de la LMC. On suit ces derniers régulièrement afin de surveiller tout signe de retour de la maladie (rechute). Ils devront subir des examens médicaux réguliers, y compris des analyses sanguines. Parfois, un patient aura besoin d'une analyse de moelle osseuse. Si on arrête la pharmacothérapie ou si elle n'a plus d'effet, la LMC risque de réapparaître. Ces patients ont alors d'autres possibilités de traitement : les inhibiteurs de tyrosine kinase secondaire (Dasatinib et le nilotinib).

### 1. Mécanisme d'action de l'imatinib :

L'imatinib appartient à une nouvelle classe de médicaments : les inhibiteurs de tyrosine kinase (Lugo et al., 1990 ; Daley et al., 1990). Les groupements chimiques phénylaminopyrimidines ont servi de base à la synthèse de très nombreux dérivés capables d'inhiber les protéines-kinases. Parmi les différents dérivés, le CGP57148 B (cyba geigy product) a démontré une capacité d'inhibition importante sur l'activité tyrosine kinase d'ABL et sur celle des récepteurs au platelet-derived growth factor (PDGF) et au stem cell factor (SCF) (Buchdunger et al., 1996). En 1996, Druker et al. ont montré que cette molécule était capable d'inhiber spécifiquement la prolifération de lignées cellulaires murines et humaines transformées par *BCR-ABL* (Druker et al., 1996). Le CGP57148B, renommé par la suite STI571 (signal transduction inhibitor 571), agit par inhibition compétitive de l'adénosine triphosphate (ATP) au niveau du site catalytique de la protéine kinase. L'analyse structurale a permis d'expliquer sa spécificité (Schindler, al., 2000). L'étude en cristallographie du complexe ABL-inhibiteur a en effet montré qu'il existait, au sein du domaine catalytique d'ABL, une poche constituée d'acides aminés dont certains, relativement conservés, sont impliqués dans les interactions avec l'ATP, et d'autres, non conservés (mais variant peu au sein d'un même sous-groupe de kinases), se lient à l'inhibiteur. La formation du complexe kinase-inhibiteur n'est possible que dans une conformation inactive de la protéine (Pluk et al., 2002 ; Smith et al., 2003). **(Figure 10)**.





**Figure 10 : Mécanisme d'action de l'imatinib.** L'imatinib entre en compétition avec l'adénosine triphosphate (ATP) au niveau du domaine tyrosine kinase d'ABL. Le blocage du site catalytique conduit à une inhibition de la phosphorylation des substrats cibles. (Leguay et Mahon, 2005).

## B. Surveillance des patients, critères de réponses :

Le suivi biologique a plusieurs objectifs :

- apprécier l'efficacité du traitement,
- détecter une intolérance au traitement,
- en cas de perte d'efficacité du traitement, préciser le mécanisme d'échappement et détecter l'évolution vers l'accélération ou l'acutisation. (**Tableau II**).

Une surveillance clinique et biologique tous les 15 jours est nécessaire pendant la première partie du traitement, jusqu'à l'obtention de la rémission hématologique complète (RHC) habituellement obtenue en 1 à 2 mois. Cette surveillance conduit dans 10 % des cas environ, à proposer une courte interruption du traitement devant une cytopénie ou une intolérance non hématologique (cutanée, hépatique). La surveillance clinique et biologique usuelle est ensuite poursuivie tous les 3 mois. Le caryotype va permettre de surveiller l'évolution vers la réponse cytogénétique majeure (RCyM) puis complète (RCyC) (**Tableau III**). Une fois la rémission cytogénétique complète obtenue, une surveillance annuelle du caryotype est souhaitable pour détecter en particulier des anomalies clonales pouvant apparaître sur des cellules Philadelphie négatives (Terre C. et al., 2004). La quantification du transcrit *BCR-ABL*, sur un prélèvement sanguin, constitue l'élément essentiel de la surveillance du patient et devra être poursuivie tous les 3 mois pour apprécier la qualité de la réponse moléculaire : rémission moléculaire majeure : RMoM (transcrit



$BCR-ABL < 0,1 \%$ ), rémission moléculaire complète: RMoC (transcrit non détectable). La quasi-totalité des laboratoires d'hématologie moléculaire utilise le même gène de référence, le gène *ABL*, et un principe de standardisation de la PCR quantitative a été récemment proposé au niveau international [8]. La recherche de mutations ponctuelles dans le domaine kinase de la protéine BCR-ABL est indispensable en présence d'un échec du traitement ou d'une réponse suboptimale. Cette recherche de mutation est réalisée avec une technique de PCR associée à un séquençage direct.

**Tableau II : Critères de réponse au traitement : modalités de surveillance (Michel, 2007)**

Réponse hématologique complète (RHC)	Réponse cytogénétique (RCy)	Réponse moléculaire (RMo)												
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Plaquettes <math>&lt; 500.10^9</math> L</li> <li>• Leucocytes <math>&lt; 10.10^9</math> L</li> <li>• Pas de myélémies</li> <li>• Basophilies <math>&lt; 5\%</math></li> <li>• Pas de splénomégalie</li> </ul>	<table border="0"> <tr> <td>Complète (RCyC)</td> <td>Ph+ 0 %</td> </tr> <tr> <td>Partielle (RCyP)</td> <td>Ph+ 1-35 %</td> </tr> <tr> <td>Mineure (RCyM)</td> <td>Ph+ 36- 65 %</td> </tr> <tr> <td>Minime(Rcym)</td> <td>Ph+ 66-95 %</td> </tr> <tr> <td>Aucune</td> <td>Ph+ &gt;95%</td> </tr> <tr> <td>Majeure= majeure + Complète (RCyM)</td> <td></td> </tr> </table>	Complète (RCyC)	Ph+ 0 %	Partielle (RCyP)	Ph+ 1-35 %	Mineure (RCyM)	Ph+ 36- 65 %	Minime(Rcym)	Ph+ 66-95 %	Aucune	Ph+ >95%	Majeure= majeure + Complète (RCyM)		Ratio BCR-ABL/gène de contrôle <ul style="list-style-type: none"> <li>• Réponse complète = transcrits non quantifiables et non détectables (RMoC)</li> <li>• Réponse majeure <math>&lt; 0.10 \%</math> (RMoM)</li> </ul>
Complète (RCyC)	Ph+ 0 %													
Partielle (RCyP)	Ph+ 1-35 %													
Mineure (RCyM)	Ph+ 36- 65 %													
Minime(Rcym)	Ph+ 66-95 %													
Aucune	Ph+ >95%													
Majeure= majeure + Complète (RCyM)														
<b>Suivi :</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tous les 15 jours jusqu'à obtention de la RHC.</li> <li>• Puis tous les 3 mois</li> </ul>	<b>Suivi :</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tous les 6 mois jusqu'à RCyC</li> <li>• Ensuite tous les 12 mois</li> </ul>	<b>Suivi :</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tous les 3mois</li> </ul>												

**Tableau III : évaluation de la réponse à l'imatinib (Michel, 2007)**

	Réponse optimale	Réponse suboptimale	Échec
<b>3 mois</b>	RHC	$< RHC$	Pas de RH
<b>6 mois</b>	RCyP ou RCyC	$< RCyC$	$< RHC$ ou pas de $< RCy$
<b>12 mois</b>	RCyC	$< RCyC$	$< RCyP$



18 mois	RMoM	< RMoM	RCyC
À tout moment	RCyC stable RMo stable	Perte de RMoM Mutation Non 315 et non P.Loop	Perte de RHC Perte de RCyC Mutation 351 ou P.Loop

### C. Résistance à l'imatinib : raisons et solutions possibles

Bien que l'imatinib s'est révélé être une excellente option thérapeutique pour les patients atteints de la LMC, l'émergence d'une résistance ou une intolérance à ce traitement peut affecter jusqu'à un tiers des patients. Certains patients pourraient éprouver une intolérance à l'imatinib en raison des effets secondaires qui nécessitent l'arrêt du traitement. D'autres patients qui répondent initialement au traitement perdent leur réponse après une certaine période de temps et c'est ce qu'on appelle une résistance secondaire.

Une fois qu'un patient a montré une résistance à l'imatinib comme traitement de première ligne, à la dose standard de 400 mg/j, le médecin doit commencer à envisager des traitements alternatifs. Pour ces 20 à 30 % de patients, les options thérapeutiques incluent :

- l'augmentation de posologie de l'imatinib à 800 mg/j. (Kantarjian et al., 2009)
- une thérapie de deuxième ligne utilisant des inhibiteurs de tyrosine kinase de deuxième génération. (Barthe et al., 2001 ; Shah et al., 2002)
- l'association de l'imatinib avec d'autres substances comme avec l'interféron alpha (Nicolini et al., 2010). etc...

### D .Les complications du traitement (Tableau IV):

Plusieurs effets secondaires peuvent parfois s'accompagner avec le traitement surtout à la phase chronique :

- Hyper-uricémie crise de goutte
- Hémorragies secondaires à la thrombopathie
- Splénique : infarctus, rupture de rate, hématome sous capsulaire



- Thrombose : priapisme, thrombose porte
- Leucostase : trouble visuel ou insuffisance respiratoire

**Tableau IV : récapitulatif des modes d'actions et complications liés aux traitements :**

Nom	Hydroxyurée	Aracytine (Ara-C) Cytarabine	Allogreffe	Imatinib
Mode d'action	Anti-métabolique	Anti-métabolique		Inhibiteur de la tyrosine kinase
	Rémission hématologique mais persistance de <i>BCR-ABL</i> . N'augmente pas la survie	Avec l'INF-alpha permet d'obtenir plus de rémission cytogénétique	Seul traitement curatif, mais très toxique (30% des décès)	Réponse cytogénétique qui inhibe BCR-ABL
Effets II <sup>aires</sup>	Stomatite, aphte, troubles digestifs, stérilité, myélotoxicité, sécheresse de la bouche, ulcère au niveau des malléoles	Toxicité hématologique, Alopécie, troubles digestifs, fièvre, myalgies, azoospermie	Aplasia médullaire, rejet de greffe, GVH, maladies veino-occlusive du foie, infections.	Troubles digestifs et crampes, oedèmes, éruptions cutanés, toxicité hépatothique, neutropénie, thrombopénie



# MATERIEL ET METHODES



## I. Matériel :

### A. Patients :

Il s'agit d'une étude rétrospective allant de mai 2010 au janvier 2013 comportant 32 patients. Cette série est associée à une étude prospective comptant 5 patients débutant du mois de janvier 2013 au mai 2013 de tous les âges qui incluent les deux sexes masculins et féminins.

### 1: Prélèvement sanguin :

Le prélèvement est effectué dans des conditions stériles. Dans le cas d'une leucémie avec envahissement de blastes, le sang périphérique sera mis en culture si le nombre est supérieur à 20%.

Le prélèvement de 4ml de sang veineux périphérique est mis dans un tube EDTA (anticoagulant) qui peut se conserver à 4°C pour une durée de 24h ou bien mis en culture le même jour.

Il est aussi important d'avoir la NFS de chaque patient pour connaître les volumes de sang périphérique à ensemer en fonction de la formule suivantes :

(8/GB ; 10/GB ; 12/GB).

### 2: Prélèvement médullaire :

Il se fait par le clinicien en milieu hospitalier à l'aide d'un outil appelé trocart qui permet de percer l'os du sternum, ensuite le clinicien va aspirer le sang médullaire à l'aide d'une seringue.

Une goutte de ce prélèvement sera étalée sur place sur une lame pour effectuer le myélogramme et le reste sera mis dans un tube à EDTA de 4ml puis transporté vers le laboratoire de génétique pour le caryotype ou la FISH. Dans le cas où le lieu de prélèvement est assez éloigné il faut ajouter du milieu de culture (RPMI 1640) pour maintenir les cellules en vies.

### B. Milieu de culture : (Voir annexe)

La culture des cellules généralement médullaires se fera dans un milieu appelé : Marrow Max commercialisé. Il est composé sur un milieu basal RPMI 1640 complété par la L-glutamine, du sérum de veau fœtal et des antibiotiques (pénicilline et streptomycine).

Le milieu ne contient pas d'agents mitogènes il est fourni congelé et prêt à l'emploi après décongélation.



Les volumes obtenus après calcul avec la formule précédente (8/GB,...) sont ajoutés au Marrow Max de volume variant entre 8 à 10 ml puis incubés pendant 24h.

En principe on aura donc 3 tubes par patients.

## II. Méthodes :

### A. Analyse cytogénétique :

La cytogénétique est une science qui s'occupe de l'analyse du nombre et de la structure des chromosomes et ceci par l'intermédiaire des techniques spécifiques de préparations chromosomiques afin d'établir le caryotype.

#### 1-stérilisation :

C'est une étape primordiale pour lutter contre toutes contaminations par les micro-organismes. Ainsi la préparation des différents réactifs nécessaires pour la mise en culture se fait dans une atmosphère stérile, sous une hotte à flux laminaire vertical.

Ceci dit, on procède à la filtration du milieu de culture en employant un système millipore en vue de lutter contre tout risque de contamination de culture.

### B. Caryotype par marquage par bandes R :

#### 1. Principe :

Le caryotype est le processus d'appariement et de mise en ordre des chromosomes d'un individu, qui sert à détecter les anomalies chromosomiques que se soient de nombres ou de structures.

Les lymphocytes sanguins ou cellules médullaires sont mis en culture dans le milieu Marrow Max (MM), puis bloqués en métaphase par la colchicine qui perturbe les fuseaux mitotiques.

Par la suite, les chromosomes seront dispersés par un choc hypotonique, puis fixés par un fixateur à base d'alcool et d'acétate (Méthanol et Acide acétique).

Ces chromosomes seront sujets à une technique de marquage par bandes : permettant de mettre en évidence les bandes constantes et caractéristiques des paires de chromosomes données.



Plusieurs marquages sont utilisés notamment celui des bandes R obtenues après dénaturation thermique ménagée des chromosomes puis coloration par Giemsa.

Enfin la plate-forme CytoVision offre la commodité et le confort de l'analyse à l'écran avec la souplesse des deux configurations logicielles et matérielles, va permettre de capturer et de classer manuellement les différents chromosomes ainsi obtenu sous un ordre de taille décroissant.

## 2. Réactifs nécessaires (Voir Annexe) :

Les réactifs utilisés dans le protocole du caryotype sont:

- ❖ Milieu de culture Marrow Max
- ❖ Colchicine CarylMax 10 mg/ml
- ❖ KCL 0.065 M (1.4g de KCl qsp 300 ml)
- ❖ Carnoy I (3V méthanol ; 1V acide acétique)
- ❖ Earl
- ❖ Giemsa 5% qui est un colorant.

## 3. Protocole expérimental :

### 3-a. Mise en culture des cellules :

Elle s'effectue dans des conditions aseptiques, sous une hotte à flux laminaire vertical, dans des tubes spécifiques, ayant une contenance de 40ml. Le prélèvement sanguin de cellules médullaires obtenues par ponction sternale ou iliaque, sera incubé sous CO<sub>2</sub> stérilement pendant 24 heures. Les mitoses sont alors bloquées en métaphase. Une dénaturation des chromosomes fait apparaître des bandes, ce qui permet, après coloration, leur reconnaissance et leur classement. Le caryotype est établi sur photographies, en tenant compte des recommandations internationales (ISCN 1995) (Mitelman et Karger, 1995). Pour le diagnostic, un nombre de 20 mitoses caryotypées est requis. Pour le suivi des malades, 20 à 30 mitoses sont examinées. Le résultat dépend de la qualité des mitoses obtenues, ce qui peut poser problème chez les patients sous traitement anti-prolifératif. Le tube est ensuite incubé en position inclinée à 37°C pendant 24 à 48h.

### 3-b. Blocage des cellules en métaphase :





Après 24 heures de culture, on y ajoute sous hôte 100 µl de colchicine qui a pour rôle de bloquer les cellules en métaphase. Après avoir bien homogénéisé les tubes on les remet dans l'étuve à 37°C pendant 50 minutes.

### 3-c. Choc hypotonique :

Les cellules sont alors plongées dans une solution hypotonique KCl 0.065 M ce qui entraîne leur gonflement. Cette étape est indispensable à l'obtention d'un étalement correct des chromosomes. La solution doit être à 37°C lors de son utilisation. Après les 50 minutes de blocage, on mélange le tube, on centrifuge à 1500 tr/mn à 25°C pendant 5 mn et on élimine le surnageant pour ne garder que le culot. On suspend ce dernier dans quelques gouttes de la solution de KCl 0.065 M et la dissoudre à l'aide d'une pipette, puis on le complète jusqu'à 12 ml. On homogénéise bien le tube avant de l'incuber à 37°C pendant 20 mn.

### 3-d. Fixation :

Le fixateur ou solution de Carnoy I doit être préparé juste avant son utilisation. Il est constitué de trois volumes de méthanol additionnés d'un volume d'acide acétique. Après le choc hypotonique, on effectue une série de fixations précédée par une préfixation:

#### • Préfixation:

Après le choc sans enlever le volume on ajoute 1ml du fixateur au tube, puis on centrifuge à 1500 tours/mn à 25°C pendant 5 mn et on élimine le surnageant.

#### • Première fixation:

On suspend le culot dans quelques gouttes de Carnoy I on homogénéise puis on complète à 10 ml par la même solution. Mélanger de nouveau les tubes avant de les incuber pendant 20 minutes à la température ambiante. Une fois le temps écoulé on centrifuge à 1500 tr/mn à 25°C pendant 5 mn, on retire le surnageant jusqu'à environ 0.5 ml au du culot.

#### • Deuxième fixation:

Le culot est remis en suspension dans quelques gouttes du fixateur et on complète à 8 ml. On homogénéise et on laisse fixer à température ambiante pendant au moins 45mn. Ensuite, on centrifuge à 1500 tours/mn à 25°C pendant 5 mn et on retire le surnageant jusqu'à environ 1ml. Ensuite on procède à l'étalement.

### 3-e. Étalement :



D'abord on prépare une pièce sous conditions de température de  $22^{\circ}\text{C} \pm 2$  et d'humidité d'au moins  $45\% \pm 5$ . On prépare également des lames à bord rodé sur lequel on note les références du patient (Nom et prénom, numéro du dossier et aussi la date de l'étalement).

On remet le culot en suspension dans quelques gouttes du Carnoy I, on aspire dans l'effilure de la pipette pasteur.

On prépare préalablement un bécher rempli d'eau qui sera posé sur la plaque chauffante jusqu'à évaporation. La pipette pasteur sera tenue horizontalement au-dessus de la lame qui est entrain d'être humidifiée avec la vapeur.

Avec une distance d'à peu près 20 cm, on laisse tomber 2 à 3 gouttes de la suspension cellulaire couvrent la totalité de la lame. Cette dernière est séchée à la température ambiante.

Une fois sèche, les lames seront mises en vieillissement dans l'étuve à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 4 jours pour permettre la déshydratation des chromosomes et pour rendre fragile les liaisons hydrogènes qui lient les deux brins d'ADN, à fin de les préparer pour l'étape de dénaturation.

### 3-f. Dénaturation et coloration au GIEMSA 5% :

Au quatrième jour d'incubation on récupère les lames et on procède à la dénaturation thermique ménagée qui vise les liaisons A=T. Pour cela les lames seront mises dans la solution saline Earl à  $87^{\circ}\text{C}$  dans le bain marie pendant 1 h 30 mn, ensuite on rince les lames et on les met dans une solution de Giemsa 5% (colorant) pendant 8 mn à fin de colorer les chromosomes en bandes claires et sombres. En effet les liaisons A = T dénaturées dans l'étape précédente ne peuvent plus absorber le colorant et apparaissent claires sous microscope, alors que les liaisons  $G \equiv C$  qui sont restées intactes absorbent le colorant et apparaissent sombres sous microscope.

On laisse sécher la lame pour ensuite passer à la lecture, capture, classement, et interprétation des lames à l'aide de la plate-forme cytovision. **(Figure 11)**



**Figure 11:** Microscope binoculaire adapté au caryotype relié à l'ordinateur et qui nous sert à capturer les mitoses qu'on observe sur la lame afin de les classer.

## C. Intérêt de l'hybridation in situ fluorescente (FISH) via la sonde

### **LCI-BCR-ABL :**

#### **1. Principe :**

L'hybridation in situ par fluorescence (FISH) est une technique qui permet de détecter des séquences ADN sur les chromosomes en métaphase ou sur les noyaux interphasiques d'échantillons cytogénétiques fixés cultivés ou non cultivés.

La technique utilise des sondes ADN qui s'hybrident aux chromosomes entiers ou à des séquences spécifiques, et sert de test complémentaire à la cytogénétique classique. L'ADN cible, après fixation, est traité par la chaleur et à la formamide pour dénaturer la double hélice, la rendant simple hélice. L'ADN cible est alors disponible pour hybridation avec une sonde ADN complémentaire simple brin, dénaturée de la même manière et marquée avec un fluorochrome. Après l'hybridation, l'ADN non hybridé et l'ADN non lié spécifiquement sont éliminés par une série de lavages à l'éthanol et l'ADN est ensuite contre-coloré. Un microscope à épifluorescence équipé d'une lampe à mercure de 100 watts et de filtres spécifiques capable d'exciter les différents fluorochromes permet ensuite la visualisation des sondes hybridées sur l'ADN cible.

#### **Caractéristiques de la sonde**



*BCR* (22q11) Fluorochrome vert ; *ABL* (9q34) Fluorochrome rouge

La présence du chromosome Philadelphie (Ph) a des implications importantes en termes de diagnostic et de pronostic dans le cadre de nombreux troubles hématologiques.

## 2. Réactifs nécessaires (Voir annexe) :

- ❖ Solution de lavage : 20 X SSC
- ❖ Solution de lavage : 2 X SSC
- ❖ Solution de lavage : 2 X SSC / 0,1% NP40
- ❖ Solution de lavage : 0,4 X SSC / 0,3% NP40
- ❖ Solution de déshydratation : éthanol 70%,85% et 100%
- ❖ Solution de dénaturation : (70% formamide / 2 X SSC)
- ❖ Sonde Probe LCI BCR-ABL Dual, color, Dual Fusion Probe
- ❖ Tampon d'hybridation des sondes
- ❖ Contre-colorant : DAPI
- ❖ Eau distillée

## 3. Protocole expérimental :

La FISH suit dans ses premières étapes le protocole du caryotype jusqu'à l'obtention des lames étalées et séchées. Sur ces lames la zone riche en mitoses repérée est délimitée à l'aide d'un microscope binoculaire et c'est sur cette zone ciblée que se focalisera les étapes suivantes.

### 3-a. Procédure pour maximaliser la qualité des résultats :

Afin d'obtenir de bon résultats, s'assurer que les réactifs sont utilisés avec les températures adéquates. Vérifier la température dans les bacs à l'aide d'un thermomètre calibré. Les bacs contenant la solution de dénaturation doit être mis dans le bain-marie approximativement pendant 30 minutes avant son utilisation.

### 3-b. Dénaturation des lames :

Une fois qu'on s'est assuré que la température de dénaturation (70% formamide /2X SSC) à l'intérieur des bacs a atteint 73+/- 1°C ; on immerge les lames à l'intérieur pendant 5 minutes.



**NB** : Ne pas mettre simultanément plus de 4 lames dans les bacs.

### 3-c. Déshydratation des lames :

La déshydratation des lames se fera avec l'éthanol à la température ambiante ; après la dénaturation les lames sont plongées pendant une minute dans chacun des 3 bacs dont l'un contient l'éthanol à 70% ; l'autre éthanol à 85% et le dernier l'éthanol à 100%. Pendant la période où on prépare les sondes on laisse immerger les lames dans l'éthanol 100%.

### 3-d. Préparation de la mixture contenant les sondes :

- ❖ Dans un tube eppendorf on prépare un mix contenant :
  - 7 $\mu$ l du tampon d'hybridation
  - 1 $\mu$ l de la sonde
  - 2 $\mu$ l d'eau purifiée
- ❖ Le mix est centrifugé pendant 1 à 3 secondes ensuite vortexer et centrifugé de nouveau.
- ❖ Le tube contenant le mix est ensuite mis dans le bain-marie à 73 +/- 1°C pendant 5 minutes dans pour activer les sondes.

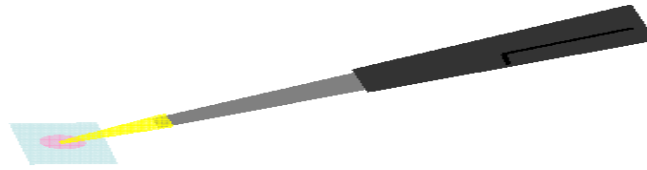
### 3-e. Étape de l'hybridation :

Avant d'appliquer le mix sur la région délimitée auparavant à cause de sa richesse en mitose, les lames sont placées sur la plaque chauffante afin de faire évaporer l'excès l'éthanol sur la lame.

Ainsi 10 $\mu$ l du mix seront appliqués le centre de la région. Cette dernière est recouverte avec une lamelle de façon à faire disperser le mix sur toute la région (**Figure 12**).

Le mix sur le centre de la lamelle et retourner la lame au-dessus.

**NB** : Veiller à éviter la formation des bulles d'aires.



**Figure 12** : dépôt des sondes LCI-BCR-ABL

Ensuite les lamelles sont scellées sur la lame avec du Rubber-cement en couvrant bien les rebords de la lamelle (**Figure 13**).



**Figure 13** : Création de la chambre d'hybridation

Les lames seront placées dans le thermobrite, l'incubation se fera pendant 6 à 16h à 37°C. Pour obtenir un bon résultat avec suffisamment de signal, l'incubation doit se faire pendant une durée de 12 à 16h. (**Figure 14**)



**Figure 14** : Thermobrite utilisé pour l'hybridation des sondes avec leur locus spécifique



**NB** : Le thermobrite doit toujours avoir toutes ses places à lames occupées même si on travaille avec une lame, il faudra les compléter avec des lames neutres. En plus il faut humidifier avec un filet d'eau les bandelettes se trouvant sur le couvercle puis on ferme et on lance le programme.

### 3-f. Lavage post-hybridation :

La procédure du lavage dure 3 minutes et se fait à l'aide de deux solutions :

❖ **Solution 1** : 0,4X SSC/ 0,3%NP-40 qui sera placée au bain-marie à la température de  $73 \pm 1^\circ\text{C}$  pendant au moins 30 minutes avant son utilisation.

**NB** : -Après une journée d'utilisation on doit se débarrasser de la solution  
- Ne jamais laisser les lames sèches afin d'éviter le bruit de fond.  
-Travailler à l'abri de la lumière

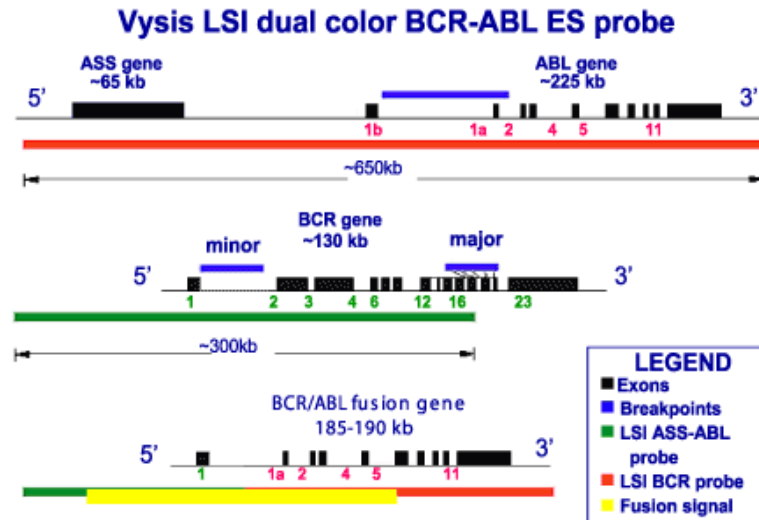
❖ **Solution 2** : 2X SSC/0,1% NP-40 qui sera utilisée à la température ambiante.

- ✓ Préchauffer au bain marie un bac de lavage contenant la **solution 1**.
- ✓ Enlever le **Rubber Cement** à l'aide d'une pince de même que la lamelle. Si celle-ci ne se décolle pas facilement plonger la dans la solution S1 à la température ambiante pour faciliter son détachement.
- ✓ Elles sont ensuite immédiatement immergées dans cette **solution 1** à  $73 \pm 1^\circ\text{C}$  en les agitant 1 à 3 secondes avant de les laisser pendant 2 minutes à l'intérieur.
- ✓ Les lames sont ensuite placées dans la **solution 2** à la température ambiante en les agitant toujours 1 à 3 secondes avant de les laisser immergées pendant 30 à 1 minute.

À présent toutes les étapes sont effectuées, on passe ainsi à la visualisation des sondes hybridées.

### 3-g. Visualisation des hybridations :

- ✓ D'abord il faut bien sécher les lames.
- ✓ Appliquer 10  $\mu\text{l}$  du contre-colorant **DAPI** sur le centre de région
- ✓ Couvrir par la lamelle ou bien on peut placer le DAPI sur la lamelle puis la lame contenant l'échantillon est ensuite retournée sur la lamelle.
- ✓ Pour une bonne fixation du colorant les lames doivent être placées à  $4^\circ\text{C}$  pendant au moins 5mn avant de procéder à la lecture sous microscope à épifluorescence **(Figure 15)**.



**Figure 15 :** Représentation schématique de l'hybridation des sondes BCR-ABL en cas de translocations.

### 3-h. Lecture et interprétation des lames :

Les lames sont lues par un microscope binoculaire équipé d'une lampe à mercure pour la fluorescence. Une combinaison de filtres d'excitation et de filtres d'émission (ou d'arrêt) permettent de choisir respectivement la longueur d'onde incidente et les radiations émises par l'objet excité. Il est alors possible de voir la fluorescence naturelle de l'objet ou d'utiliser des fluorochromes, marqueurs fluorescents, qui se fixent préférentiellement sur certains sites chimiques adaptés aux fluorochromes des sondes utilisées (**Figure 16**). Dans le cas où il y a présence de la translocation on fait le comptage d'au moins 100 noyaux afin d'établir le pourcentage des noyaux présentant la translocation.

Ce pourcentage nous permettra ainsi d'apprécier l'efficacité du traitement lors du suivi du patient.







Figure 16 : Microscope binoculaire à épifluorescence adapté à la FISH et au caryotype

## CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION :

## I .Description générale de tous les résultats des patients présentant la LMC :

### A. Données épidémiologiques :

NB : Les 37 cas qui ont fait l'objet de notre étude sont décrits comme suit :

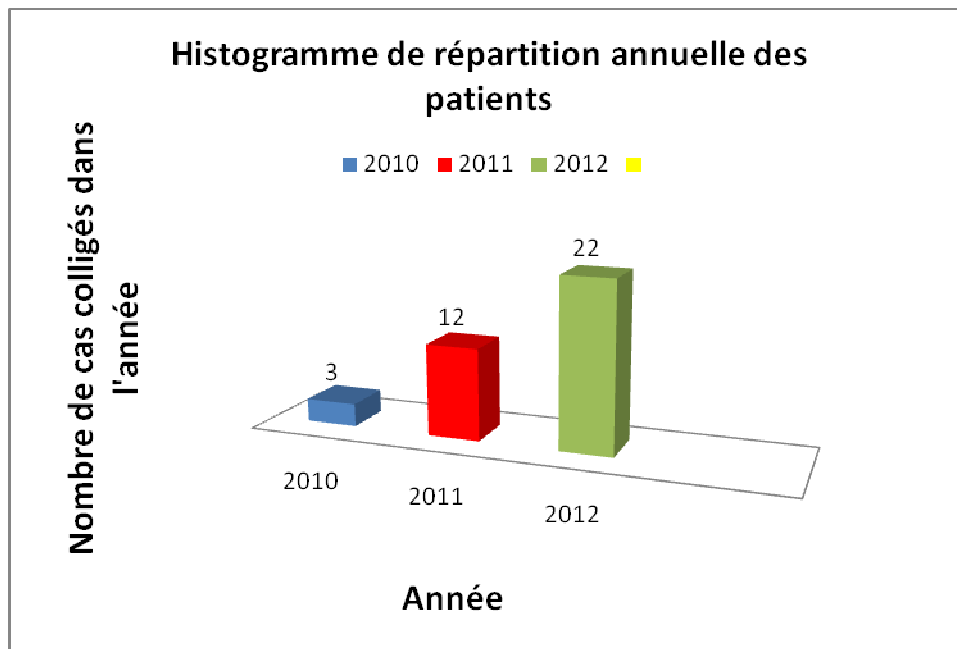


Figure 17 : Histogramme de répartition annuelle des patients de notre série d'étude

### 1. Répartition du nombre de cas en fonction du sexe :

Dans notre série d'étude nous avons constaté que les hommes sont les plus touchés par la LMC que les femmes avec une sex-ratio de 1,64 (**Tableau V**).



**Tableau V : Répartition du nombre de cas des LMC selon le sexe**

Sexe	Nombre de patients	Pourcentage %
Homme	23	62,16%
Femme	14	37,83%
Total	37	100,00

## 2. Répartition du nombre de cas en fonction de l'âge :

L'âge moyen de nos 37 patients au diagnostic est de 45,5 ans avec des extrêmes allant de 5 ans à 78 ans. Ces données nous ont permis de les classer en 4 tranches d'âges différentes sans distinctions de sexe. (Tableau VI ; Figure 18)

**Tableau VI : Tranches d'âge des patients**

Tranche d'âge (années)	Nombre de cas	
>20]	4	
	3 Femmes	1 homme
] 20 ; 40]	11	
	4 femmes	7 Hommes
] 40 ; 60]	13	
	7 Femmes	6 Hommes
] 60 ; 80]	9	
	Une femme	8 Hommes

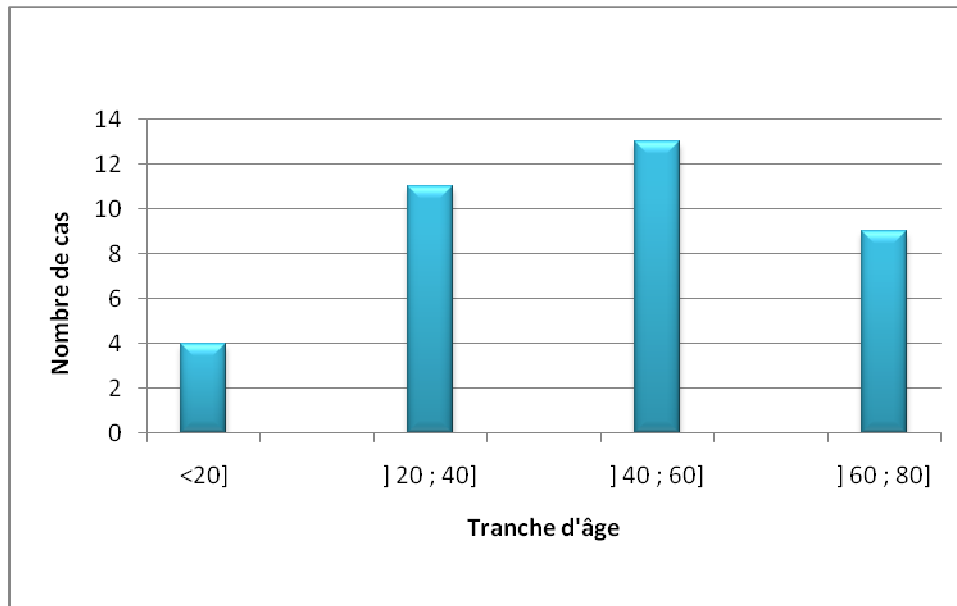
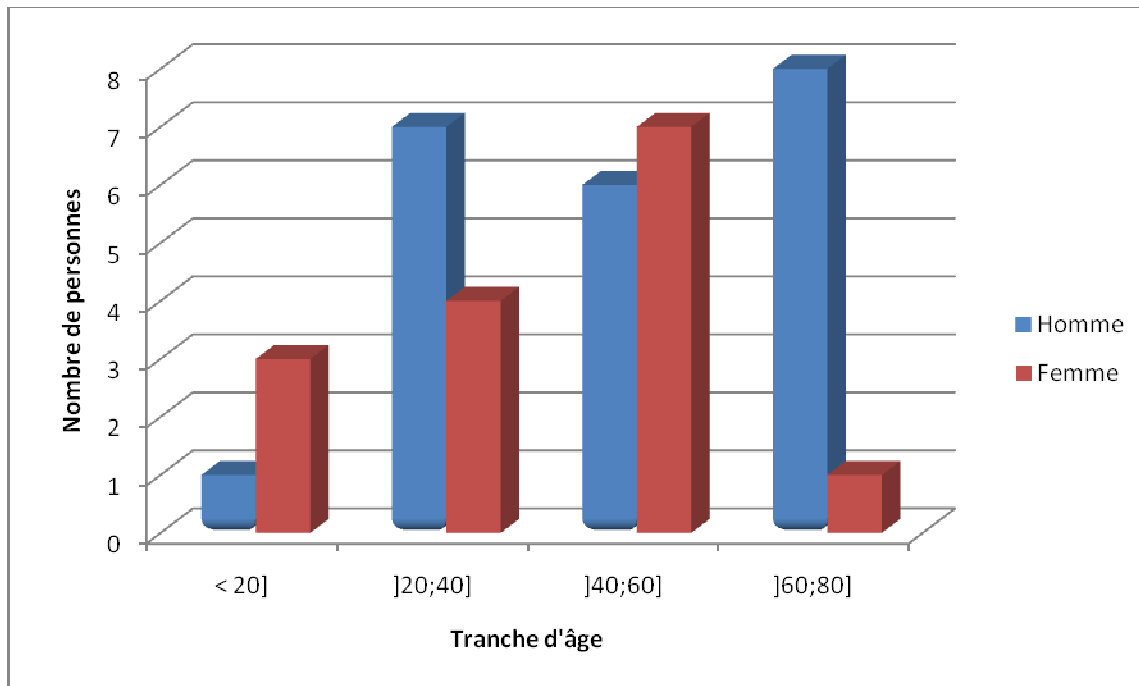


Figure 18 : Répartition des nombres de cas en fonction des tranches d'âge

### 3. Répartition du nombre de cas par sexe en fonction des tranches d'âge:

Les hommes sont plus touchés avec une évolution selon la tranche d'âge un peu irrégulier. Pour les patients âgés de moins de 20 ans un seul cas est observé. Le nombre de cas augmente jusqu'à atteindre son maximum à 7 cas dans la tranche] 20 ; 40]. Cette valeur diminue d'un cas dans la tranche] 40 ; 60] pour atteindre un deuxième pic un peu plus élevé dans la tranche des]60 ; 80] avec 8 cas (**Figure 19**).

En ce qui concerne les femmes une augmentation croissante du nombre de cas selon les tranches d'âges est observée. Pour les patients ayant âgées de moins de 20 ans, 3 cas ont été recensés ; et cette valeur augmente pour atteindre un pic avec 7 cas dans la tranche des ]40 ; 60]. Enfin un seul cas est observé au-delà des 60 ans. (**Figure 19**)



**Figure 19 : Répartition des nombres de cas par sexe en fonction des tranches**

## B. Les facteurs favorisant la LMC :

Sur tous les dossiers étudiés aucun ne mentionne l'exposition d'un patient à des radiations ioniques ou faisant un travail auquel il serait en contact avec du benzène ou de ses dérivés. En outre il se trouve aussi qu'aucun patient n'a eu des antécédents de cancer qui l'aurait mis en contact avec des immunosuppresseurs. Donc les facteurs qui ont favorisé le développement de la LMC sur nos patients restent encore à déterminer.

## C. Étude clinique :

L'étude des dossiers a permis d'enregistrer les différents motifs de consultations, les différentes phases de la maladie et les complications auxquelles les patients faisaient face pendant les traitements ou lors de leur suivi.

Il est à préciser que la phase chronique de la LMC est quasiment asymptomatique, ceci dit que la majorité des patients qui se sont présentés à l'hôpital sont déjà à un stade avancé de leur



maladie (la phase aiguë ou parfois d'accélération), seul sont chanceux ceux pour qui on a suspecté leur LMC lors d'un examen de routine (analyse de sang).

### **1 .Splénomégalie :**

Caractérisée par une augmentation du volume de la rate, la splénomégalie était retrouvée chez 57,89% patients et elle peut dans certains cas être détectée par palpation abdominale.

### **2. Adénopathie :**

Elle désigne une inflammation d'un ou de plusieurs ganglions lymphatiques, soit dans le cadre d'une inflammation, soit dans le cadre d'un cancer. Elle n'est retrouvée que sur un de nos patients.

### **3. Hépatomégalie :**

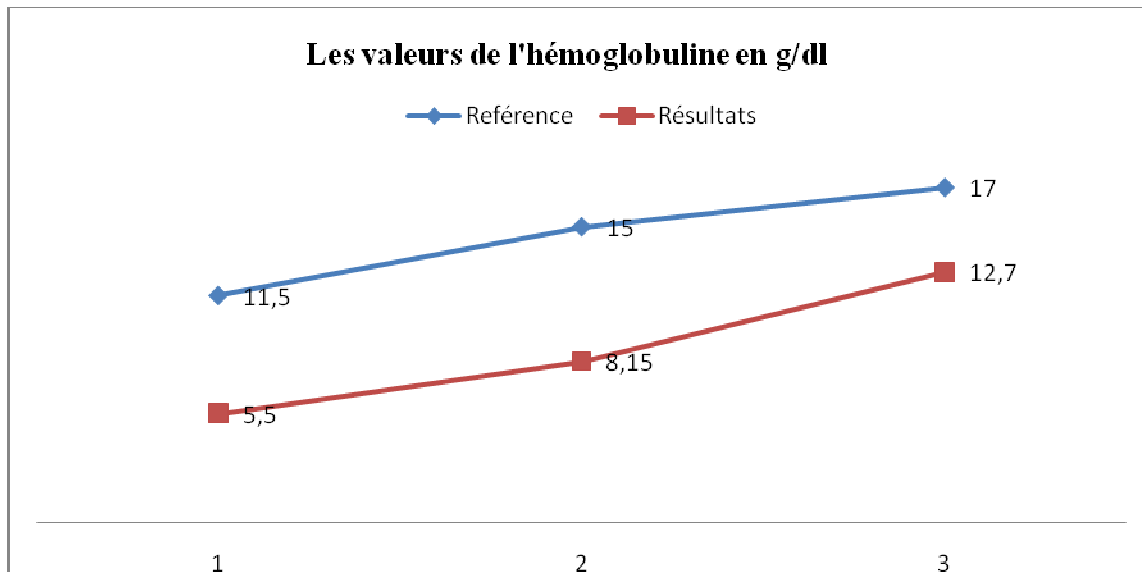
Elle consiste en une augmentation anormale du volume du foie (généralement doublée) d'une modification de sa consistance (le foie apparaît dur, tendu à la palpation). L'hépatomégalie n'est retrouvée que sur deux de nos patients dont l'un est celui qui présenté l'adénopathie.

## **D. Étude para-clinique des signes biologiques :**

### **1. Hémogramme :**

L'anémie est souvent fortement suspectée par la clinique avant d'être confirmée par l'hémogramme. Cet examen a été pratiqué chez tous les malades de notre série. La valeur moyenne normale de l'hémoglobuline (HB) Nnormal est de 15 g/dl, avec des extrêmes allant de 11.5g/dl à 17 g/dl. (**Annexe II**)

Chez nos patients, la valeur moyenne de l'hémoglobuline (HB) est de : 8,15g /dl avec des extrêmes allant 5,5g/dl à 12 ,7g/dl. (**Figure 20**).



**Figure 20 :** Courbe de comparaison des valeurs de l'hémoglobuline de nos patients avec celle obtenue à partir valeurs normales de référence.

### 1-a. Hyperleucocytose :

Le taux de globules blancs (GB) chez nos patients variée entre  $4,8.10^3$  à  $532.10^3/\mu\text{l}$  avec une moyenne au diagnostic d'environ  $180.10^3/\mu\text{l}$ . Nous avons aussi constaté qu'environ 6% de nos patients avait un nombre de GB dans les normes des adultes c'est-à-dire compris entre  $4.10^3/\mu\text{l}$  et  $10.10^3/\mu\text{l}$  ; 37,5% ont un nombre de GB compris entre  $10.10^3/\mu\text{l}$  et  $100.10^3/\mu\text{l}$  et 56,5% de nos patients avaient un nombre de GB 10 fois plus grand que la valeur limite de la norme (**Tableau VII**). Ces résultats montrent une hyperleucocytose franche chez 94% de nos patients (**Figure 21**).

**Tableau VII :** Répartition des taux de leucocytes par microlitre en en fonction de la norme

[4-10] $10^3/\mu\text{l}$ Valeurs normales	[10-100] $10^3/\mu\text{l}$ Hyperleucocytose	>100. $10^3/\mu\text{l}$ Hyperleucocytose
6%	37,5%	56,5%
94%		

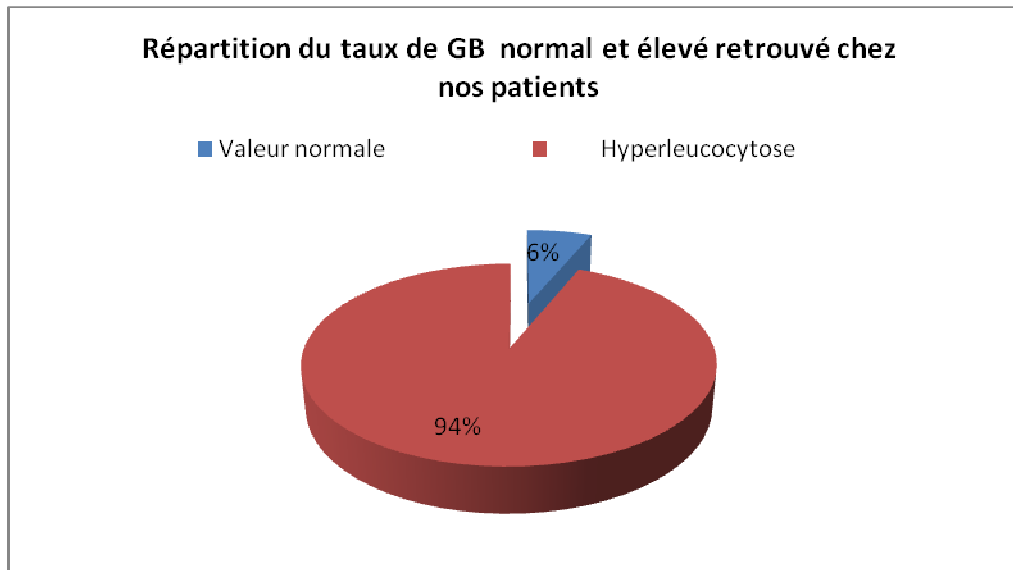


Figure 21 : Diagramme de répartition du Taux des GB normal et élevé chez nos patients

## 2. le myélogramme :

Il est nécessaire au diagnostic pour établir le pourcentage de blastes qui nous permettra de définir la phase maladie (phase chronique, phase d'accélération ou la crise blastique).

Les pourcentages de blastes qu'on avait obtenus grâce aux myélogrammes de nos patients nous ont permis de les classer en 3 groupes de phases différentes.

1<sup>er</sup> groupe: phase chronique (% blastes < 10%), (32 patients).

2<sup>e</sup> groupe: phase d'accélération (10% < % blastes < 20% (on a observé 2cas)

3<sup>e</sup> groupe : phase d'acutisation ou de crise blastique (%blaste >20%) qui correspond à une transformation aiguë (on a eu 3 cas).

## E. Résultats de la cytogénétique classique : caryotype médullaire

Les techniques se feront sur prélèvement de sang si la myélémie est nette, sinon sur prélèvement médullaire. Dans plus de 95% des cas, la présence du chromosome Philadelphie ou Ph qui correspond à un chromosome 22 raccourci, est le résultat de l'installation des symptômes de la LMC. La recherche du chromosome en question se fait par cytogénétique conventionnelle, cytogénétique moléculaire et par biologie moléculaire.

Sur les 31 caryotypes que nous avons réalisé, 17 cas présentent la translocation classique t(9 ; 22) (q34 ; q11), un cas de Ph négatif, et 3 cas de translocations complexes qui se présentent comme suit:





- Mos, 45, X [5] /46, XX [11]
- 46, XY, t (1 ; 9 ; 22)  
Ph (+)
- Mos, 46, XX, t (9; 22) (q34;q11) [22]/46, XX, t (9; 22) (q34; q11) der(6) [12]

et le taux d'échec assez élevé qui est un problème majeur avec toutes sortes de leucémies a été enregistré chez 10 patients. (Voir tableau VIII) :

**Tableau VIII : Résultats des caryotypes de nos patients**

Nom et Prénom	Sexe	Age	Formule chromosomique
Patient 1	H	78ans	Échec de la culture
Patient 2	H	65ans	Échec de la culture
Patient 3	F	48ans	Échec de la culture
Patient 4	F	77ans	Échec de la culture
Patient 5	H	46ans	46, XY, t (9 ; 22) (q34 ; q11)
Patient 6	H	17ans	46, XY, t (9 ; 22) (q34 ; q11)
Patient 7	H	65ans	46, XY, t (9 ; 22) (q34 ; q11)
Patient 8	H	65ans	Mos, 45, X [5] /46, XX [11]
Patient 9	H	5ans	Échec de la culture
Patient 10	F	47ans	Échec de la culture
Patient 11	H	53ans	Échec de la culture
Patient 12	H	63ans	46,XX, t(9;22) (q34;q11)
Patient 13	H	64ans	Ph négatif

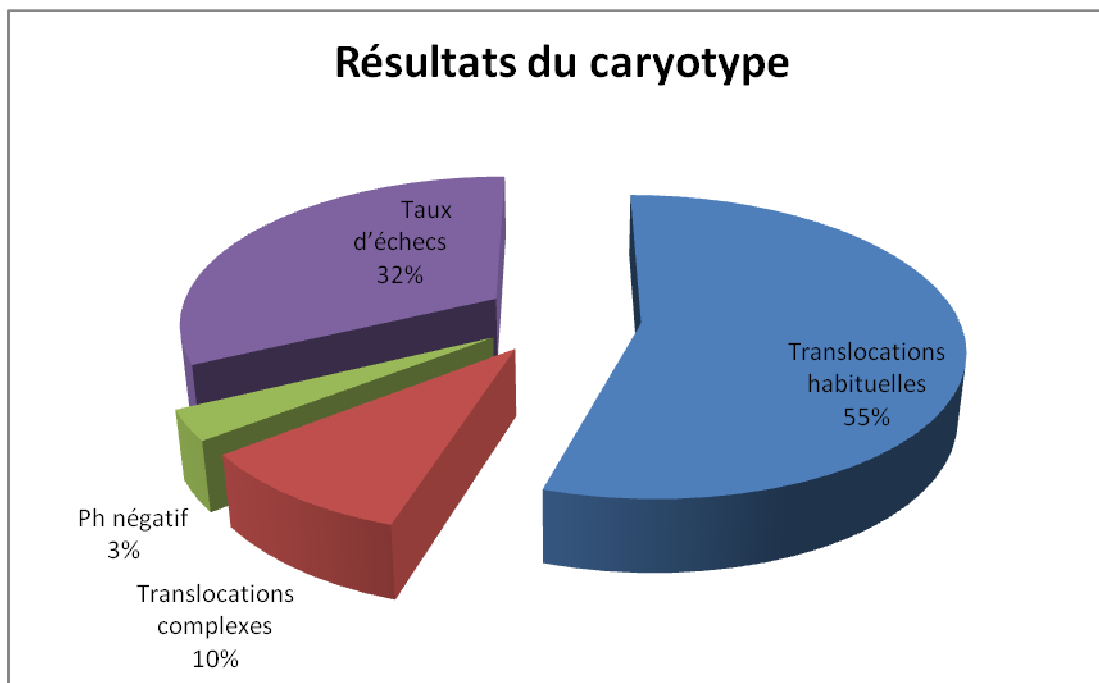


<b>Patient 14</b>	H	30ans	46,XY,t(9;22) (q34;q11)
<b>Patient 15</b>	H		Échec de la culture
<b>Patient 16</b>	F	49ans	46, XX, t (9;22) (q34;q11)
<b>Patient 17</b>	H	64ans	Échec sang coagulé
<b>Patient 18</b>	F	20ans	46, XY, t (9 ; 22) (q34 :q11)
<b>Patient 19</b>	H	59ans	46, XY, t (9 ; 22) (q34 :q11)
<b>Patient 20</b>	H	19ans	46, XY, t (9 ; 22) (q34 :q11)
<b>Patient 21</b>	F	53ans	46, XY, t (9 ; 22) (q34 :q11)
<b>Patient 22</b>	H	40ans	46, XY, t (9 ; 22) (q34 :q11)
<b>Patient 23</b>	F	29ans	46, XY, t (9 ; 22) (q34 :q11)
<b>Patient 24</b>	H	38ans	46, XY, t (9 ; 22) (q34 :q11)
<b>Patient 25</b>	F	35ans	46, XY, t (1 ; 9 ; 22)
<b>Patient 26</b>	H	?	46, XY, t (9 ; 22) (q34 :q11)
<b>Patient 27</b>	H	27ans	46, XY, t (9 ; 22) (q34 :q11)
<b>Patient 28</b>	H	50	46, XY, t (9 ; 22) (q34 :q11)
<b>Patient 29</b>	F	49ans	Mos,46,XX,t(9;22)(q34;q11)[22]/46,XX,t(9;22) (q34;q11) der(6) [12]
<b>Patient 30</b>	H	50ans	46, XY, t (9 ; 22) (q34 :q11)
<b>Patient 31</b>	F	40ans	Échec de culture

L'exploitation du tableau des résultats nous a permis de déterminer les pourcentages des translocations classiques, complexes, les Ph négatifs, et de même que le taux d'échec (**Tableau IX**) et de les répartir en un diagramme de pourcentage (**Figure 22**).

**Tableau IX : Répartition en pourcentage des translocations classiques, complexes et du taux d'échec.**

Translocations Classiques	Translocations complexes	Ph négatif	Taux d'échecs
54,84%	9,68%	3,23%	32,25%



**Figure 22 : Diagramme de % des différents résultats du caryotype**

Maintenant si on considère seulement les nombres de caryotypes interprétables on aura 21 au total avec 20 présentant la translocation et un seul qui est phi négatif c'est-à-dire pas de translocation (**Tableau X**).

**Tableau X: Pourcentage des Ph positifs et négatifs de notre série d'étude**

Ph positif	Ph négatif
95,23%	4,76%

Pour illustrer les différents résultats du caryotype obtenus, nous allons représenter quelques exemples de caryotype classés en métaphase.

### Exemple 1 :

Caryotype classé en métaphase du Patient 5 montrant la translocation classique : 46, XY, t (9 ; 22) (q34 ; q11) (Figure 23)



**Figure 23** : Caryotype en métaphase avec la translocation t (9 ; 22) (q34 ; q11)

### Exemple 2 :

Résultat du caryotype du patiente 8 présentant un mosaïcisme : perte du chromosome X sur cinq mitoses par rapport en : Mos, 46, XX t (9 ; 22) (q34 ; q11) [11]/45, X t (9 ; 22) (q34 ; q11) [5] (Figure 24).

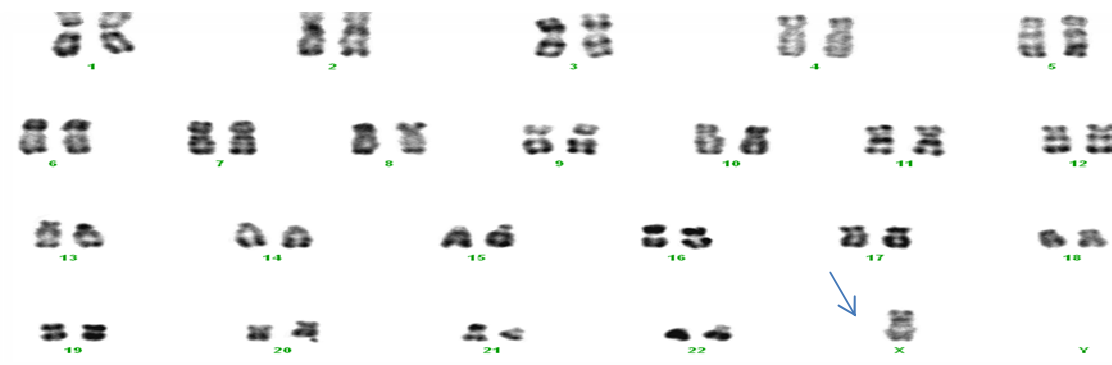


Figure 24 : Résultat du caryotype du patient 8 avec perte du chromosome X

### Exemple 3 :

Résultat du patient 29 qui présente sur les 24 mitoses la translocation classique dans lesquelles 12 présentent aussi un dérivé du chromosome 6 (Figure 25).

Mos,46, XX, t(9;22) (q34;q11) [22]/46, XX, t (9 ; 22) (q34 ; q11) der(6) [12]

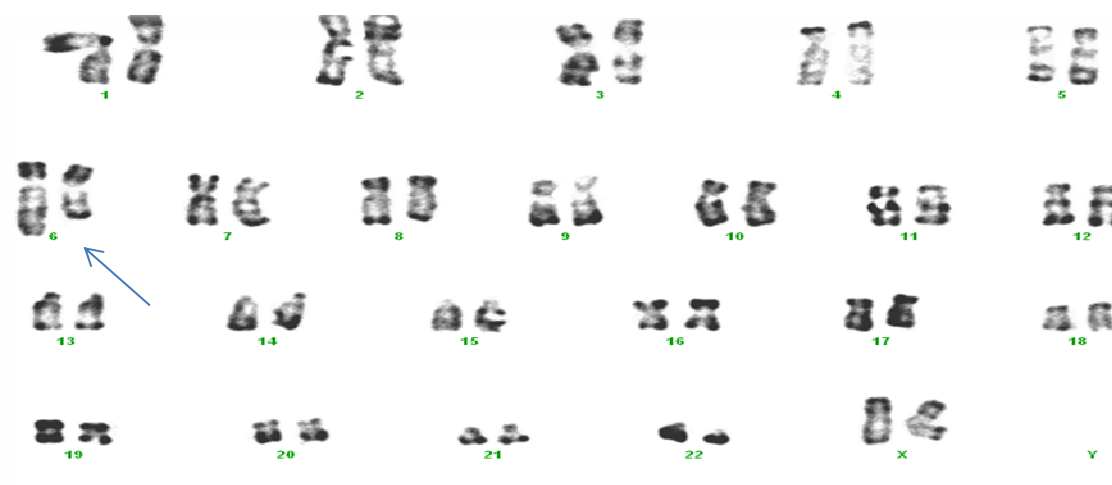


Figure 25 : Résultat du caryotype du patient 29 présentant en plus de la translocation classique un der (6).

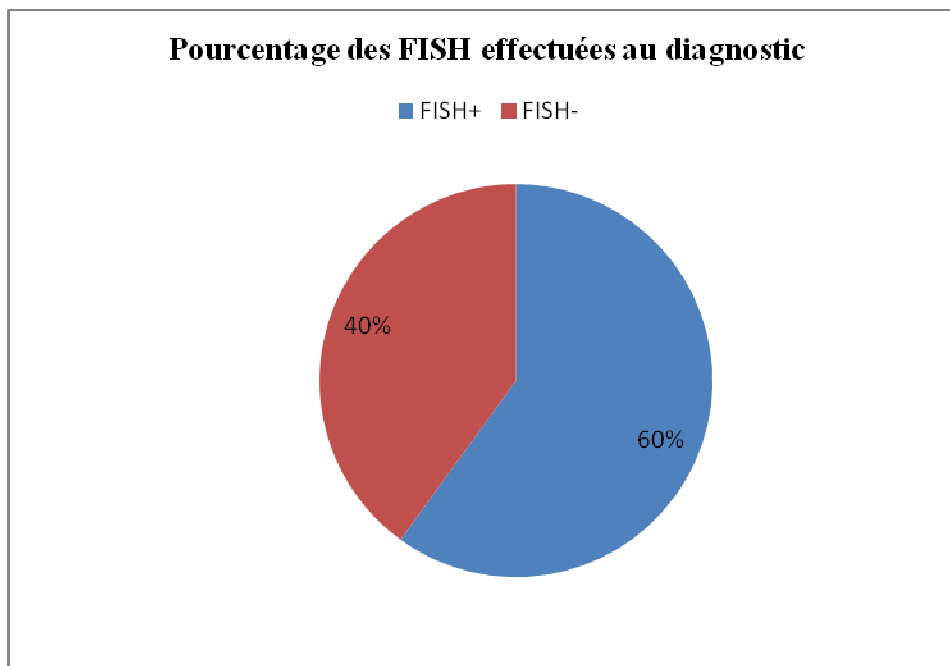
### F. Résultats de la cytogénétique moléculaire (FISH) :

Le plus souvent, le chromosome Ph est retrouvé par l'analyse cytogénétique classique dans la moelle et ou dans le sang. Les techniques de FISH peuvent s'appliquer lorsque l'examen cytogénétique n'a pas révélé la présence de Ph1, ou lors de suivi du patient.

Sur les 10 échecs du caryotype de notre série d'étude, 5 techniques de FISH ont pu être effectuées pour confirmer ou infirmer la présence de la translocation, et par la suite 3 sont positifs et 2 négatifs (**Figure 26**) c'est-à-dire ces derniers ne présentent pas la translocation *BCR-ABL* (**Tableau XI**).

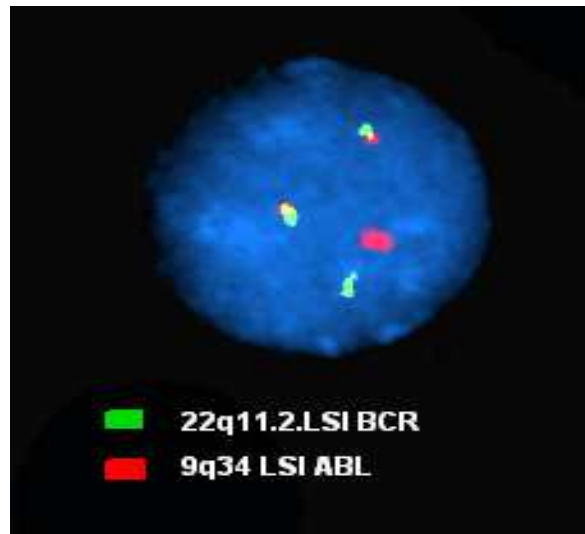
**Tableau XI : Pourcentage du résultat des FISH + et FISH -**

FISH +	FISH -
60%	40%

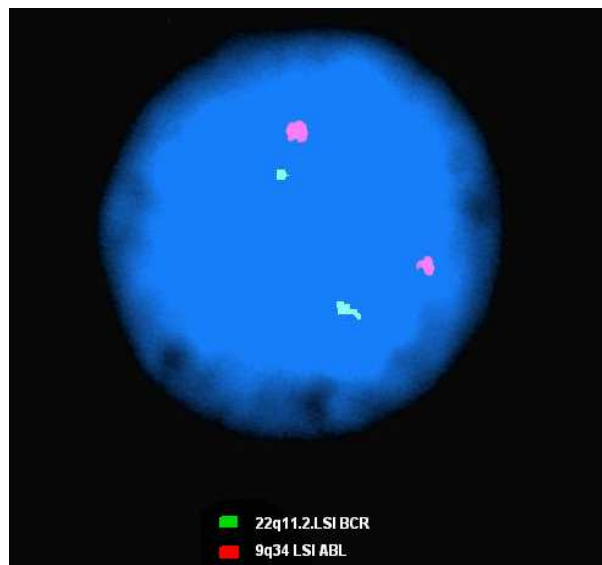


**Figure 26: Diagramme de répartition en pourcentage du résultat des FISH**

Représentation de deux patients de notre série d'étude dont l'un présentait la translocation  $t(9;22)$  (q34 :q11) et l'autre non et qui était FISH- (**Figure 27, 28**).



**Figure 27 : Résultat d'une FISH positive d'un de nos patients**



**Figure 28 : Résultat d'une FISH négative d'un de nos patients**



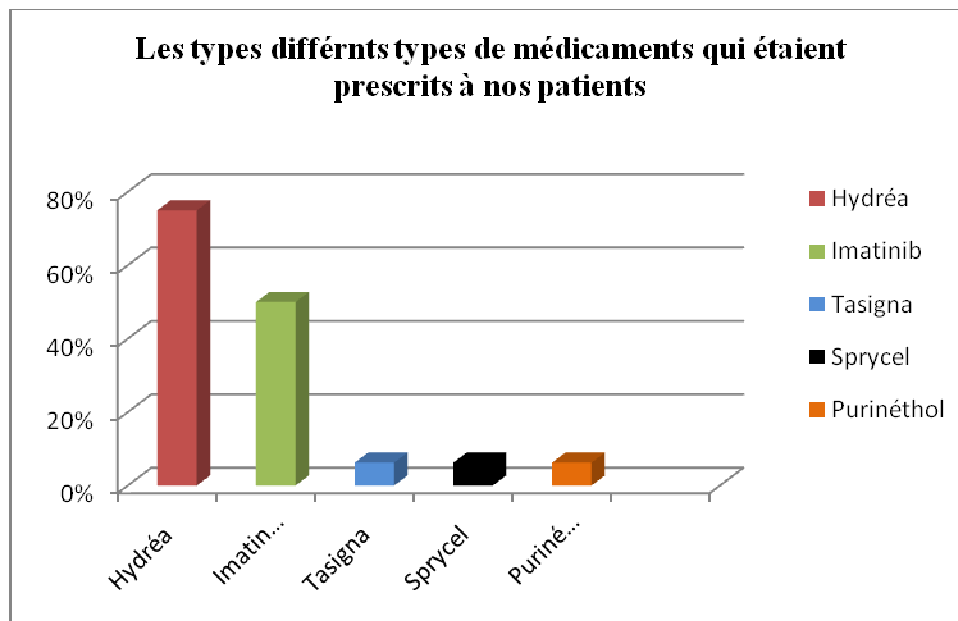
## G. Aspects thérapeutiques:

Les différents types de traitements qui étaient prescrits à nos patients sont l'imatinib, hydréa, sprycel, tassigna, purinéthol.

- ✓ l'imatinib est un inhibiteur de tyrosine kinase de première génération, il était prescrit à 50% de nos patients avec une dose journalière de 400mg.
- ✓ L'hydréa chimiothérapie conventionnelle était prescrit à 75% en moyenne à nos patients avec dose journalière de 3gelules soit comme premier traitement ou deuxième généralement après l'imatinib.

Un seul de nos patients prenait le purinéthol par manque de moyen financier pour se procurer l'hydréa. Parmi les patients qui présentaient des effets indésirables face à l'imatinib, on les a prescrit la moitié de la dose de l'imatinib couplée avec l'interféron. Dans le cas où les effets non souhaités persistent le Tassigna inhibiteur de deuxième génération était proposé (Figure 29).



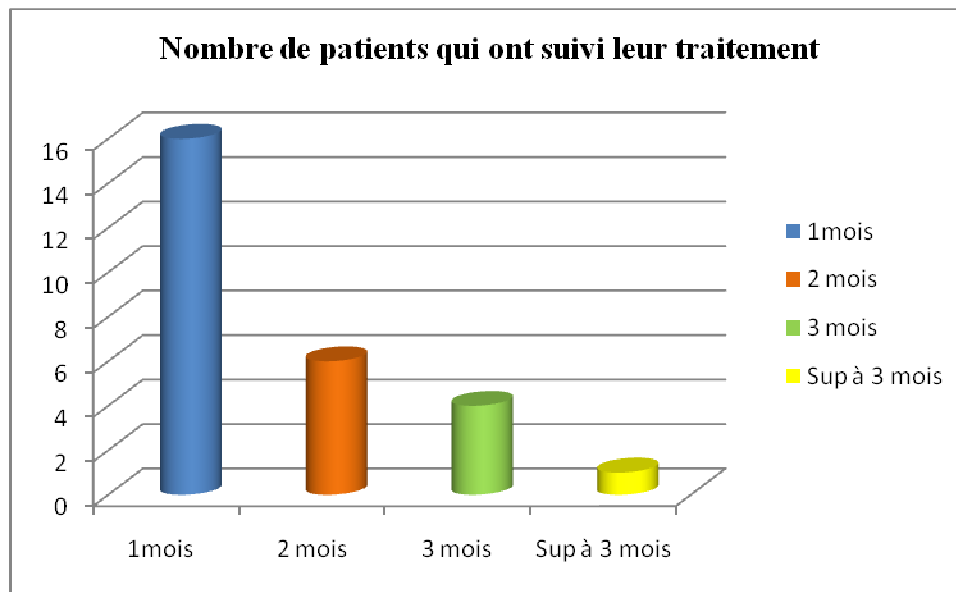


**Figure 29:** Répartition en histogramme du pourcentage des différents médicaments qui étaient prescrits à nos patients.

### 1. Évaluation de la survie sans progression :

Sur nos 37 patients qu'on avait suspecté la LMC, le caryotype et la FISH nous ont permis de confirmer que 23 étaient Phi+. Parmi eux seul 16 ont débuté le traitement, 6 ont continué jusqu'au-delà de 2 mois et parmi eux 2 avaient présenté une réponse hématologique complète (**RHC**).

A 3 mois il n'en restait que 4 patients qui suivaient encore leur traitement ; et au-delà de 3 mois il y'avait seulement un patient qui a continué son traitement et d'ailleurs il a même présenté une réponse moléculaire en d'autres terme il était en cours de rémission (**Figure 30**).



**Figure 30: Résultat du nombre des patients ayant suivi leur traitement en fonction du temps**

## II. Discussion :

### 1. Sur le plan épidémiologique :

#### a .Répartition selon le sexe :

Dans notre série d'étude la sex-ratio est de 1,64 (23 hommes et 14 femmes) avec :

- ❖ Avant 30 ans : 5 hommes et 3 femmes
- ❖ Au-delà de 30 ans : 18 hommes et 11 femmes

Petit et al. 1992, ont rapporté que les deux sexes sont atteints indifféremment sauf avant 30 ans, il existe une prédominance masculine avec un sex-ratio de 2, contrairement à nos résultats. Cette non-conformité peut s'expliquer par la présence d'un petit échantillon qui est recensé sur un court temps comparé à ceux qui ont permis d'établir ces données précédents.



---

### **b. L'âge :**

L'âge moyen dans notre série est de 45,5 ans avec des extrêmes allant de 5 à 78 ans. Par ailleurs, la présence de 3 patients atteints de la LMC et qui sont âgés de moins de 20 ans une chose rare. D'ailleurs le résultat d'une série marocaine de 22 cas de LMC, réalisée à l'hôpital militaire de Rabat en 1997 (Guerraoui, 1997) ne présentent aucun patient de moins de 20 ans. Ces résultats ne font que confirmer les données de la littérature selon lesquels la LMC est observée à tous les âges de la vie avec un maximum entre 30 et 50 ans (Maigre et Harrousseau, 1990).

### **2. Les facteurs favorisants :**

Dans notre série d'étude aucun patient n'avait un antécédent de quelconque cancer qui l'aurait mis en contact à un traitement par des immunosuppresseurs, Personne parmi ces patients ne faisait un travail ou il serait susceptible d'être en contact avec des produits de benzène ou de ses dérivés. Ceci confirme les données de la littérature qui stipule que la LMC n'a pas de cause connue sauf dans de rares cas où on retrouve une exposition aux radiations ionisantes ou au benzène (Teillet 1986 ; Viel et al., 1993). Les immunosuppresseurs exposeraient également au risque de LMC .

### **3. Étude clinique :**

#### **a.**

#### **La**

#### **splénomégalie :**

Elle est retrouvée dans la majorité de nos patients (57,89 %) et représente ainsi le maître symptôme de la maladie chez nos patients comme elle a été aussi démontré dans la littérature (Bories, 2003 ; Benabdeljelil, 1980).

#### **b.**

#### **L'adénopathie :**

Dans notre série d'étude, aucun patient ne présentait l'adénopathie, alors que dans l'étude de l'hôpital militaire Mohammed V de Rabat (Guerraoui, 1997), les adénopathies étaient retrouvées dans 40 % des cas et dans celle de la faculté de Rabat (Benabdeljelil , 1980) dans 35% des cas. L'adénopathie évoque une acutisation de la maladie et sachant nous nous sommes basés sur le taux de blastes (début d'acutisation) pour dire que 8% de nos patients étaient en acutisation nous pouvons donc penser que l'adénopathie est un symptôme d'une acutisation poussée.



c.

L'hépatomégalie

:

Elle n'est retrouvée que chez 2 de nos patients ce qui fait environ 5,45% des cas, moins fréquente comparativement aux séries rapportées dans la littérature (Thiebaud, 1986).

#### 4. Examen para-clinique des signes biologiques :

##### a. L'hémogramme :

L'anémie fortement suspectée lors de la LMC est confirmée par l'hémogramme. Dans notre série d'étude la moyenne de l'hémoglobuline était de 8,15g/dl cette valeur est inférieure à la valeur de la littérature dont la majorité des patients présentent des valeurs d'hémoglobuline qui oscillent entre 10 et 12 g/dl (Guerraoui, 1997). Malgré cette différence elle reste toujours inférieure aux valeurs normales. Ce faible taux de HB accompagné de la splénomégalie, hyperleucocytose etc..... nous permet ainsi de retenir le diagnostic de la LMC et que ce dernier est à l'origine de l'anémie.

##### b. L'hyperleucocytose :

Plus de la moitié de nos patients présentaient un taux de leucocytes compris entre 100 000/mm<sup>3</sup> et 532 000/mm<sup>3</sup> au moment du diagnostic, ces résultats viennent appuyer les données de la littérature selon lesquels ce taux au diagnostic en phase chronique est compris entre 100 000 et 400 000/mm<sup>3</sup> (Jacquillat et Bernard 1975). Ces résultats peuvent être expliqués par le fait qu'il y a d'abord la présence de centres hospitaliers opérationnels dans la plupart des villes et aussi du fait que les gens sont informés et commencent à se soucier de l'état de leur santé de ce fait au moindre malaise ils partent se consulter d'où la raison des découvertes de plusieurs maladies fortuitement, comme par exemple l'hyperleucocytose qui fait partie des signes suspects d'une LMC dont la première phase est pratiquement asymptomatique.

Les résultats du myélogramme qui en plus de l'idée qu'il nous donne sur la lignée touchée (lymphoïde ou myéloïde), nous permet également de définir la phase de la maladie grâce au pourcentage de blastes. Ce dernier nous a permis de montrer que 86,5% de nos patients avaient la LMC en phase chronique et comme on vient de le dire précédemment cette phase est quasiment asymptomatique et ceci vient étayer nos dires précédents.



## 5. Le caryotype médullaire :

La cytogénétique conventionnelle est une technique simple, permettant le diagnostic de 95 % des cas de LMC et le suivi des patients traités en corrélation avec l'évolution clinique. Elle présente en outre l'avantage de dépister des anomalies secondaires importantes pour le pronostic des malades telles la trisomie 8 ou 19, la duplication du Ph, la présence d'un isochromosome 17 (Aurich et al., 1997). Dans notre série d'étude la translocation  $t(9; 22)(q34; q11)$  est retrouvée dans 95% de nos patients ce qui vient corroborer les données de la littérature.

En ce qui concerne les 3 translocations complexes elles correspondent à 3 patients dont leur myélogramme a indiqué que l'un était en phase d'accélération les 2 autres en phase d'acutisation ou crise blastique ceci vient conforter la littérature qui dit que parmi les critères clinobiologiques de la phase d'accélération on trouve les anomalies surajoutées (**Voir Tableau III**).

Tous les chromosomes peuvent être impliqués dans la forme variante de Ph1 surtout les chromosomes 3 ; 11 ; 12; 13 et 17 (Fitzgerald et Morris , 1991).

Les variants peuvent être tous considérés comme des translocations complexes puisque les investigations en génétique moléculaire des supposés variants simples montrent qu'ils impliquent au moins trois chromosomes et toujours le 9 et le 22. (Dobrovic, et al., 1991).

Dans notre série d'études le total des patients en phase accélérée et crise blastique était au nombre de 5, dont les deux au diagnostic était en phase chronique mais par manque de moyen ou à cause d'une mauvaise observance de leur traitement l'un était rentré en phase accélérée l'autre en crise blastique. Ces deux problèmes majeurs dans la LMC sont les seules raisons qui expliquent l'évolution de la maladie vers une phase avancée.

Le taux d'échec assez élevé que nous avons retrouvé au niveau du caryotype peut s'expliquer soit :

- ❖ Par un prélèvement pauvre en cellules.
- ❖ Trajet assez long du lieu de prélèvement au laboratoire, sachant qu'au-delà de 30 minutes après 50% des cellules meurent.
- ❖ Une mauvaise culture cellulaire



Une perte de l'inhibition par contact cellulaire: aussi longtemps qu'elle flotte librement dans le milieu, une cellule normale se divise généralement à chaque 24 heures. Toutefois quand les cellules viennent en contact étroit dans une couche monolamellaire, le taux de mitose ralentit et il y'a inhibition de la division cellulaire. L'inhibition dépend d'un signal inconnu entre les cellules en contact et non d'une substance diffusible agissant à distance.

Dans les cellules cancéreuses, la vitesse mitotiques n'est pas inhibée et dans les cultures, ces cellules tendent à s'empiler pour former des masses irrégulières de plusieurs couches d'épaisseur.

## 6. La cytogénétique moléculaire : La FISH

La cytogénétique classique possède cependant des limites : pour 2,5 % des patients présentant une translocation masquée dont le produit de fusion est visible uniquement en biologie moléculaire, et pour les patients traités par chimiothérapie myélosuppressives chez lesquels il est difficile d'obtenir un nombre suffisant de mitoses de bonne qualité. La technique FISH récemment développée semble particulièrement intéressante en complément de la cytogénétique conventionnelle : au diagnostic, elle permet de confirmer l'existence de la fusion *BCR-ABL* au sein de translocations variantes (Aurich et al. 1997).

Elle est également informative en cas de caryotype complexe (Alimena et al. 1998) et permet de rechercher cette fusion dans les rares cas de LMC Ph négatives (Estop et al. 1997) Pour le suivi des patients en cas d'échec du caryotype ou d'un nombre insuffisant de mitoses, la FISH permet une évaluation quantitative des noyaux encore porteurs de la translocation (Garcia-Isodoro et al., 1997).

Dans notre série d'étude, on a utilisé la FISH juste pour le diagnostic vu qu'aucun de nos patients ne présente un suivi. Et en ce qui concerne le nombre de FISH on a pu effectuer 5 sur les 10 caryotypes qui ont échoué. Cette échec peut être due au fait que :

- le sang était coagulé à l'arrivée au laboratoire ou que le volume du prélèvement est faible ce qui nous impose une seule culture
- Perte de vue du patient ou ce dernier refuse même de refaire la ponction.



## 7. Les aspects thérapeutiques :

### a. Phase chronique

Pour la période chronique, BU et HU, maintenant au deuxième plan, étaient toujours des médicaments de référence, d'utilisation courante (Tanzer, 1996).

L'hydroxyurée, inhibiteur de la ribonucléotide-réductase, est un antagoniste de la synthèse d'ADN qui agit au niveau de précurseurs moins immatures que le busulfan (Myleran comprimés à 2 mg) qui est un alkylant actif sur les cellules souches assez primitives. L'hydroxyurée est très utilisée aujourd'hui en raison de sa rapidité d'action et de sa faible toxicité hématologique, d'inconvénients extra-hématologiques limités, ainsi que de sa souplesse d'utilisation. À la dose de 50 mg/kg/j, il permet souvent d'obtenir une RCH en 1 à 2 semaines. La dose peut être augmentée jusqu'à 80 ou même 100 mg/kg/j au cas, par exemple, d'infarctus splénique, de priapisme ou d'une intervention chirurgicale relativement urgente. L'interruption de l'HU est suivie en peu de jours après d'une remontée de la leucocytose, et un traitement d'entretien est toujours nécessaire à des doses variantes de 10 à 25 mg/kg/j ou autour de 30 mg/kg deux fois par semaine pour maintenir la leucocytose aux alentours de  $5 \times 10^3/\mu\text{l}$ . À la dose requise, la leucocytose reste stable ou peut présenter des oscillations régulières, non inquiétantes.

Cependant l'HU ne permet d'obtenir qu'une RCH de façon très fréquente, mais les métaphases médullaires restent à 100 % Ph+ dans la majorité des cas.

En comparaison avec notre série d'étude on voit que la majorité environ 75% de nos patients ont pris l'hydroxyurée soit comme traitement de base ou après l'imatinib, mais le seul constat qu'on a fait est que chez certains patients qui prenaient l'hydroxyurée et qui en un certain moment ils l'ont arrêté pour des raisons ou une autre, on voit que leur leucocytose commençait à chuter jusqu'à l'arrêt du traitement ou celle-ci remontait de nouveau.

**Exemple d'un patient** qui était mis sous hydroxyurée et par mauvaise observance on voit sa leucocytose qui se triple:

**\*Le 09 février 2012** la patiente suivie pour LMC avec mauvaise observance thérapeutique on voit que ses GB étaient à  $27500/\mu\text{l}$  avec PNN:  $22550/\mu\text{l}$ , blastes 5%.

**\*La patiente est revue le 12 septembre 2012** (7 mois après) : GB :  $96700/\mu\text{l}$  à prédominance PNN :  $67690/\mu\text{l}$  avec 20% de blaste. De ce résultat on constate la mauvaise observance a conduit le patient vers une phase d'acutisation.



La patiente remise sous hydroxyurée est revue le **09 février 2013** voit sa leucocytose qui chute jusqu'à atteindre 33600/ $\mu$ l.

### **b. Phase d'accélération :**

La définition de ce stade intermédiaire est imprécise. L'augmentation de la monochimiothérapie habituelle en réduit mal les signes. Le remplacement de l'HU par le BU, ou vice versa, l'utilisation d'autres produits, la 6-mercaptopurine (Purinéthol) par exemple, peuvent induire un retour à une phase chronique, de courte durée, propice pour une greffe.

Un seul de nos patients en phase chronique était mis sous purinéthol pendant une période où l'hydroxyurée était en rupture cela veut dire que même si le purinéthol peut maintenir le patient ou le ramener en phase chronique il reste quand même moins efficace que l'hydroxyurée.

Depuis l'arrivée des ATK le principe du traitement est révolutionné l'imatinib reste le traitement de première ligne quelle que soit la phase de la maladie.

➤ **En phase chronique :**

400mg/jour est prescrit aux patients, au cas où il y'a une intolérance ou une non réponse les 2<sup>ème</sup> traitements de ligne reste le Dasatinib ou le Nilotinib qui sont des ATK de second génération.

➤ **En phase accélérée et crise blastique :**

Le traitement de première ligne reste l'imatinib avec 600-800mg/jour, ou le dasatinib ou nilotinib en cas de mutations résistantes à l'imatinib, puis l'allogreffe. (**Voir Annexe III.**)

En faisant une comparaison avec notre série d'étude, on voit qu'un seul de nos patients a pris un traitement au nilotinib pendant une année et a obtenu une réponse moléculaire avec disparition de tous les signes biologiques.

En ce qui concerne l'imatinib il a été prescrit à 50% de nos patients mais aucun parmi eux a continué son traitement jusqu'à la rémission moléculaire cela était du soit à une intolérance face à l'imatinib ou que le patient soit épuisé financièrement.





Donc pour résumer on peut dire que les moyens pour le diagnostic de la LMC de même que les traitements sont disponibles et qu'avec un suivi normal associé à une bonne observance, on peut arriver à une rémission totale de la maladie mais le seul inconvénient reste le coût élevé des médicaments et la prise en charge des malades.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES :



## I. Conclusion :

La LMC est une hémopathie maligne caractérisée par un marqueur chromosomique spécifique : le chromosome Philadelphie (Ph) retrouvé dans les cellules médullaires de 95 % de nos malades. C'est une maladie d'évolution tri-phasique : une phase chronique initiale sensible aux traitements myélosuppresseurs est suivie après 4 à 5 ans d'évolution d'une transformation blastique particulièrement rebelle aux traitements et entre les deux phases on trouve la phase accélérée.

La leucémogénèse a été particulièrement bien étudiée grâce aux techniques de la cytogénétique classique et moléculaire et aussi de la biologie moléculaire. Ces techniques ont participé remarquablement au diagnostic et aux avancées thérapeutiques qui ont permis aujourd'hui d'obtenir des rémissions cliniques, puis biologiques, puis cytogénétiques et maintenant moléculaires.

L'imatinib mésylate qui semble une molécule vouée à un avenir prometteur a transformé la prise en charge des patients par son efficacité et par sa facilité d'utilisation. Sa place vis-à-vis de l'allogreffe qui est le seul traitement curateur est à la base de nombreuses discussions. Cependant, bien que sa prescription et sa délivrance soient aussi faciles, que son efficacité soit importante et que ses effets secondaires soient limités, le suivi nécessite une prise en charge dans un service spécialisé, car il importe d'obtenir le plus rapidement possible une réponse moléculaire, en adaptant les doses si nécessaire, ou de détecter au plus vite les cas de résistance. Cette surveillance est la condition d'une prise en charge optimale afin d'améliorer la survie à long terme. Il est alors certain que l'imatinib mésylate va s'inscrire dans une longue continuité d'efforts fructueux pour le



développement des médicaments de demain. Sans oublier l'arrivée des inhibiteurs de tyrosine kinase de deuxièmes générations efficaces dans la plupart des cas de résistance et l'imatinib, va permettre d'améliorer encore cette survie.

## II. Perspectives

• Depuis l'avènement des ATK les objectifs visés pour chaque patient sont :

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

• Pour notre part : pour répondre à ces objectifs il nous faut :

- ✓ Poursuivre le recrutement de patients sous ATK
- ✓ Poursuivre leurs évaluations selon nos deux outils (Caryotype et FISH métaphasique et interphasique)
- ✓ Démarrer la biologie moléculaire la RT-PCR beaucoup plus sensible que la FISH et indispensable dans certains cas pour le suivi des patients.



•Créer des associations ayant pour objectifs:

1. Participer à la lutte contre les différentes leucémies et maladies similaires.
2. Participer à la sensibilisation et à l'éducation des malades.
3. Créer un cadre de rencontre pour les malades, les familles, les médecins traitants ou autres.
4. Sensibiliser les pouvoirs publics et la société civile quant aux contraintes matérielles et morales des malades leucémiques.
5. Encourager les valeurs du bénévolat et du soutien psychologique.
6. Humaniser l'accueil et améliorer les conditions de la prise en charge des malades.
7. Offrir une structure d'accueil aux malades et parents habitant loin des CHU du royaume et suivre la gestion du projet.
8. Coopérer avec les médecins et les laboratoires pour informer les malades leucémiques des dernières nouveautés en matière de recherches et de traitements.



- Abelson HT, and Rabstein LS, **Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice.** *Cancer Res* 1970, 30:2213–22.
- Ahuja H, Bar-Eli M, Advani SH, Benchimol S, Cline MJ. **Alterations in the P53 gene and the clonal evolution of the blast crisis of chronic myelocytic leukemia.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86: 6783-7.
- Albitar M, and Freireich, EJ, **Molecular defects in chronic myeloproliferative disorders.** *Mol Med* 2000, 6: 555-567. Alimena G, Morra E, Lazzarino M, Liberati AM, Montefusco E, Inverardi D, Bernasconi P, et al., **Interferon-alpha 2b as therapy for Ph-positive chronic myelogenous leukemia: a study of 82 patients treated with intermittent daily administration.** *Blood* 1998, 72: 642-647.
- Amarante-Mendes GP, Naekyung Kim C, Liu L, Huang Y, Perkins CL, Green DR, et al., **BCR-ABL exerts its anti-apoptotic effect against diverse apoptotic stimuli through blockage of mitochondrial release of cytochrome C and activation of caspase-3.** *Blood* 1998, 91: 1700-5. Arnoldus EP, Wiegant J, Noordermer IA, Wessels JW, Beverstock GC, Grosveld GC, Van der Ploeg M, Raap AK, **Detection of the Philadelphia chromosome in interphase nuclei,** *Cytogenet. Cell Genet* 1990, 54: 108-111. Aurich J, Dastugue N, Duchayne E, Schlaifer D, Rigal-Huguet E, Rosa Caballin M, **Location of the BCR-ABL fusion gene on the 9q34 band in two cases of Ph-positive chronic myeloid leukemia.** *Genes Chromosome Cancer* 1997, 20:148-154. Austin H, Delzell E, Cole P. **Benzene and leukemia. A review of the literature and a risk assessment.** *Am J Epidemiol* 1988, 127: 419-439.
- Barthe C, Cony-Makhoul P, Melo JV, Mahon JR, **Roots of clinical resistance to STI-571 cancer therapy.** *Science*, 2001, 293:5538-2163. Bartram CR, de Klein A, Hagemeijer A, van Agthoven T, Geurts van Kessel A, Bootsma D, et al. **Translocation of c-ABL oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia.** *Nature* 1983, 306:277-80.
- Bedi A, Zehnbauser BA, Barber JP, Sharkis SJ, Jones RJ. **Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia.** *Blood* 1994, 9:2038-44.



Benabdeljelil A, **un visage de LMC au Maroc**. Thèse en médecine à la faculté de rabat 1980, n°38.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick H, Sultan C: **The chronic myeloid leukaemias : guidelines for distinguishing chronic granulocytic, atypical chronic myeloid, and chronic myelomonocytic leukaemia**. Proposals by the French-American-British group. Br. J. Haematol 1994, 87: 746-754.

Bennett JH. **Case of hypertrophy of the spleen and liver in which death took place from suppuration of the blood**. Edinb Med Surg 1845, J64:413-23. Bories DA, Devergie, L. Lergros, FX. Mahon et al. : **Stratégies thérapeutiques et recommandations pour la prise en charge des atteints de LMC**. Hématologie 2003, 9: 497-512.

Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, Meyer T, Muller M, Druker BJ, et al. : **inhibition of the ABL protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by 2-phenylaminopyrimidine derivative**. Cancer Res 1996, 56: 100-4.

Calabretta B, Sims RB, Valtieri Met al.: **Normal and leukemic hematopoietic cells manifest differential sensitivity to inhibitory effects of C-MYB antisense oligodeoxynucleotides: an in vitro study relevant to bone marrow purging**. Proc Natl Acad Sci USA 1991, 88:2351-5.

Chen Z, Tong, J.H, Dong, S, Zhu, J, Wang ZY, and Chen SJ: **Retinoic acid regulatory pathways, chromosomal translocations, and acute promyelocytic leukemia**. Genes Chromosomes Cancer 1996, 15:147-156. Dai Z,

Quackenbush RC, Courtney KD, Grove M, Cortez D, Reuther GW, et al. : **Oncogenic ABL and Src tyrosine kinases elicit the ubiquitin-dependent degradation of target proteins through a Ras-independent pathway**. Genes Dev 1998, 12:1415-24.

Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D; **induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210<sup>BCR-ABL</sup> gene of the Philadelphia chromosome**. Science 1990, 247:824 -30.

Deininger, MW, Goldman JM, and Melo JV, **The molecular biology of chronic myeloid leukemia**. Blood 2000, 96: 3343-3356.



- Deininger MW, Bose S, Gora-Tybor J, YanXH, Goldman JM, Melo JV: **Selective induction of leukemia-associated fusion genes by high-dose ionizing radiation.** *Cancer Res* 1998,58: 421-5.
- Del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G: **interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase AKT.** *Science* 1997, 278:687-9.
- De Groot RP, Raaijmakers JA, Lammers JW, Jove R, Koenderman L: **STAT5 activation by BCR-ABL contributes to transformation of K562 leukemia cells.** *Blood* 1999, 94:1108-12.
- De Klein A, van Kessel AG, Grosveld G, Bartram CR, Hagemeijer A, Bootsma D, et al. **Acellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia.** *Nature* 1982, 300:765-7.
- De Vita VT, Jr. and Canellos, GP . **The lymphomas.** *Semin Hematol* 1999, 36: 84-94.
- Dewald GW, Wyatt WA, Juneau AL, Carlson OR, et al., **Highly sensitive fluorescence in situ hybridization method to detect double BCR-ABL fusion and monitor response to therapy in chronic myeloid leukemia.** *Blood* 1998, 91:3357-3365.
- Dickstein JI, and Vardiman JW: **Hematopathologic findings in the myeloproliferative disorders.** *Semin Oncol*, 1995, 22: 355-373.
- Dobric A, Morley A, Seshadri R, Januszewicz EH: **Molecular of diagnosis of Philadelphia negative CML using polymerase chain reaction and DNA ANALYSIS clinical features and course of M-BCR negative and M-BCR positive CML.** *Leukemia* 1991, 5: 187-190.
- Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, and Lydon NB , **Effects of a selective inhibitor of the ABL tyrosine kinase on the growth of BCR-ABL positive cells.** *Nat Med* 1996, 2: 561-566.
- Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, et al. : **Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia.** *New Engl J Med* 2006, 355: 2408-17.
- Dubrez L, Eymin B, Sordet O, Droin N, Turhan AG, Solary E. **BCR-ABL delays apoptosis up stream of procaspase-3 activation.** *Blood* 1998, 91: 2415-22.
- Enright H, McGlave PB. **Chronic myelogenous leukemia.** *Curr Opin Hematol* 1995, 2: 293-9.



- Estop AM, Sherer C, Cieply K, **A Ph-negative chronic myeloid leukemia patient with a non-classical *BCR-ABL* rearrangement characterized by fluorescence in situ hybridization** .Cancer Genet. Cytogenetic. 1997, 96:174-176.
- Fialkow PJ, Jacobson RJ, Papayannopoulou T, **Chronic myelocytic leukemia:clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, plateletand monocyte/macrophage**. Am J Med 1977, 63(1):125–30.
- Fitzgerald PH, Morris CM: **complex chromosomal translocations in Philadelphia chromosome serial translocation or a concerted genomic rearrangement cancer genet cyrognet**.1991 46:2231-2234.
- Foti A, Ahuja HG, Alle SL, **Correlation between molecular and clinical events in the evolution of chronic myelocytic leukemia to blast crisis**. Blood 1991,77: 2441-4.
- Garcia-Isodoro M, Tabemero MD, Garcia JL et al., **Detection of the *M-BCR-ABL* translocation in chronic myeloid leukemia by fluorescence in situ hybridization: comparison with conventional cytogenetics and implications for minimal residual disease detection**. Human Pathology 1997, 28:154-159.
- Gellert M, **Recent advances in understanding V(D)J recombination**. Adv Immunol, 1997, 64: 39-64.
- Gewirtz AM, and Calabretta BA: ***C-MYB* antisense oligodeoxynucleotide inhibits normal human hematopoiesis in vitro**. Science 1988, 242: 1303-6.
- Goldman JM, and Melo JV: **Chronic myeloid leukemia advances in biology and new approaches to treatment**. N Engl J Med 2003, 349(15):1451–564.
- Golub TR, Goga, A, Barker, GF, Afar, DE, McLaughlin J, Bohlander SK, Rowley JD, Witte ON, and Gilliland DG: **Oligomerization of the ABL tyrosine kinase by the Ets protein TEL in human leukemia**. Mol Cell Biol 1996, 16:4107-4116.
- Gordon MY, Dowding CR, Riley GP, Goldman JM, Greaves MF: **Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells inchronic myeloid leukaemia**. Nature1987, 328:342-4.
- Griesinger F, Hennig, H, Hillmer F, Podleschny M, Steffens R, Pies A, Wormann B, Haase D, and Bohlander SK: **BCR-JAK2 fusion gene as the result of a *t(9;22)(p24;q11.2)* translocation in a patient with a clinically typical chronic myeloid leukemia**. Genes Chromosomes Cancer 2005, 44: 329-333.
- Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G, **Philadelphia chromosomal**





breakpoints are clustered with in a limited region, *BCR* on chromosome 22. *Cell* 1984, 36:93-9. Groffen J, Voncken JW, Kaartinen V, Morris C, Heisterkamp N: **Ph-positive leukemia: a transgenic mouse model.** *Leuk Lymphoma* 1993, 11(Suppl.1): 19-24. Guerraoui MH, **Leucémie myéloïde chronique : aspects évolutifs et thérapeutiques.** Thèse de la Faculté en médecine de MED V de Rabat 1997, 225. Guilhot F, Chastang C, Michallet M, Guerci A, Harousseau JL, Maloisel F et al : **Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia.** *N Engl J Med* 1997, 337: 233-239. Haber JE: **DNA recombination: the replication connection.** *Trends Biochem Sci* 1999, 24: 271-275. Hanahan D, and Weinberg RA, **the hallmarks of cancer.** *Cell* 2000: 100, 57-70. Hantschel O, and Superti-Furga G, **Regulation of the c-*ABL* and *BCR-ABL* tyrosine kinases.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004, 5:33-44. Heisterkamp N, Jenster G, Ten Hoers J, Zevich D, Pattengale PK, Groffen J, **Acute leukemia in *BCR-ABL* transgenic mice,** *Nature* 1990,344:251-253. Hiom K, Melek M, and Gellert M, **DNA transposition by the *RAG1* and *RAG2* proteins: a possible source of oncogenic translocations.** *Cell*1998, 94: 463-470. Huret JL, Atlas Genet Cytogenet Oncol Haemato 2000. Hu Y, Liu Y, Pelletier S, Buchdunger E, Warmuth M, Fabbro D, et al. : **Requirement of Src kinases *Lyn*, *Hck* and *Fgr* for *BCR-ABL1*-induced B-lymphoblastic leukemia but not chronic myeloid leukemia.** *Nat Genet* 2004,36:453-61. IARC: INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER . **IARC Monograph the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans: Manmade Fibres and Radon.** IARC 1988, vol 43. Jacquillat C, and Bernard , **facteurs pronostic de LMC (à propos de 798 observations).** Actualités hématologiques, Masson et Cie 1975, 9<sup>o</sup>série Paris. Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, Muijtjens M, Jones C, Zehnder JL, et al. : **Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stemcells in blast-crisis CML.** *Engl J Med* 2004, 351:657-67. Kantarjian H, Talpaz M, Dhingra K, Estey E, Keating MJ, Ku, Trujillo S, Huh JY, Stass S, and Kurzrock R: **Significance of the P210 versus P190 molecular abnormalities in adults with Philadelphia chromosome-positive acute leukemia.** *Blood*1991, 78: 2411-2418.



Kantarjian H, Pasquini R, Levy V, Jootar S, Holowiecki J, Hamerschlag N, et al. :

**Dasatinib or high-dose imatinib for chronic-phase chronic myeloid leukemia resistant to imatinib at a dose of 400 to 600 milligrams daily: two-year follow-up of a randomized phase 2 study (START-R).** *Cancer* 2009; 115 (18): 4136–47.

Kantarjian HM, Deisseroth A, Kurzrock R, Estrov Z, Talpaz M, **Chronic myelogenous leukemia: a concise date** *Blood* 1993, 82: 691-703.

Kelman Z, Prokocimer M, Peller S et al. : **Rearrangements in the P53 gene in Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia**

[See comments]. *Blood* 1989, 74: 2318-24.

Kendall GM,

Smith TJ: **Doses to organs and tissues from radon and its decay products** *Radiol. Prot* 2002, 22: 389-406.

Radiol. Prot

LeMaistre A,

Lee MS, Talpaz M, Kantarjian HM, Freireich EJ, Deisseroth AB, et al. : **Ras mutations are rare late stage events in chronic myelogenous leukemia.** *Blood* 1989 ;73:889–91.

oncogene

Blood 1989

Leguay T, and Mahon FX: **Leucémie myéloïde chronique.** *EMC-Hématologie* 2005, 2:187– 205.

Levine AJ, Momand J, Finlay CA, The **P53 tumor suppressor gene.** *Nature* 1991,351: 453-6 .

Lewin

B, **Gènes VI**, Traduction de la 6<sup>e</sup> édition anglaise par Chrystelle Sanlaville 1998.

Liu E,

Hjelle B, Bishop JM: **Transforming genes in chronic myelogenous leukemia.** *Prod Natl Acad Sci USA* 1988,85: 1952-7.

leukemia. Prod

Lugo T, and Witte ON:

**The BCR-ABL oncogene transforms Rat l cells and cooperates with v-MYC.** *Mol Cell Biol* 1989, 9: 12-63.

Lugo TG, Pendergast AM, Muller

AJ, Witte ON: **Tyrosine kinase activity and transformation - oncogene products.** *Science* 1990, 247:1079 -82.

-tion potency of BCR-ABL

Lugo TG, Pendergast AM,

Muller AJ, Witte ON: **Tyrosine kinase activity and transformation potency of BCR-ABL oncogene products.** *Science* 1990, 247: 107-982.

transformation potency of BCR-ABL

Maigre M, Harrousseau JL, **Leucémie myéloïde chronique : acquisitions récentes.** *Le concours médical* 1990 :112-19.

Manning G,

Whyte DB, Martinez R, Hunter T, and Sudarsanam S: **The protein kinase complement of the**



- human genome. Science 2002, 298:1912-1934. Mashal R, Shtalrid M, Talpaz M et al. : **Rearrangement and expression of P53 in the chronic phase and blast crisis of chronic myelogenous leukemia.** Blood 1990, 75:180-9.
- Matulonis U, Salgia R, Okuda K, Druker B, Griffin JD: **Interleukin-3 and P210<sup>BCR-ABL</sup> activate both unique and overlapping pathways of signal transduction in a factor-dependent myeloid cell line** [See comments]. Exp Hematol 1993, 21: 1460-6. McWhirter
- Gahon A, Bissonnette R, Schmitt M, Cotter KM, Green DR, Cotter TG: **BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death.** Blood 1994, 83: 1179-87. McWhirter
- JR, Galasso DL, and Wang JY: **A coiled-coil oligomerization domain oncogene mutations are rare late stage events in chronic myelogenous leukemia.** Blood 1989, 73: 889-91.
- Melo JV : **Molecular biology of chronic myeloid leukemia.** Leukemia 1996, 10: 751- 756
- Melo JV, **The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype.** Blood 1996, 88: 2375-84.
- Michel Tulliez : **cytogenetic nomenclature** . Traitement de la leucémie myéloïde chronique 2007, p26.
- Mitelman E, Karger Basel: **an international system for human cytogenetic nomenclature** ISCN 95 1995. Mohamed
- SD: **Thèse sur le mécanismes de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase sur le modèle de leucémie myéloïde chronique.** Université du droit et de la santé Lille-2, 2009 .
- Mori N, Morosetti R, Lee S, Spira S, Ben-Yehuda D, Schiller G, et al. : **Allelotype analysis in the evolution of chronic myelocytic leukemia.** Blood 1997, 90: 2010-4.
- Nadia Chouaib, Baptiste Coutaud, Julien Gibon et Julie Janvore (rédactrice) Etudiants du module BCP608 : **signalisation cellulaire**, Université Bordeaux-1 2006.
- Najab A, **LMC de l'enfant.** Thèse en médecine à la faculté de rabat 1981, n°199.
- Nakagoshi H, Nagase T, Kanei-Ishii C, Ueno Y, Ishii S, : **Binding of the C-MYB proto-oncogene product to the simian virus 40 enhancer stimulates transcription.** J Biol Chem 1990, 265: 3479-84. NATIONAL RESEARCH
- COUNCIL. **COMMITTEE ON HEALTH RISKS OF EXPOSURE TO RADON. BOARD ON RADIATION EFFECTS RESEARCH. Health effects of exposure to radon.** National



- Academy Press, USA. BEIR VI report, Washington DC 1999.
- Ness SA, Marknell A, Graf T: **The V-MYB oncogene product binds to and activates the promyelocyte specific mim-1 gene.** Cell 1989, 59: 11 15 20.
- Neubauer A, O' Bryan JP, Fiebler A, Schmidt C, Huhn D, Liu ET : **AXL, a novel receptor tyrosine kinase isolated from chronic myelogenous leukemia.** Semin Hematol 1993, 30:34.
- Neumann E, Ein Fall, Von **Leukaëmie Mit Erkrankung**, Des Knochenmarks. Archive der Heilkunde 1870. Nicolini
- FE, Guerci-Bresler A, Rigal-Huguet F, Maloisel F, et al. : **imatinib plus peg interferon alfa-2a in chronic myeloid leukemia.** N Engl J Med 2010, 363 (26):2511–21.
- Nowell P and Hungerford D: **A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia.** Science 1960, 32:1497. Nowell PC:
- Discovery of the Philadelphia chromosome: a personal perspective.** J Clin Invest 2007, 117: 2033-2035. Nowell PC. **A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia.** Science 1960; 132: 1497.
- O' Bryan JP, Frye RA, Cogswell PC, et al.: **AXL, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase.** Mol Cell Biol 1991,11:5016-31
- Oda T, Heaney C, Hagopian JR, Okuda K, Griffin JD, Druker BJ: **Crkl is the major tyrosine phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia.** J Biol Chem 1994; 269: 22925-8.
- Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Iwama H, Hayashi S, Shay JW, Toyama K: **Telomerase activity and cytogenetic changes in chronic myeloid leukemia with disease progression.** Leukemia 1997,11: 190-4. Okuda K, Golub, TR, Gilliland DG, and Griffin JD: **p210BCR/ABL, P190 BCR-ABL, and TEL/ABL activate similar signal transduction pathways in hematopoietic cell lines.** Oncogene 1996, 13:1147-1152.
- Pane F, Frigeri F, Sindona M, Luciano L, Ferrara F, Cimino R, et al. : **Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR-ABL with C3/A2 junction).** Blood 1996, 88: 2410-4.



- Partanen J, Makela TP, Alitalo R, Lehvaslaiho H, Alitalo K: **Putative tyrosine kinases expressed in K-562 human leukemia cells.** *Prod Natl Acad Sci USA* 1990,87: 8913-7.
- Pelicci G, Lanfrancone L, Salcini , Romano A, Mele S, Grazia M, et al. : **Constitutive phosphorylation of Shc proteins in human tumors.** *Oncogene* 1995, 11: 899-907.
- Pendergast AM, Muller AJ, Havlik MH, Maru Y, Witte ON: **BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner.** *Cell* 1991, 66:161-71.
- Pelz AF, Kroning H, Franke A, Wieacker P, and Stumm M: **High reliability and sensitivity of the BCR-ABL D-FISH test for the detection of BCR-ABL rearrangements.** *Ann Hematol* 2002, 81: 147-153.
- Petit T, Maloisel F : **Aspects thérapeutiques de la leucémie myéloïde chronique.** *Med Strasburg* 1992, 23(1) ; 19-23.
- Pluk H, Dorey K, Superti-Furga G: **Autoinhibition of c-ABL.** *Cell* 2002,108: 247–59. Rabbitts TH: **Translocations, master genes, and differences between the origins of acute and chronic leukemias.** *Cell* 1991, 67: 641-644. Reddy EP, Smith MJ, and Srinivasan A: **Nucleotide sequence of Abelson murine leukemia virus genome: structural similarity of its transforming gene product to other oncogene products with tyrosine-specific kinase activity.** *Proc Natl Acad Sci US A* 1983, 80:3623-3627. Richardson C, and Jasin M: **frequent chromosomal translocations induced by DNA double-strand breaks.** *Nature* 2000, 405: 697-700. Ritz B, Morgenstern H, Froines J, Young BB: **Effects of exposure to external ionizing radiation on cancer mortality in nuclear workers monitored for radiation at Rocketdyne Atomics International.** *Am J Ind Med* 1999, 35: 21-31. Robledo M, Martinez B, Arranz E, Trujillo MJ, Gonzalez Ageitos A, Rivas C, et al.: **Genetic instability of microsatellites in hematological neoplasms.** *Leukemia* 1995, 9: 243:290.
- Rodrigues GA, and Park M: **Oncogenic activation of tyrosine kinases.** *Curr Opin Genet Dev* 1994, 4:15-24.
- Rommens C, LAURIER D, SUGIER A, **Methodology and results of the Nord-Cotentin radioecological study.** *J Radiol Prot* 2000, 20 : 361-380. Rowley JD: **Letter:A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia**



- identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973.
- Rowley JD: **The Philadelphia chromosome translocation: a paradigm for understanding leukemia**, *Cancer* 1990, (65) 21: 78-2184.
- Sawyers CL, **Chronic myeloid leukemia**. *N Engl J, Med* 340 1999, 1330-1333. Sawyers CL, Denny, C.T. and Witte, O.N. **Leukemia and the disruption of normal hematopoiesis**. *Cell* 1991, 64: 337-350. Sawyers CL, Callahan W, Witte ON: **Dominant negative MYC blocks transformation by ABL oncogenes**. *Cell* 1992,70: 901- 10.
- Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J: **Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase**. *Science* 2000, 289:1938 -42.
- Schutte J, Opalka B, Becher R et al. : **Analysis of the P53 gene in patients with isochromosome 17q and Ph-positive or negative myeloid leukemia**. *Leuk Res* 1993,17: 533-9.
- Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, Gorre ME, Paquette RL, Kuriyan J, et al. : **Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia**. *Cancer Cell* 2002, 2:117-25.
- Silly JH, Chase A, Mills KI, Apfelbeck U, Sormann S, Goldman JM, et al. : **No evidence for microsatellite instability or consistent loss of heterozygosity at selected loci in chronic myeloid leukaemia blast crisis**. *Leukemia* 1994, 8:1923-8.
- Smith JM, and Mayer BJ: **ABL: mechanisms of regulation and activation**. *Front Biosci* 2002, 7:31-42.
- Smith KM, Yacobi R, Van Etten RA: **Autoinhibition of BCR-ABL through its SH3 domain**. *Mol Cell* 2003, 1 2: 27-37.8-60. Skorski T, Nieborowska Skorska M, Barletta C et al. : **Highly efficient elimination of Philadelphia leukemic cells by exposure to BCR-ABL antisense oligodeoxy - nucleotides combined with mafosfamide**. *J Clin Invest* 1993 ,92:194-202. Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska-Skorska M, Majewski M, Martinez R, Choi JK, et al. : **Transformation of hematopoietic cells by BCR-ABL requires activation of a PI3k/Akt-dependent pathway**. *EMBO J* 1997,16: 6151-61.



- Speck B, Bortin MM, Champlin R, Goldman JM, Herzig RH, McGlave PB, et al.: **Allogeneic bone-marrow transplantation for chronic myelogenous leukaemia.** Lancet 1984, 1: 665–8.
- Strissel PL, Strick R, Rowley JD, and Zeleznik-Le: **in vivo topoisomerase II cleavage site and a DNase I hypersensitive site colocalize near exon 9 in the MLL breakpoint cluster region.** Blood 1998, 92:3793-3803. Szczylik C, Skorski T, Nicolaides NC, et al. : **Selective inhibition of leukemia cell proliferation by BCR-ABL antisense oligodeoxynucleotide.** Science 1991, 253:5625.
- Talpaz M, Kantarjian H, O'Brien S, Kurzrock R, Anderson MD: **The experience with interferon therapy in chronic myelogenous leukemia.** Cancer Center Goldman JM 1997. Tanaka K, Takauchi K, Takechi M, Kyo T, Dohy H, Kamada N: **High-frequency of RAS oncogene mutation in chronic myeloid leukemia patients with myeloblastoma.** Leuk Lymphoma 1994,13:317-22. Tanzer J, **Leucémie myéloïde chronique.** In : Gorin NC, Philip T, Symann Meds. Manuel pratique d'hématologie et de chimiothérapie. Paris : Frison-Roche 1996, 381-427. Teillet-Thiebaud. **Leucémie myéloïde chronique : étiologie, épidémiologie, physiopathologie.** EMC 13011B67 -1986. Terre C., Eclache V, Rousselot E, Imbert M, Charrin C, Gervais C, Mozziconacci MJ, Maarek O, Mossafa H, Auger N, Dastugue N, Talmant P, Van den Akker J, Leonard C, Khac EN, Mugneret E, Viguie E, Lafage-Pochitaloff M, Bastie JN, Roux GL, Nicolini E, Maloisel E, Vey N, Laurent G, Recher C, Vigier M, Yacouben Y, Giraudier S, Vernant JP, Salles B, Roussi J, Castaigne S, Lessard M : **Report of 34 patients with clonal chromosomal abnormalities in Philadelphia-negative cells during Imatinib treatment of Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia.**Leukemia 2004, 18 (8) 1340-1346. Thiebaud T and Dubreuil M : **Étude clinique de la leucémie myéloïde chronique.** EMC 1986, 13011 B-7.
- Thijsen S, Schuurhuis G, van Oostveen J, Ossenkoppele G: **Chronic myeloid leukemia from basics to bedside.** Leukemia 1999,13: 1646-74.
- Tsujimoto Y, Yunis J, Onorato-Showe L, Erikson J, Nowell PC, and Croce CM: **Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation.** Science, 1984 224, 1403- 1406.



---

Van kaick G, Dalheimer A, Hornik S, Kaul A, Liebermann D, et al. : **The german thorotrast study: recent results and assessment of risks.** Radiat Res 1999,152: 64- 71.

Viel JF, Richardson S, Danel P, et al. : **Child hood leukemia incidence in the vicinity of la hague nuclear wast reprocessing facility (France).** Cancer causes and control 1993 4(4):341-3.

Virchow R, Weisses blut, Frorieps, Notizen : **BCR is essential for the transforming function of BCR-ABL oncoproteins.** Mol Cell Biol 1845, 36:151–6.13, 7587-7595.

Virginie Eclache and François Lejeune : **Détection du chromosome Philadelphie chez les patients atteints de Leucémie myéloïde chronique.** Elsevier 2001.

Vogelstein B, Kinzler KW: **P53 function and dysfunction.** Cell 1992, 70:523-6. Voss J, Posern G, Hannemann JR, Wiedemann LM, Turhan AG, Poirel H, Bernard OA, Adermann K, Kardinal C, and Feller SM: **The leukaemic oncoproteins BCR-ABL and TEL-ABL (ETV6/Abl) have altered substrate preferences and activate similar intracellular signalling pathways.** Oncogene, 2000, 19:1684-1690. Wada C, Shionoya S, Fujino Y,

Tokuhiro H, Akahoshi T, Uchida T, et al. : **Genomic instability of microsatellite repeats and its association with the evolution of chronic myelogenous leukemia.** Blood 1994, 83: 3449-56.

Yunis JJ: **The chromosomal basis of human neoplasia.** Science 1983, 221:227–36. Zutter M, Hockenbery D, Silverman GA, Korsmeyer SJ: **Immunolocalization of the BCL-2 protein with in hematopoietic neoplasms.** Blood 1991, 78: 1062-8.





Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

**Nom et prénom: NDIAYE Samba Ndoucoumane**

**Année Universitaire : 2012 - 2013**

**Titre: Le chromosome Philadelphie : aspects cytogénétique et moléculaire**

### **Résumé :**

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une transformation maligne d'une cellule souche hématopoïétique, caractérisée par une anomalie génétique acquise : le chromosome Philadelphie (Ph), résultant de la translocation réciproque  $t(9;22)(q34;q11)$ , et son équivalent moléculaire, l'oncogène *BCR-ABL*. La protéine BCR-ABL présente une activité tyrosine kinase constitutive qui agit sur les voies de survie et de prolifération. La progression de la maladie vers la phase accélérée puis blastique s'accompagne d'anomalies génétiques additionnelles marqueurs d'une instabilité génomique croissante. La responsabilité de BCR-ABL dans la genèse de cette instabilité génomique est fortement suspectée.

Dans notre série d'étude 95% des patients présentaient la translocation, 86,5% étaient en phase chronique, 5,4% en phase d'accélération et 8,1% en crise blastique. Le problème retrouvé chez nos la majorité de nos patients était la non observance ou principalement l'arrêt du traitement à cause du coût élevé des traitements. Ce problème a fait que un patient qui était en phase chronique a acutisé et plus de la moitié on les a perdu de vu.

Les principaux médicaments qui étaient prescrits à nos patients sont l'imatinib, l'hydroxyurée, purinéthol, interféron, sprycel. Seul un patient était arrivé en rémission moléculaire.

**Mots clés:** Chromosome Philadelphie, tyrosine kinase, imatinib, résistance aux ATK.