



**UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES – FES**



DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE

**PROJET DE FIN D'ETUDES
Licence en Sciences & Techniques :**

Sciences Biologiques appliquées et Santé

Cytogénétique des hémopathies malignes

Présenté par : NAYAZIC HALIM

Encadré par :

Pr. Ouldin Karim C.H.U- Fès

Pr. Guissi Sanae Professeur à La FST de Fès

Soutenu le : 16/06/2015

Devant le jury composé de :

Pr Guissi Sanae : Présidente

Pr Ali Jouti Idrissi : Examineur

Pr Ouldin Karim : Encadrant

Année Universitaire : 2014-2015

DEDICACES :

J'ai le plaisir de dédier ce travail :

***A** mon père, mon premier encadrant, depuis ma naissance ;*

***A** ma très chère mère : qu'elle trouve ici l'hommage de ma gratitude qui, si grande qu'elle puisse être , ne sera à la hauteur de ses sacrifices et ses prières pour moi ;*

***A** mes sœurs et mon frère : Jihane, Zakaria, Majdouline à qui je souhaite beaucoup de réussite et de bonheur ;*

***A** tous mes amies et amis qui me sont chers, à tous ceux que j'aime et qui m'aiment : qu'ils trouvent ici l'expression de mes sentiments les plus dévoués et mes vœux les plus sincères ;*

***Que** dieu le tout puissant vous préserve tous et vous procure sagesse et bonheur.*

Remerciements

Je tiens d'abord à exprimer mes remerciements, ma profonde gratitude et mon grand respect à:

Mr .KARIM OULDIM Professeur responsable de l'Unité de Génétique Médicale et d'Oncogénétique du Laboratoire Central d'Analyses Médicales, de CHU- Fès, pour son soutien durant cette période de stage.

Je présente mes sincères remerciements à mon encadrante :

Mme SANAE GUISSI professeur de la faculté des sciences et techniques.

Je tenais à remercier le membre de jury :

M. ALI TAHRI JOUTI d'avoir accepté de juger mon travail de projet de fin d'étude.

Ma gratitude va également à l'ensemble du personnel de laboratoire qui m'a aidé pendant mon stage avec leurs précieuses directives et leurs judicieux conseils.

Je saisis la même occasion pour remercier tous les professeurs de la faculté des sciences et technique pour leurs enseignements.

Enfin merci à toute personne ayant contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

SOMMAIRE :

| | |
|--|----|
| Abréviations :..... | 5 |
| Présentation du lieu de stage :..... | 6 |
| Introduction :..... | 7 |
| Etude bibliographique | |
| 1. Cytogénétique : | |
| 1-1) Historique : | 10 |
| 1-2) Cytogénétique classique : | |
| 1-2-1) Caryotype normal :..... | 11 |
| 1-2-2) Anomalies du caryotype :..... | 13 |
| i. Anomalie de nombre :..... | 13 |
| Anomalie de structure : | 15 |
| a- Iso-chromosome..... | 15 |
| b- Duplication..... | 16 |
| c- Délétion : | 17 |
| d- Inversion : | 18 |
| e- Translocation : | 19 |
| 1-3) Cytogénétique moléculaire | |
| 1-3-1) Principe :..... | 21 |
| 2. Les Hémopathie malignes | |
| 2-1) Rappel : L'hématopoïèse..... | 21 |
| 2-2) Définition :..... | 22 |
| i'. Lignée myéloïde : | |
| a) LMC : | 23 |
| b) LAM :..... | 24 |
| c) SMD :..... | 25 |
| ii'. lignée lymphoïde : | |
| a'. LAL :..... | 26 |
| b'. LLC :..... | 27 |
| Matériel et méthodes : | 29 |
| Résultats et Discussion : | 39 |
| Discussion : | 46 |
| Résumé : | 49 |
| Référence : | 50 |

ABREVIATIONS:

| | |
|---------------|--|
| 44A : | 44 autosome |
| ABL : | Abelson |
| BCR : | Break point cluster région |
| BFU : | burst forming unit |
| CBFB : | Core-binding factor subunit beta |
| Chrom. : | Chromosome |
| CFU : | colony forming unit |
| del : | délétion |
| Der(16) : | dérivation |
| EPO : | érythropoïétine |
| Fish : | Hybridation In situ en Fluorescente |
| FMR1 : | Fragile X mental retardation 1 |
| GEMM : | granulocyte, érythrocytes, monocytes et mégacaryocytes |
| IL3 : | Granulocyte macrophage colony-stimulating factor |
| Inv : | inversion |
| LAL : | Les leucémies aiguës lymphoblastiques. |
| LAM : | Leucémie Aigue Myéloïde |
| le gène RAR : | récepteurs de l'acide rétinoïque |
| le gène PML : | leucémie promyélocytaire |
| LMC : | Leucémie Myéloïde Chronique |
| MDM2: | Mouse double minute 2 homolog |
| Mo : | Moelle osseuse |
| NFS : | la numération formule sanguine |
| OMS : | organisation mondiale de la santé |
| QI : | Le quotient intellectuel, |
| SMD : | syndrome myélodysplasique |
| t : | translocation |
| TPO : | thrombopoïétine |
| TR : | translocation robertsonienne |

PRÉSENTATION DU LIEU DE STAGE

Le Centre Hospitalier Universitaire Hassan II (CHU) constitue un établissement public destiné à servir une population de plus de 3 millions d'habitants des régions de Fès Boulemane, de Meknès-Tafilalet et de Taza-Al Hoceima-Taounate.

Le Laboratoire Central d'Analyses Médicales est situé au bâtiment J et conçu comme un pôle d'activité hospitalière comportant plusieurs spécialités d'analyses médicales :

- Anatomie pathologique;
- Bactériologie-Immunoanalyses;
- Parasitologie;
- Biochimie et pharmaco-toxicologie;
- Hématologie;
- Génétique médicale et biologie moléculaire.

L'unité génétique médicale et d'oncogénétique, représente une première expérience dans un CHU au MAROC, elle est activement mise en place depuis sa création en Mars 2009.

L'unité de génétique médicale et d'oncogénétique est subdivisée en trois disciplines (clinique, cytogénétique et moléculaire).

Elle assure des activités variées qui comprennent :

- Génétique clinique (activité clinique) :
 - Consultation de génétique (au centre du diagnostic)
 - Conseil génétique (au centre du diagnostic)
 - Consultation d'oncogénétique (au centre du diagnostic)
 - Avis du médecin généticien dans les services cliniques
 - Hôpital de jour (en coordination avec les services cliniques)
- Génétique chromosomique (analyse des chromosomes)
 - Cytogénétique classique (caryotype)
 - Cytogénétique moléculaire (FISH : Hybridation In Situ en Fluorescence)
- Génétique moléculaire (analyse des gènes)

Introduction

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une hémopathie maligne appartenant au groupe des syndromes myéloprolifératifs (ou néoplasies myéloprolifératives selon la classification OMS 2008). Elle est caractérisée par une prolifération dominante de la lignée granuleuse et une anomalie cytogénétique spécifique, correspondant à la translocation du chromosome 9 sur le chromosome 22 (chromosome Philadelphie). La protéine chimérique, codée par le transcrit de fusion BCR/ABL issu de ce réarrangement, a une activité tyrosine kinase constitutivement dérégulée et est directement responsable de la transformation leucémique.

La LMC présente généralement trois phases cliniques, une «phase chronique» relativement bénigne suivie d'une «phase d'accélération» de pronostic sombre, et d'une «phase d'acutisation » (ou phase de transformation aigu) fatale en absence de traitement, qui se base essentiellement sur les inhibiteurs de la tyrosine kinase.

Des analyses de cytogénétique reposant sur le caryotype et l'hybridation fluorescente in situ (FISH) sont indispensables pour diagnostiquer la LMC, pour déterminer la phase de la maladie et aussi pour évaluer son pronostic afin de choisir le schéma thérapeutique adéquat au patient.

L'objectif de ce stage est de :

- Réaliser différentes techniques d'examens cytogénétiques : caryotype et hybridation fluorescente in situ (FISH), au sein du Laboratoire Central d'Analyses Médicales, Unité de Génétique Médicale et d'Oncogénétique du Centre Hospitalier Universitaire Hassan II Fès (CHU), pour diagnostiquer les onco-hématologiques.
- Effectuer une étude clinique, symptomatologique et hématologique avant de débiter le traitement, pour la série des patients pour lesquels un diagnostic des différentes hémopathies malignes a été réalisé à l'Unité de Génétique Médicale et d'Oncogénétique CHU Hassan II Fès.

Etude bibliographique

Les hémopathies malignes constituent un groupe hétérogène dans leur pronostic et leur oncogenèse, mais représentent un modèle privilégié des mécanismes de cancérogenèse chez l'homme, par la présence récurrente d'anomalies génétiques impliquées dans leur processus oncogénique, et la disponibilité de matériel tumoral (1).

La recherche des anomalies chromosomiques acquises des hémopathies malignes est un élément essentiel dans la prise en charge de ces maladies. Les anomalies sont détectées par des techniques de cytogénétique réalisées sur prélèvement médullaire.

1) Cytogénétique :

La cytogénétique est une science qui s'intéresse aux chromosomes. En général, la cytogénétique a pour but de détecter les anomalies chromosomiques constitutionnelles ou acquises grâce à des techniques microscopiques (techniques de bandes, techniques de cytogénétique moléculaire) ou de biologie moléculaire, afin d'établir un diagnostic biologique et d'assurer un conseil génétique. Ces anomalies peuvent être de nombre (plus ou moins de 46 chromosomes), de structure (modification dans la succession de plusieurs locus) ou de réparation (cassures chromosomiques). (2)

1-1) Historique :

La cytogénétique est une science qui s'intéresse aux chromosomes. En général, la cytogénétique a pour but de détecter les anomalies chromosomiques constitutionnelles ou acquises grâce à des techniques microscopiques (techniques de bandes, techniques de cytogénétique moléculaire) ou de biologie moléculaire, afin d'établir un diagnostic biologique et d'assurer un conseil génétique. Ces anomalies peuvent être de nombre (plus ou moins de 46 chromosomes), de structure (modification dans la succession de plusieurs locus) ou de réparation (cassures chromosomiques). (2)

1-1) Historique :

-1819-1952 ou "âge des Ténèbres de la Cytogénétique Humaine" débute par le travail d'un cytologiste D.von Hanseman qui en 1819, était le premier à dénombrer plus de 40 chromosomes dans un tissu humain normal.(3)

-1952-1959 : la cytogénétique débute avec la découverte hasardeuse, en 1952 grâce au chercheur Hsu qui utilise une technique de gonflement cellulaire (choc hypotonique) et permettant la dispersion des chromosomes et donc une meilleure individualisation de chacun d'eux. A l'aide de cette technique, deux cytologistes Albert Levan et Joe Hin Tjio, en 1956, déterminèrent le nombre chromosomique dans les cellules somatiques humaines qui est de 46.(3)

-1959-1969 : Lejeune, Gautier et Turpin dans les comptes-rendus de l'Académie des Sciences (Paris) ont montré la présence chez neuf enfants mongoliens, d'un petit chromosome acrocentrique surnuméraire. Depuis cette date, différentes anomalies de nombre et de structure chromosomiques ont été décrites. (3)

Lejeune et Coll. (1963) ainsi que Carr (1963) établirent que des anomalies chromosomiques peuvent être à l'origine d'avortements spontanés. (3)

-après 1969 La première technique de Banding est due à Caspersson qui utilise la moutarde de quinacrine pour individualiser chaque chromosome par l'apparition de bandes caractéristiques: les bandes Q. La découverte des bandes chromosomiques a amélioré considérablement les potentialités d'analyses comme la localisation de points de cassure, caractérisation des centromères et la nature hétéro-chromatique de certains segments chromosomiques qui n'étaient pas évidents auparavant. (3)

Les techniques de "haute résolution", mises au point par Yunis en 1976, permettent encore d'améliorer la définition cytogénétique des chromosomes car leur résolution est telle qu'elle permet la détection des micro-délétions et micro-duplications. Par conséquent, cette technologie fine rapprocha les résultats de la cytogénétique de ceux de la génétique formelle. (3)

Enfin, l'apparition de l'*hybridation in situ* fluorescente en 1986 et son développement rapide offre aujourd'hui toute une panoplie d'outils permettant une étude de plus en plus fine et précise des chromosomes et de leur structure. (4)

1-2) Cytogénétique classique :

La cytogénétique classique ou caryotype est l'arrangement standard de l'ensemble des chromosomes d'une cellule, à partir d'une prise de vue microscopique. Les chromosomes sont photographiés et disposés selon un format standard, par paire et classés en fonction de :

- La taille
- La position des bandes après coloration
- La position des centromères

1-2-1) caryotype normale :

Dans l'espèce humaine normale, le nombre des chromosomes est de 46. Leur taille et leur forme sont variables. Il existe des chromosomes métacentriques (figure1, a), dont le centromère est en position médiane, des chromosomes sub-métacentriques (fig1, b), dont le centromère est plus près de l'une des extrémités que de l'autre (le chromosome possède alors des bras longs << q >> et des bras courts << p >>) et des chromosomes acrocentriques (fig1, c), dont le centromère est à l'une des extrémités (ces chromosomes ne possèdent alors que des bras longs). (5)

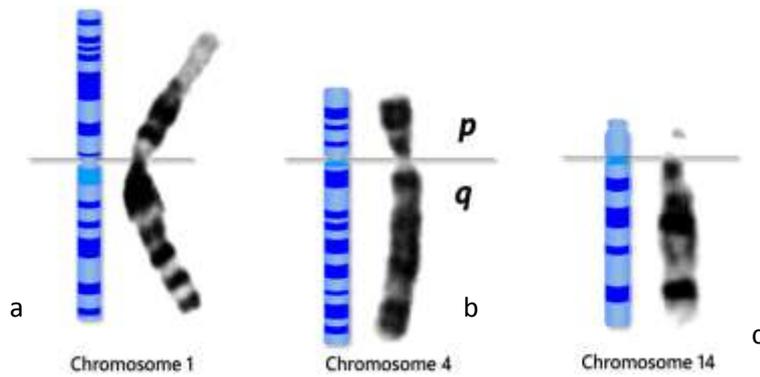


Figure 1 : position des centromères chez les humains :

- a : chromosome métacentrique ;**
- b : chrom. Submétacentrique ;**
- c : chrom. Acrocentrique .**

En tenant compte des différences de taille et de forme des chromosomes, il est possible de les classer en 22 paires d'autosomes et 1 paire de gonosomes.

Les autosomes ont été répartis en 7 groupes :

- le groupe A comprenant les paires 1, 2 et 3 ;
- le groupe B les paires 4 et 5 ;
- le groupe C les paires 6, 7, 8, 9, 10, 11 et 12.
- le groupe D les paires 13, 14 et 15 ;
- le groupe E les paires 16, 17 et 18 ;
- le groupe F les paires 19 et 20 ;
- le groupe G les paires 21 et 22.

Les gonosomes sexuels sont constitués par deux chromosomes X chez la femme et par un chromosome X et un chromosome Y chez l'homme. Le caryotype féminin s'écrit 44A+XX (figure2) et le caryotype masculin 44A+XY. (5)



Figure 2 : Caryotype humain féminin normal 44 A + XX.

Remarque : Sur chaque chromosome, on définit différentes parties (régions) :

- Ces régions sont subdivisées en divers bandes,
- Ces bandes sont subdivisées en plusieurs sous-bandes, et ceci permet de nommer chaque portion du chromosome.

Les caryotypes sont réalisés dans le but de détecter des aberrations chromosomiques.

1-2-2) les anomalies du caryotype :

Dans un certain nombre de syndromes cliniques, il est possible de rattacher les anomalies morphologiques et fonctionnelles de l'individu à des altérations du caryotype. Les anomalies portent soit sur le nombre des chromosomes (chromosomes en excès ou en moins), soit sur leur structure. (5)

i. Anomalies de nombre :

Les anomalies de nombre résultent d'une non-disjonction d'un chromosome entier lors de la méiose (figure 3) :

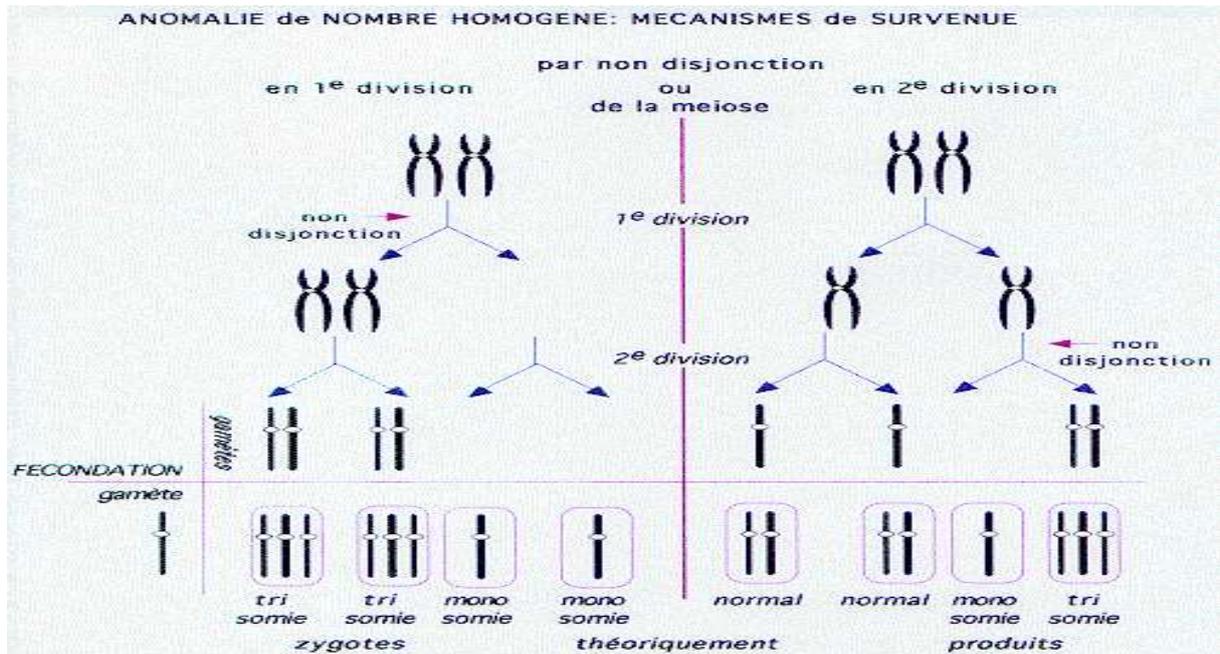


Figure3 : représentation de non-disjonction des chromosomes humain lors de la méiose

Les changements du nombre de chromosomes sont généralement répertoriés en deux groupes:

- Les changements de jeux complets de chromosomes (euploïdie aberrante), le nombre totale de chromosome est un multiple exacte de N.

Exemple : Triploïdie (3n) : 69 chromosomes.

Tétraploïdie (4n) : 92 chromosomes.

- Les changements de parties de jeux de chromosomes (aneuploïdie), résulte souvent de non disjonction des chromosomes pendant la méiose ou la mitose.

Exemple : trisomie (2N +1) = 47 : due à l'existence d'une copie supplémentaire d'un chromosome spécifique en plus de 2 copies (chromosome homologue) normales dans la cellule diploïde, comme dans le cas du Syndrome de triple X : 47, XXX.

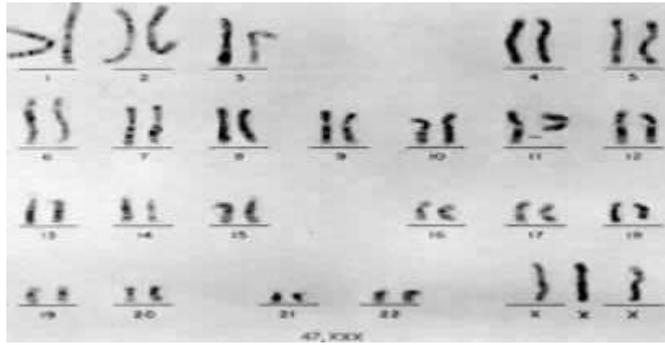


Figure 4 : caryotype humain représente le cas du syndrome triple X : 47, XXX.

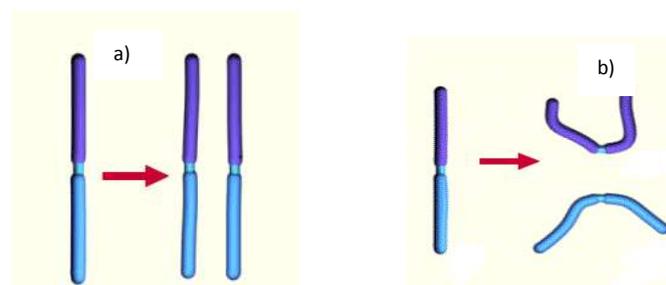
ii. Anomalie de structure :

Les anomalies de structure sont le résultat des cassures des chromosomes durant la méiose. Une délétion, une duplication ou la formation d'un isochromosome se traduiront par un phénotype anormal, tandis que l'insertion, l'inversion, ainsi que la translocation peuvent être équilibrées. Ceci signifie que les porteurs de ces anomalies de structures sont phénotypiquement sains, car la totalité du matériel génétique est présente.⁽⁶⁾

a. La formation d'un isochromosome :

Est une malformation chromosomique relativement fréquente au niveau du chromosome X. Elle résulte de la division transversale et non longitudinale (figure 5, b), d'un chromosome.

L'isochromosome (caryotype) ainsi constitué a soit 2 bras courts, soit 2 bras longs. Les personnes qui présentent cette anomalie du chromosome X ont le même phénotype que les patients atteints du syndrome de Turner (45, X0) (figure 6). Ceci est dû au fait qu'un bras du chromosome X manque. ⁽⁶⁾



**Figure 5 : a) : division normale d'un chromosome
b) : formation d'un iso-chromosome**

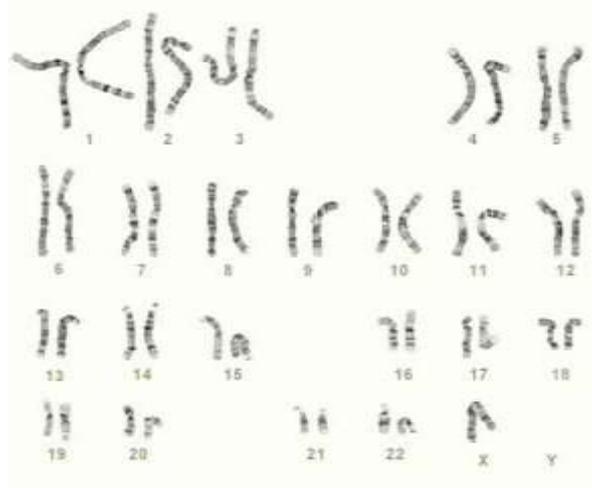


Figure 6 : caryotype humain de syndrome de Turner (45, X0).

b. Duplication :

Une duplication désigne un fragment chromosomique dédoublé. La duplication est parfois décrite comme une trisomie partielle. Lorsqu'il y a duplication, la personne possède 3 copies du gène qui se trouve dans le segment touché (figure 7). (6)

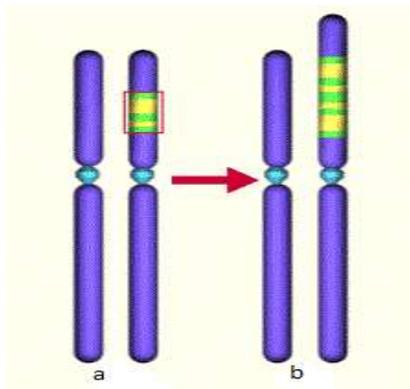


Figure 7 : Duplication

a: Paires de chromosome normaux

b: chromosome avec une duplication

Cela signifie qu'il y a un surplus d'information (gènes) qui peut conduire à des malformations congénitales ou à des problèmes durant le développement. Par exemple, le syndrome X fragile (figure 8), est une duplication multiple d'un segment de 3 nucléotides dans la région 5' non traduite du gène FMR1 sur le chromosome X (Xq27). Il se présente sous 4 formes (6) :

1. 6 - 40 répétitions = forme mineure
2. 41 - 60 répétitions = forme intermédiaire
3. 61 - 200 répétitions = forme prononcée
4. >200 répétitions = mutation complète avec manifestation du phénotype.

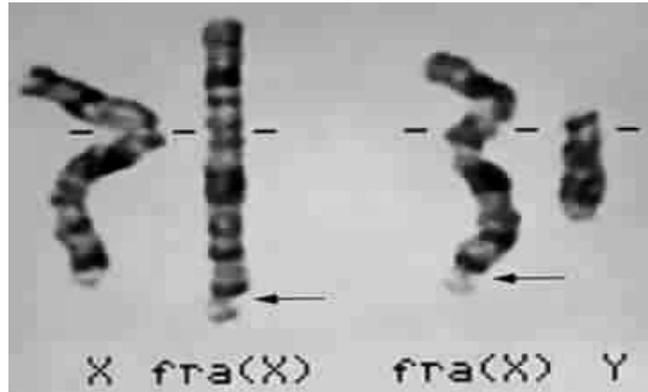


Figure 8 : syndrome X fragile chez deux sexe .

Comme il s'agit d'une mutation liée au chromosome X, les hommes sont plus touchés que les femmes. Le syndrome X-fragile est une des formes les plus fréquentes de retard mental héréditaire. En plus du retard mental, le patient est aussi atteint de prognathisme, a un visage long et étroit et de grandes oreilles.(6)

c. Délétion :

La délétion est la perte d'une section du matériel génétique et de l'information génétique. La taille du matériel délétée peut varier d'un seul nucléotide à un segment contenant plusieurs gènes ou des régions entières du chromosome ; il y a plusieurs types de la délétion :

- **Délétion terminale** : où le chromosome se casse en un point unique (figure : 9).

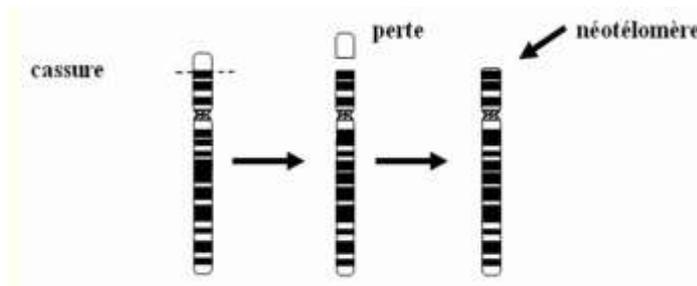
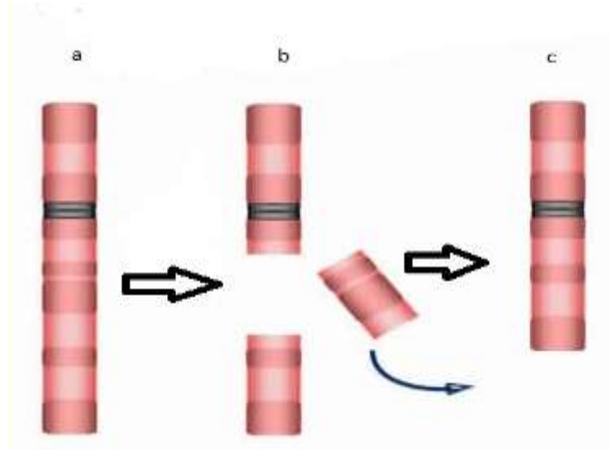


Figure9 : Délétion terminale.

- **Délétion interstitielle** : perte d'un segment interstitielle de chromosome (figure10, b) et les fragments chromosomiques se rejoignent en excluant le segment intermédiaire (figure10, c), cette délétion peut toucher un seul bras ou les 2 bras d'un chromosome.



**Figure 10 : a : chromosome normale,
b : perte un segment intermédiaire,
c : fusion des fragments de chromosome**

Exemple : Syndrome du cri du chat ou monosomie 5p (figure : 11) (une naissance sur 20.000 à 50.000) est une anomalie chromosomique dans laquelle il manque un bras court du chromosome 5 (on peut aussi dire délétion 5p). Un ensemble de malformations de la tête et du larynx (organe situé dans la gorge permettant de parler et d'émettre des sons, d'où des cris qui ressemblent au miaulement d'un chaton) associées à un retard mental (parmi les handicapés mentaux ayant un $QI < 50$, un sur 350 ont la maladie du cri du chat) sont observés.

5p- syndrome = cri du chat syndrome

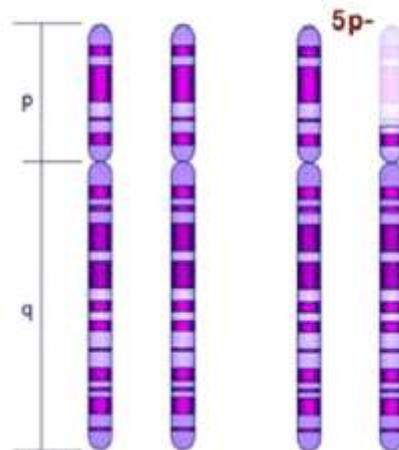
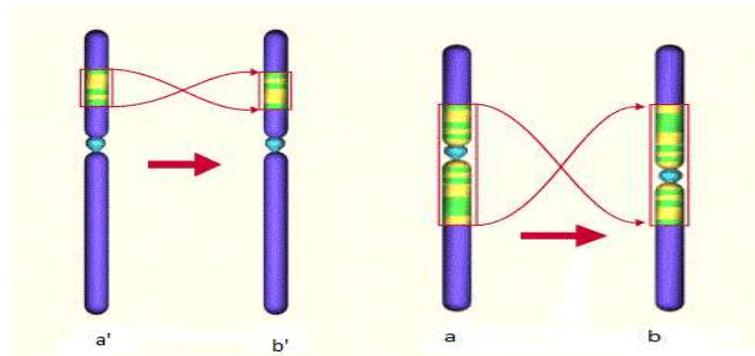


Figure11 : représentation d'une délétion 5p

d. Inversion :

Une inversion résulte de la cassure d'un fragment de chromosome, suivie d'une rotation de 180° de ce même fragment, puis de sa réintégration dans le même chromosome. Le phénotype associé à ce type de réarrangement est souvent invisible. Lorsque la région touchée inclut le centromère, on parle d'inversion péri-centrique (figure12, b), par opposition à l'inversion para-centrique (figure12, b'). (6)



**Figure 12 : a : chromosome Normale,
 b : Chromosome avec une inversion péri-centrique.
 a' : chromosome Normale,
 b' : Chromosome avec une inversion para-centrique**

e. Translocation :

Il s'agit d'un échange de fragment d'ADN entre 2 chromosomes; on observe 3 types de translocation :

- Translocation réciproque :

Il s'agit d'un échange de matériel entre deux chromosomes non homologues après cassure sur chacun des chromosomes impliqués (fig : 13). Si cet échange s'accompagne d'une perte de matériel génétique, il est déséquilibré. (6)

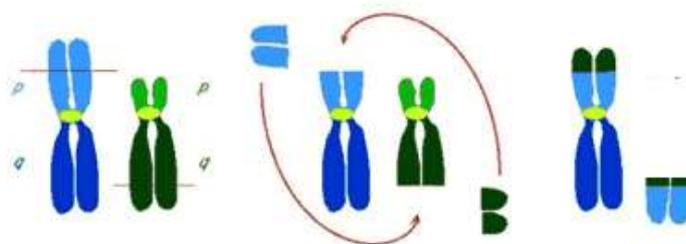


Figure 13 : représentation schématique de translocation réciproque entre 2 chromosomes.

- Translocation robertsonienne (TR) :

C'est un cas particulier de translocation impliquant deux chromosomes acrocentriques (fig14, a) (chromosome 13, 14, 15, 21, 22) dont le bras court de très petite taille ne code que pour des gènes répétés. Cette translocation consiste en une fusion des chromosomes avec

perte des bras courts (fig14 : b, c), sans aucune conséquence clinique directe pour le sujet porteur. (7)

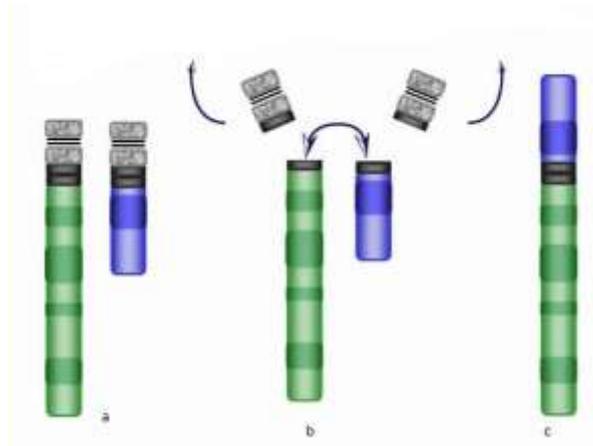


Figure14 : représentation schématique de TR
a : deux chromosomes acrocentrique,
b : perte des bras courts,
c : fusion des deux des chromosomes.

- Translocation insertionnelle :

C'est une anomalie nécessitant 3 points de cassure sur le même chromosome ou sur un chromosome différent (figure : 15).

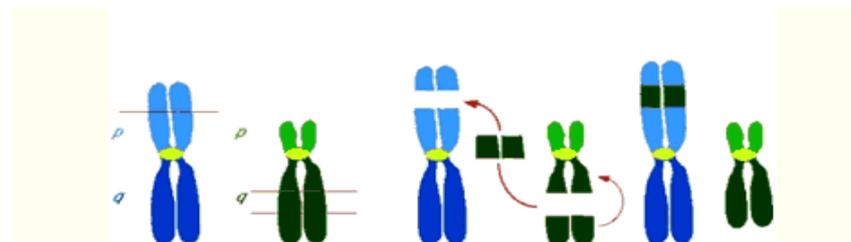


Figure15 : translocation insertionnelle entre deux chromosomes.
avec 3 point de cassure.

1-3) Cytogénétique moléculaire :

La cytogénétique moléculaire est une nouvelle approche morphologique qui utilise à la fois les outils de la biologie moléculaire et de la cytogénétique. La principale technique utilisée actuellement est l'hybridation in situ fluorescente (FISH) qui consiste en l'hybridation de sondes froides d'ADN sur des lames de préparations cytogénétiques de cellules métaphasiques ou inter-phasiques et sa révélation par fluorescence. Initialement utilisée pour localiser certaines séquences répétées de l'ADN sur des chromosomes métaphasiques, son champ d'application s'est progressivement diversifié. Elle constitue actuellement un outil

puissant et performant dans l'établissement de la carte du génome humain, l'analyse des processus tumoraux et le diagnostic chromosomique prénatal et post-natal. (8)

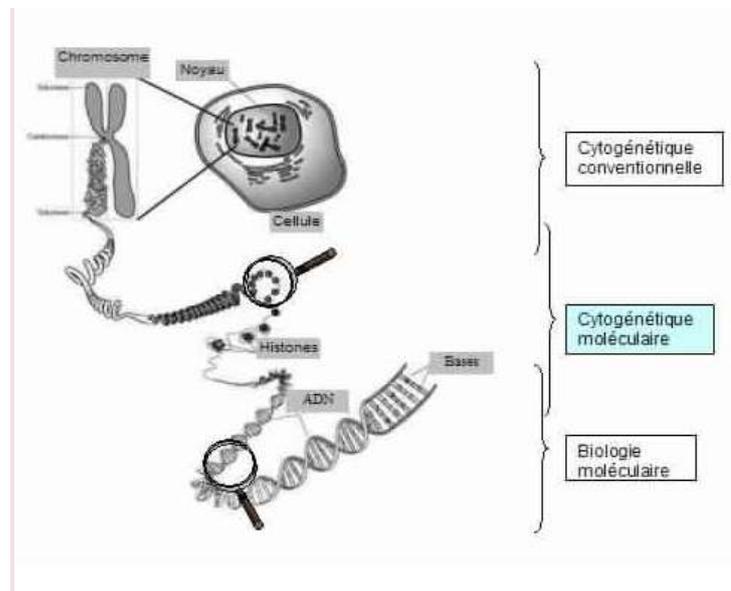


Figure 16: Représentation schématique du génome humain à différentes échelles.

1-3-1) principe :

La FISH est une technique d'imagerie moléculaire qui consiste à créer des sondes à ADN qui vont se fixer sur une partie spécifique d'un chromosome ou sur un chromosome entier. Ses utilisations sont nombreuses : réalisation de [caryotypes](#), mise en évidence de maladies génétiques... Son avantage par rapport aux marqueurs radioactifs habituellement utilisés est qu'il n'y a pas de risque de contamination.

La technique consiste en trois étapes : préparation de la sonde fluorescente, [hybridation](#) in situ, et observation des résultats au microscope à fluorescence. (9)

2) Les hémopathies malignes :

2-1) Rappel : L'hématopoïèse

L'hématopoïèse comporte quatre compartiments: les cellules souches totipotentes, les progéniteurs, les précurseurs et les cellules matures. Toutes les cellules sanguines sont produites à partir d'une même cellule indifférenciée dite cellule souche totipotente ou cellule souche primitive (figure 17). Sous l'influence de facteurs stimulants, une cellule souche totipotente va s'engager dans la différenciation d'une lignée cellulaire. Elle devient alors un progéniteur (cellule souche différenciée ou " engagée").

Après plusieurs divisions qui aboutissent à des cellules souches engagées à la potentialisation, de différenciation de plus en plus limitée, les progéniteurs deviennent spécifiques d'une seule lignée.

On aboutit alors aux précurseurs, cellules identifiables morphologiquement sur un prélèvement de moelle osseuse. Ces précurseurs se divisent et devient matures. Ils correspondent à la majorité des cellules vues sur un étalement de myélogramme ou sur une biopsie ostéomédullaire (BOM). La maturation terminale aboutit aux cellules matures fonctionnelles qui passent dans le sang. (10)

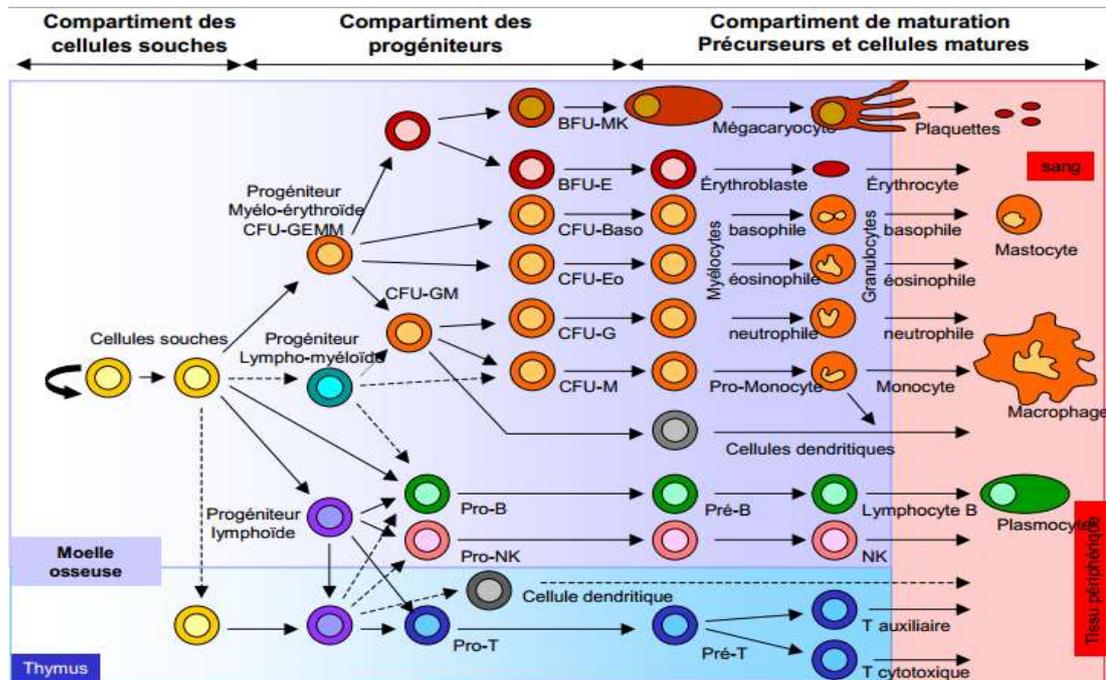


Figure 17 : Représentation schématique des différents compartiments du système hématopoïétique

Les cellules souches totipotentes sont des cellules indifférenciées capables de :

- Se multiplier dans un environnement tissulaire approprié ⇒ capacité de prolifération;
- Produire des cellules spécialisées d'un tissu et de se différencier en cellules matures (phénotypiques, morphologiques et fonctionnelles) ⇒ processus de différenciation;
- Se reproduire elle-même pour donner de nouvelles cellules souches ⇒ capacité d'auto-renouvellement. (10)

2-2) Définition :

Les hémopathies malignes sont des cancers dues à une prolifération maligne des cellules sanguines ou de leurs précurseurs dans la moelle osseuse (MO). En absence d'un traitement efficace, les cellules leucémiques gagnent la place des cellules normales et se propagent dans d'autres organes, ce qui entraîne le décès du patient. Du point de vue clinique, les leucémies se présentent en quatre catégories. Les termes myéloïdes et lymphocytiques, présentent chacune une forme aiguë et chronique.

i'. Lignée myéloïde :a) Leucémie myéloïde chronique :

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est le premier désordre malin associé spécifiquement à une anomalie cytogénétique acquise, la translocation réciproque t (9;22)(figure18,a) qui donne naissance au chromosome Philadelphie. La LMC est caractérisée par la présence de l'oncogène de fusion bcr-abl, résultant de la translocation (figure 18, b), dans toutes les cellules leucémiques. C'est une affection maligne clonale de la cellule souche hématopoïétique de la moelle osseuse. (11)

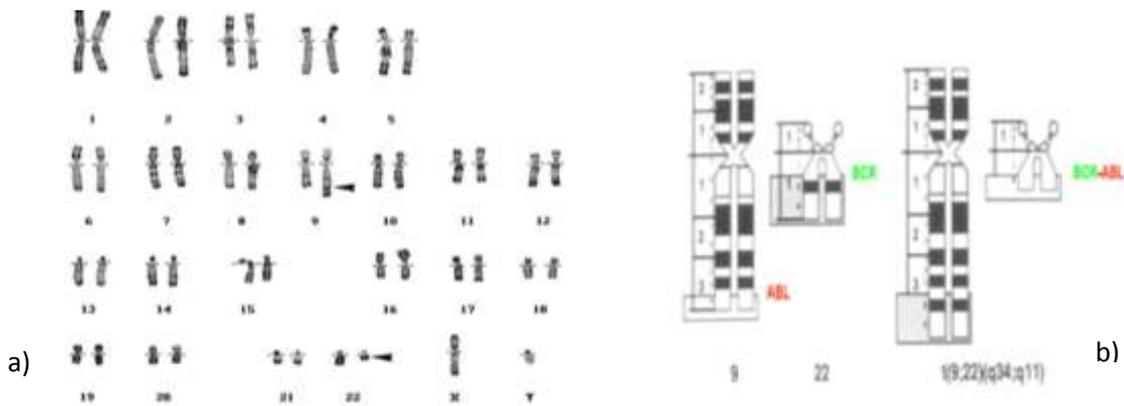
Caryotype :

Figure 18 : a) : représente le caryotype humain d'une translocation réciproque entre le chromosome 9 et 22 .

b) représente la fusion de bcr et abl

Le caryotype permet de mettre en évidence le chromosome Philadelphie dans 95% des cas, et d'évaluer la réponse cytogénétique par la détermination du pourcentage de cellules résiduelles Ph1. Il permet aussi de détecter les anomalies cytogénétiques associées à la t (9 ; 22).

Les translocations complexes (un peu moins de 10 % des cas) impliquent un ou plusieurs chromosomes en plus du chromosome 9 et du chromosome 22.

FISH:

La FISH est un examen ciblé qui ne visualise pas tout le génome, il met en évidence le signal de fusion BCR/ABL sur : -Noyaux (FISH inter-phasique) (Figure 19a).

-Mitoses (FISH métaphasique) (Figure 19b).

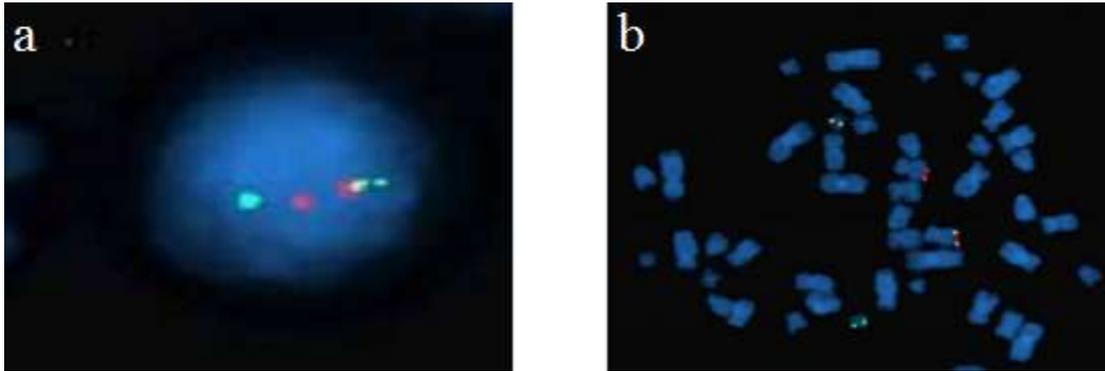


Figure 19 : FISH, a : FISH interphasique, b : FISH métaphasique

En particulier en cas de Ph négatif (Philadelphie masqué).

❖ La technique de FISH :

- Révèle les anomalies cryptiques (insertions, micro-délétion...) (Figure 20).
- Elle aurait une sensibilité supérieure au caryotype conventionnel dans le suivi de la réponse thérapeutique.
- Elle aurait une meilleure corrélation avec la réponse moléculaire.

De plus, la technique de FISH permet de détecter l'anomalie dans les cellules sanguines et ne requiert pas l'examen de la moelle osseuse. Pour cette raison, elle est utile dans le suivi des effets du traitement de la LMC. Elle permet de déterminer s'il y a eu baisse considérable du nombre de cellules de LMC dans le sang. (12)

c) Leucémie aigue myéloïde :

Les principaux mécanismes moléculaires en cause de LAM sont les suivants :

- Activation transcriptionnelle du gène de AML1, avec t(8 ;21) (figure 20,b) codant pour un facteur de transcription impliqué dans la différenciation de la lignée myéloïde et en particulier dans l'activation des promoteurs de l'IL3 et du GM-CSF. (13)
- Création d'un gène de fusion avec expression d'un ARN et d'une protéine de fusion ayant des propriétés leucémogènes , avec translocation t(15,17) (figure 20,a) des LAM3 créant un gène de fusion entre le gène RAR localisé en 17q21, codant pour un des récepteurs de l'acide rétinoïque, et le gène PML, situé en 15q24, codant pour une protéine de fonction inconnue, permettant la synthèse d'une protéine de fusion semblant responsable du blocage de différenciation caractéristique des LAM3. (13)
- Double mutation ou délétion d'un gène suppresseur de tumeur, altération des deux copies du gène RB dans 15% à 30% des LA, essentiellement dans les LAM4 et LAM5. (12).

- L'inversion péri-centrique du chromosome 16 (inv(16)) (figure 20, c) impliquant le gène MYH11 sur le chromosome 16p13 et le gène CBFβ sur le chromosome 16q22 a été mise en évidence par hybridation in situ fluorescente⁽¹⁴⁾. Ce réarrangement entraîne la fusion des deux gènes. L'inv (16) est détecté dans environ 5-8% des cas de leucémie myéloïde aiguë de novo (LMA) et est associée au sous-type AML-M4eo (sur la base FAB classification).⁽¹⁵⁾

Caryotype :

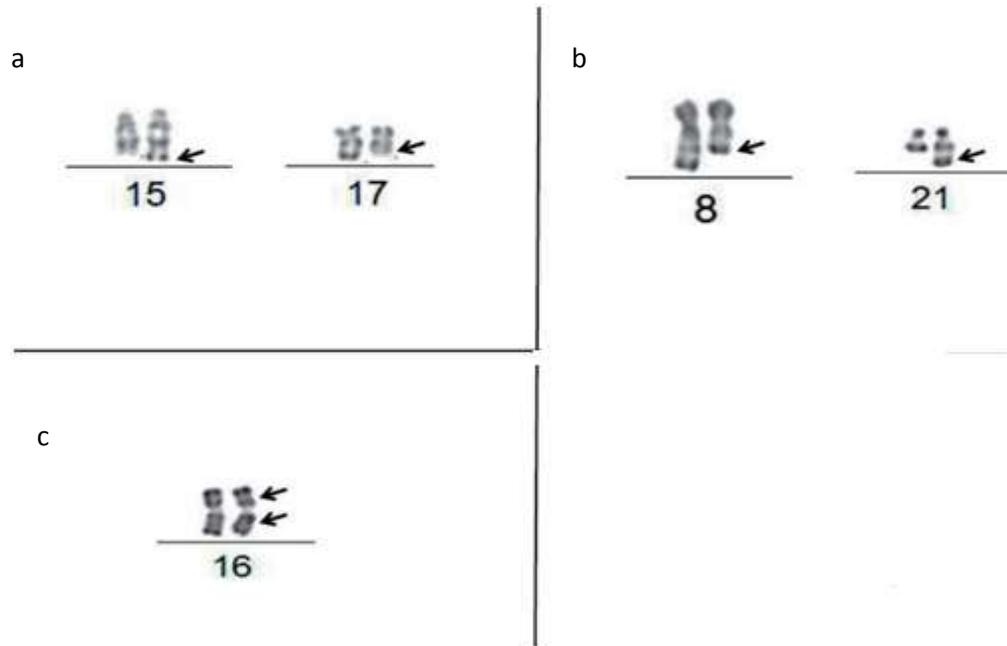


Figure 20 : représentation de l'anomalie chromosomique chez les humains en cause des LAM

d) Syndromes myélodysplasiques

Le SMD est causé par une mutation dans une cellule souche normale (cellule hématopoïétique multipotente) de la moelle osseuse, les anomalies rencontrées sont le plus souvent des anomalies de nombre et de pertes de matériel chromosomique⁽¹⁶⁾:

- Les plus fréquentes touchent les chromosomes 5 et 7, soit sous forme de monosomie, soit sous forme de délétion interstitielle affectant le bras long.
- Les Syndrome 5q- est caractérisé par une délétion de taille variable du bras long du chromosome 5 isolée. (figure21).
- Trisomie 8.
- Délétion du bras long du chromosome 20 (figure 22).

- Perte du chromosome y chez l'homme
- Plus rarement pertes affectant le 11q, le 13 q et le 12 p.

Caryotype :



Figure 21 : chromosome humain avec syndrome 5q

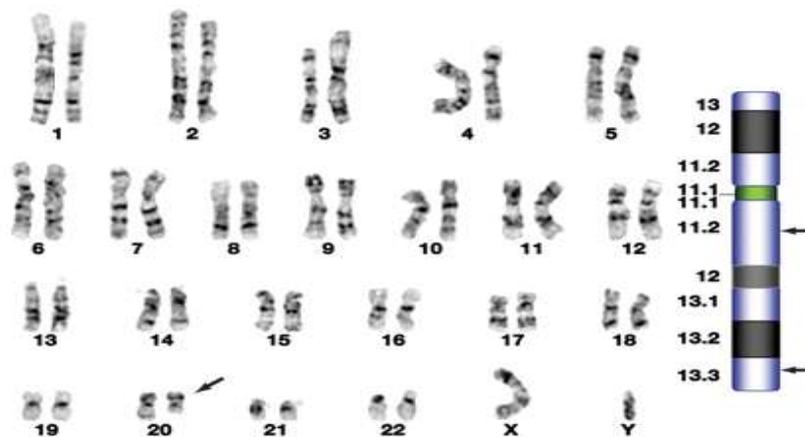


Figure 22: caryotype humain représentant la délétion du bras long du chromosome 20.

ii'. Lignée lymphoïde :

a'. Leucémie aigue lymphoïde :

Les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) sont les tumeurs malignes les plus fréquentes chez l'enfant. Elles comprennent différentes entités caractérisées par des altérations génétiques récurrentes, mutuellement exclusives, qui déterminent la biologie de la leucémie, permettent de classer les LAL, et peuvent influencer la réponse au traitement. Ainsi, dans les LAL de lignée B, la présence d'une hyperdiploïdie (figure24) ou d'une $t(12 ; 21) / ETV6-RUNX1$ qui sont les altérations les plus fréquentes chez le jeune enfant, sont associées à un excellent pronostic. (17)

Le caryotype permet de retrouver des anomalies en rapport avec le phénotype de la leucémie aigue lymphoblastique (18) :

- Leucémie aigue lymphoblastique T et sa translocation $t(14q+)$
- Leucémie aigue lymphoblastique –B mature et sa translocation $t(8,14)$
- Leucémie aigue lymphoblastique pré-B et ses translocation $t(9,22)$, $t(4,11)$ et $t(11,14)$ (figure 23,25).

Carvotype :

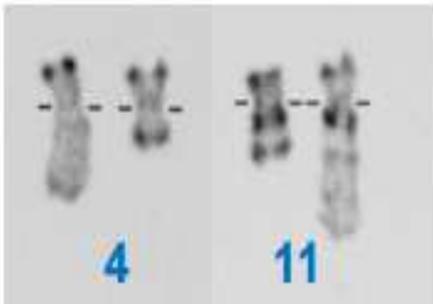


Figure 23: représentation de la translocation entre les chromosomes 4 et 11

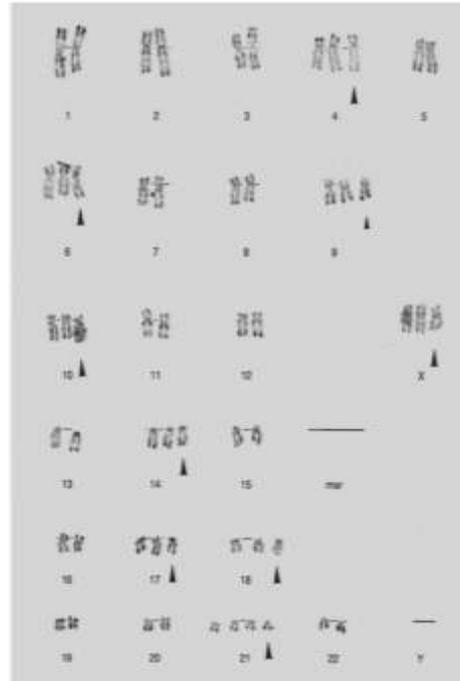


Figure24: profil chromosomique en cas d'une hyper-diploïdie

56,XX,+X,+4,+6,+9,+10,+14,+17,+18,+21,+21.



Figure 25 : caryotype représentant la translocation t(11,14).

b'. Leucémie lymphoïde chronique :

La leucémie lymphoïde chronique est une néoplasie du système lymphoïde, caractérisée par la prolifération clonale et l'accumulation de lymphocytes morphologiquement

murs (petits lymphocytes) le plus souvent de phénotype B, responsable d'une infiltration médullaire, sanguine et éventuellement ganglionnaire. (19)

LLC est caractérisée par :

- Une délétion 17p13, responsable d'une inactivation de p53, protéine impliquée dans la réparation de l'ADN et dans l'induction de l'apoptose (7 % des cas) ;
- Une délétion 11q22-23, avec inactivation d'ATM (ataxia telangiectasia) qui agit en amont de p53 dans la protection du génome en cas de lésion de l'ADN (18 %) ;
- Une trisomie 12q, site des gènes MDM2 et cycline D2, quoique leur rôle dans la LLC ne soit pas établi (16 %) ;
- Une délétion 13q14 isolée, touchant les microRNAs miR15 et miR16 récemment proposés comme impliqués dans la pathogénie de la LLC. (20)

Caryotype :

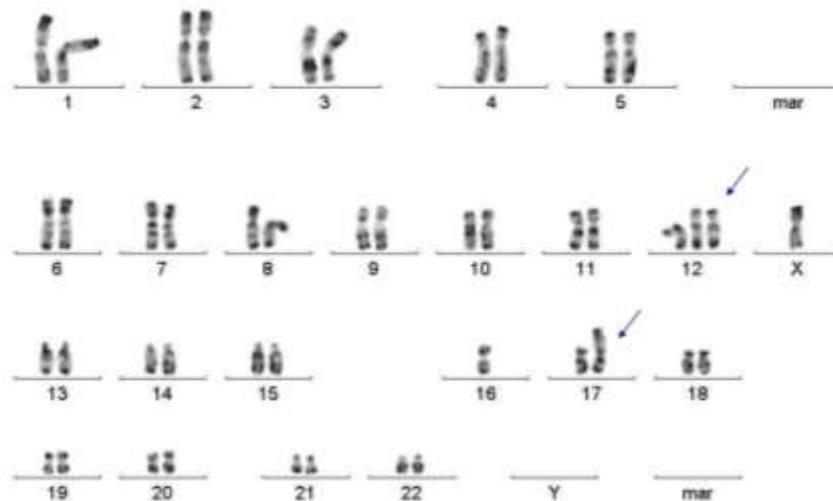


Figure26 : Caryotype de LLC avec 45, X,-Y,+12,-16,del17p

Matériel et méthodes

a) Prélèvement :**a.1) - Prélèvement sanguin :**

Le prélèvement sanguin est effectué dans des conditions stériles. L'étude est réalisée sur des patients atteints. Dans le cas d'une leucémie avec envahissement de blastes, le sang périphérique sera mis en culture si le nombre des GB est supérieur à 20%. Le prélèvement de 5ml de sang veineux périphérique est mis dans un tube hépariné qui peut se conserver à 4°C pour une durée de 24h ou bien mis en culture le même jour. L'ensemencement se fait en fonction du numéro de la formule sanguine (NFS).

a.2- Prélèvement médullaire :

Il se fait par le clinicien en milieu hospitalier à l'aide d'un trocart qui permet de percer l'os du sternum (figure 27). Le clinicien va aspirer 6 ml de sang médullaire à l'aide d'une seringue. Huit gouttes de ce prélèvement seront étalées immédiatement sur des lames pour effectuer le myélogramme. Le reste sera mis dans un tube sec ou EDTA de 5ml, puis transporté vers le laboratoire de génétique pour le caryotype ou la FISH.



Figure 27: prélèvement de sang médullaire par trocart depuis le sternum, du patient de 19 ans suspecté pour LMC au service de MI CHU de Fès

b) Culture cellulaire :

Les cellules sanguines sont mises en culture pendant 24 à 48 heures sur Marrow MaxTM qui est un milieu de culture complet constitué de sérum fœtal bovin, sulfate de gentamicine et de la L-glutamine.

Dans notre culture, la présence d'un mitogène n'est pas nécessaire. Nous avons déjà les blastes qui sont des cellules sanguines jeunes non arrivées à maturation et qui ont un pouvoir de division spontané.

Après 1 à 2 jours de mise en culture, environ 45 % des cellules sont en phase S. Ceci constitue le pic de l'activité mitotique et constitue le moment optimal pour prélever des cellules en vue d'étudier leurs chromosomes.

c) Cytogénétique classique :

c.1- Protocole expérimental :

➤ Accumulation des cellules en métaphase :

Après avoir effectué un prélèvement de la moelle osseuse, 2ml de sang sont additionnés sous hôte, de 11ml d'un milieu de culture prêt à l'emploi (MARROW MAX™ Karyotyping middle Invitrogen). La culture cellulaire dure 24h à 48h, à l'intérieur d'une étuve, sous une température de 37°C en position inclinée

➤ Blocage des cellules en métaphase :

Après 24h de culture, 0,25ml de colchicine sont ajoutés sous hôte pour chaque tube. Après avoir bien mélangé le contenu des tubes, ces derniers sont remis dans l'étuve à 37°C en position inclinée pendant 30 minutes.

➤ Choc hypotonique :

Une heure avant le choc, la solution KCl 0,065 M (1,4 g de KCl qsp 30ml) est préparée extemporanément et placée à 37 °C.

Après 50 min d'incubation en position inclinée, les tubes sont mélangés doucement puis centrifugés à 1500 tr/mn à 25°C pendant 10 min. A la fin de la centrifugation, le surnageant est aspiré puis éliminé.

Ensuite, dans chaque tube quelques gouttes de la solution hypotonique KCl sont ajoutés et le culot est suspendu à l'aide d'une pipette Pasteur, puis complété à 7ml avec la solution hypotonique de KCl.

Les solutions sont bien homogénéisées, et remises à l'intérieur de l'étuve pendant 20 minutes à 37°C.

➤ **Fixation :**

Le fixateur est mis dans un flacon propre et sec en verre et stocké à 4°C. Il faut toujours prévoir 300ml de fixateur par tube.

• **Préfixation :**

2,5ml de fixateur frais sont ajoutés dans chaque tube et centrifugés à 1500 tr/min pendant 10 minutes.

• **Première fixation :**

Le culot est remis en suspension dans quelques gouttes de Carnoy I préparé extemporanément puis complété à 7ml de fixateur. Une centrifugation immédiate est réalisée à 1500tr/min pendant 10 min.

• **Deuxième fixation :**

Les fixations sont répétées jusqu'à ce que le culot cellulaire soit propre (3 fixations minimum). Délicatement, le culot est remis en suspension dans quelques gouttes de Carnoy I et complété à 7ml.

➤ **Étalement :**

L'étalement nécessite un travail sous des conditions de température et d'hygrométrie particulières. Généralement, la lame est étalée dans une pièce à température de 22°C (+/- 2°C) et à 45% (+/- 5) d'humidité minimum.

Le surnageant est retiré et le culot est remis en suspension dans du Carnoy I. Ensuite, aspiré dans l'effilure de la pipette en position horizontale. Deux gouttes par lame sont ajoutées à côté de l'humidificateur, puis laissés sécher à température ambiante.

Finalement, la richesse des lames en mitose est observée au microscope inverse.

➤ **Dénaturation-coloration :**

Les lames sont laissées vieillir pendant quatre jours à 37°C : Le vieillissement a pour but de parfaire la déshydratation cellulaire et la fixation.

Au quatrième jour après l'étalement, la dénaturation thermique est effectuée dans la solution Earl à 87°C pendant 45mn. Puis, une coloration avec du Giemsa 5% est réalisée pendant 8 minutes. Des bandes R (reverses) sont alors obtenues.

Les techniques de banding chromosomique permettent de caractériser chaque chromosome par la présence de bandes. Chaque bande est définie comme une partie de chromosome distinguée des segments adjacents par l'apparition de segments plus sombres ou plus clairs à l'aide d'une ou plusieurs techniques de banding. Une bande paraissant sombre avec une technique donnée peut apparaître claire avec une autre technique. Par exemple les bandes R sont obtenues après dénaturation thermique ménagée des chromosomes puis Giemsa.

c.2) - Lecture :

La lame est séchée pour la lire sous un microscope relié à un ordinateur appelé cytoscan qui va permettre à l'aide du logiciel "Applied Imaging CytoVision™ 3.6" (Figure 28) d'organiser les chromosomes sous la forme du caryotype classique.

Les liaisons A=T dénaturées par l'Earl ne peuvent plus absorber le colorant et apparaissent claires sous microscope, alors que les liaisons G≡C qui sont restées intactes absorbent le colorant et apparaissent sombres sous microscope.



Figure 28 : cytoscan "Applied Imaging CytoVision™ 3.6"

d) Réactifs :**Tableau 1 : Les réactifs indispensables à la réalisation du caryotype**

| Réactif | Volume | Rôle |
|----------------------------|---------------------------------|---|
| Colchicine | 10 mg/ml | Elle bloque la mitose (la division cellulaire) |
| KCl | 0,065 M | Il provoque le choc hypotonique pour disperser les chromosomes |
| Fixateur (Carnoy I) | 3V Méthanol + 1V Acide acétique | Il fixe les chromosomes en les préparant à être étalés |
| Eau distillée | V nécessaire pour les dilutions | Elle est utilisée pour diluer le KCl et Giemsa |
| Earl | 100 ml | C'est un tampon phosphate à pH 5,6 qui dénature les liaisons A=T |
| Giemsa | 100 ml | Colorant dilué à 5% qui colore les liaisons G=C en bandes sombres |

e) Cytogénétique moléculaire :**e.1- Principe :**

La FISH n'est pas recommandée de manière systématique pour diagnostiquer les hémopathies malignes ou pour évaluer sa réponse cytogénétique au traitement, mais cet examen reste indispensable dans le cas de la LMC Ph-négative BCR-ABL positive (5 % des cas) où le caryotype ne permet pas de mettre en évidence le chromosome Ph. La FISH peut parfois être un complément utile quand un nombre insuffisant, voire l'absence, de cellules (sanguines ou médullaires) en métaphases a été obtenu.

Les résultats de la FISH interphasique ne sont pas superposables à ceux de la FISH métaphasique. La FISH métaphasique explore, comme le caryotype, le compartiment des cellules en division alors que la FISH interphasique explore aussi le compartiment des cellules quiescentes.

e.2- Protocole expérimental :

➤ Préparation des lames pour la FISH :

Avant de démarrer toute technique, il faut penser à mettre au bain marie les solutions utilisées à chaud. Il ne faut pas démarrer les étapes tant que les solutions n'ont pas atteint la température requise.

➤ Prétraitement

- Les lames sont immergées dans la solution 2XSSC, 70% Formamide à 37°C pendant 30 min;
- Puis dans du PBS 1X pendant 1 minute.

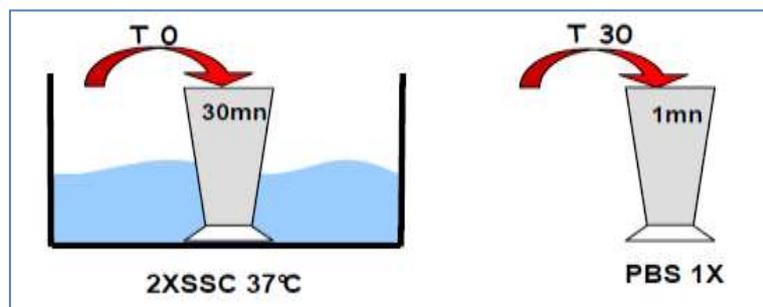


Figure 29 : Prétraitement par le 2XSSC et le PBS 1X

➤ Traitement à la pepsine :

- Les lames sont placées sur le ThermoBrite (Abbott 7J9120) à 37°C et la section est recouverte avec la pepsine diluée.



Figure 30 : ThermoBrite utilisé pour l'hybridation des sondes FISH

- L'incubation dure entre 10 et 20 minutes ;
- les lames sont immergées dans du PBS 1X 2 minutes ;
- La déshydrations des lames se fait dans un gradient d'ETOH 70, 85, 100% 2 minutes chacun.
- les lames sont ensuite séchées avant de procéder à l'étape d'Hybridation.

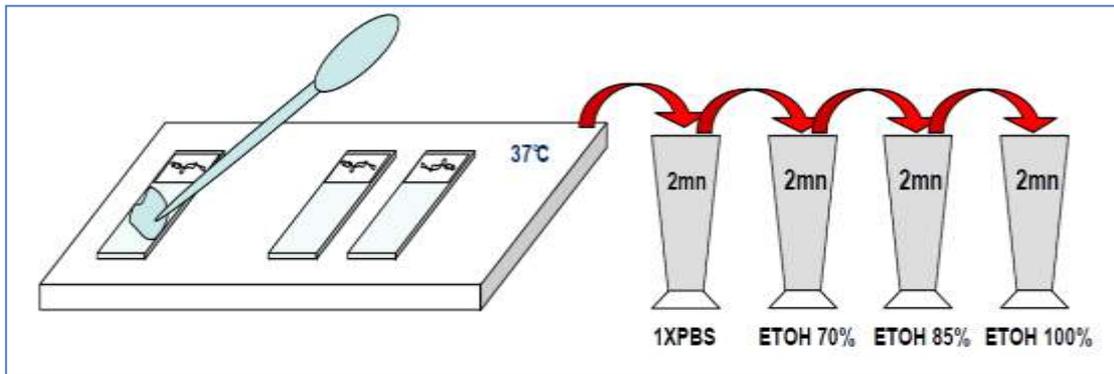


Figure 31 : Traitement des lames par la pepsine.

➤ **Hybridation des échantillons :**

- La sonde et le tampon d'hybridation sont portés du congélateur à température ambiante .Elle est ensuite centrifugée, puis vortexée et centrifugée à nouveau.



Figure 32: Centrifugation et vortex de la sonde

- 10µL de la sonde sont déposés sur une lamelle.

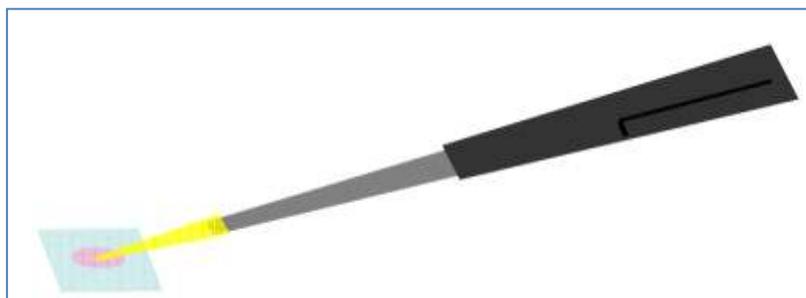


Figure 33: Ajout de la sonde sur la lamelle

La lame échantillon est retournée sur la lamelle immédiatement et ensuite scellée à l'aide de rubber cement.

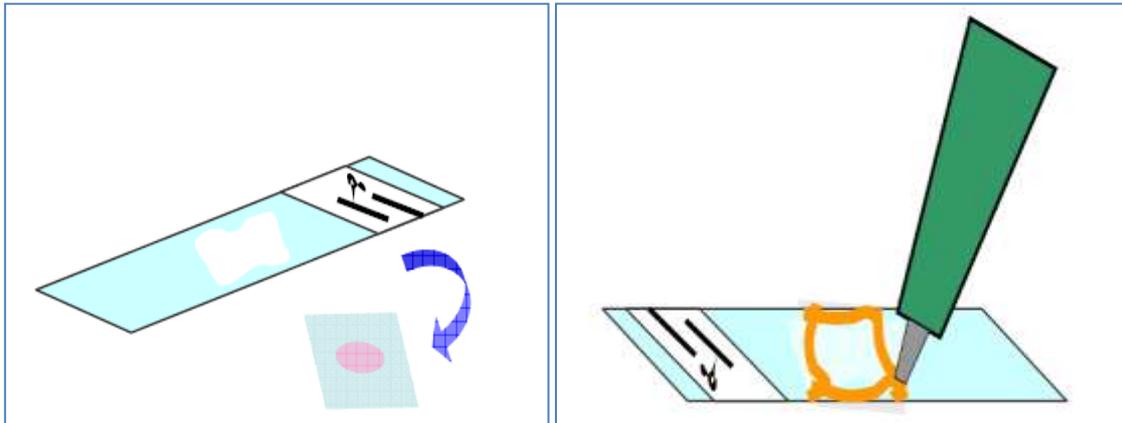


Figure 34 : Préparation de lame et lamelle

La lame échantillon est retournée sur la lamelle, puis elles sont scellées par de la colle

- La lame est placée dans le ThermoBrite et incubée à 37°C pendant environ 5 minutes avant de lancer le programme de dénaturation/hybridation :
 - La température de dénaturation: 73°C / Temps de dénaturation : 1 minute
 - La Température d'hybridation: 37°C / temps d'hybridation 20 h.

➤ **Lavage post-hybridation :**

A partir de cette étape, il est impératif de travailler en lumière réduite de manière à préserver les fluorochromes des sondes présentes sur les lames.

- A la fin de l'hybridation, après avoir sorti sortir les lames du ThermoBrite ; le rubber cement est retiré.
- La lame est placée dans la solution de lavage 2XSSC/0,1% NP40 à t° ambiante pour faciliter le décollement de la lamelle (quelques secondes) (Pour plus de facilité on peut placer deux lames dos à dos) ;
- Les lamelles sont ensuite retirées délicatement ;
- Les lames sont transférées dans la solution 0,4XSSC/0,3% NP40 à 73°C. Après agitation le chronomètre réglé à 2 minutes est lancé.
- Les lames sont retirées de la solution à 73°C et un rinçage est effectué à température ambiante 30 s à 1 minute.
- Les lames sont séchées à l'obscurité.
- **Contre coloration des noyaux au DAPI :**
 - 10µl de DAPI sont déposés sur une lamelle couvre-objet ;

- La lame échantillon est retournée sur la lamelle (même technique que pour la sonde d'hybridation) ;

e.3- Lecture :

- Les lames sont placées à 4°C pendant au moins 5min avant de procéder à la lecture sous microscope.
- Observation des résultats de FISH dans l'obscurité sur cytoscan.
La lecture se fait avec un microscope à fluorescence muni de filtres adaptés aux fluorochromes des sondes utilisées.

e.4- Réactifs:

- Contre colorant DAPI II (ref. Abbott 6J5001).
- Sonde «Vysis LSI BCR/ABL Dual Color, Single Fusion Translocation Probe Set».

Résultats et discussion

Etude rétrospective :

De 2010, à Mai 2015, l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique du CHU Hassan II de Fès a enregistré 334 diagnostics onco-hématologiques. Les résultats de l'étude des dossiers des malades diagnostiqués sont présentés dans les graphes suivants :

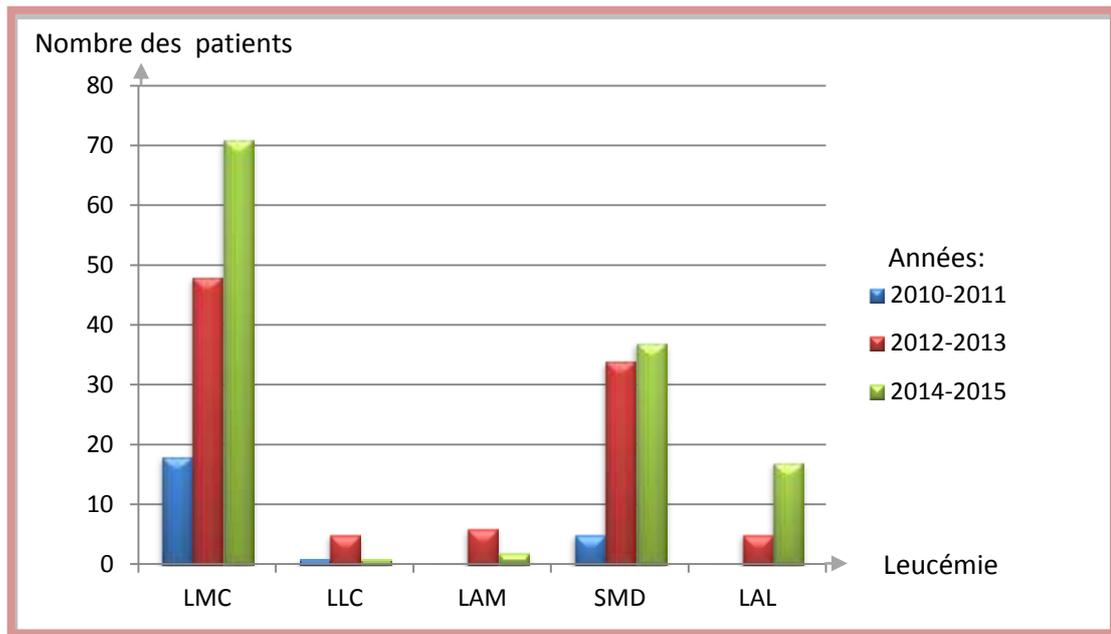


Figure 35 : Nombre total des patients diagnostiqués par an à l'unité de génétique médicale.

La population étudiée a été classée selon le nombre des patients diagnostiqués de 2010 jusqu'à 2015 et selon le type des leucémies.

Les résultats obtenus montrent que les patients diagnostiqués pour la LMC sont les plus fréquents par rapport aux autres leucémies.

Au cours de ces 6 ans d'étude, le nombre des patients diagnostiqués a augmenté pour LMC, SMD, et LAL, mais il a diminué pendant 2014-2015 pour LLC et LAM.

- Notre série d'étude concerne des patients avec un âge moyen de 48 ans, avec des extrêmes allant de 5 jusqu'à 80 ans. La tranche d'âge la plus touchée est celle entre 38-58 ans

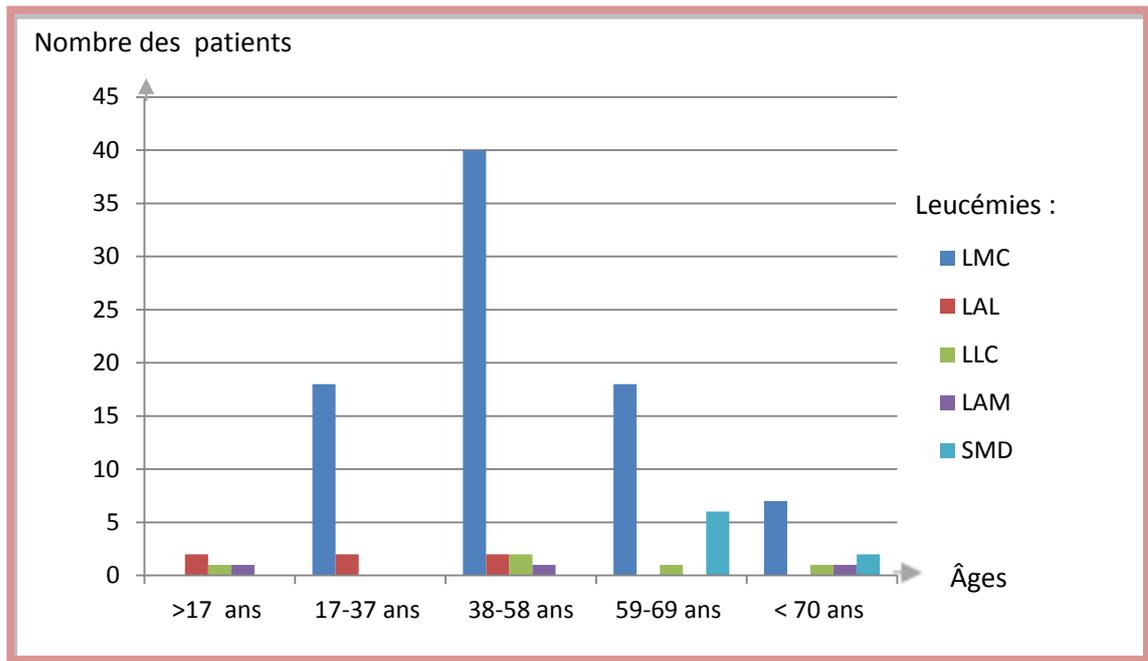


Figure 36 : Répartition des patients selon l'âge et le type de la maladie

Le graphique montre que :

- LMC est la forme plus fréquente chez l'adulte, elle survient en grande majorité à l'âge 38-58 ans.
- LAL c'est le type le moins courant qui touche les jeunes enfants et rarement les adultes.
- SMD est une leucémie qui apparait chez les patients dont l'âge est supérieur de 60 ans.
- les LAM, LLC sont des leucémies moins fréquentes qui peuvent toucher les adultes et moins souvent les jeunes enfants.

Etude pratiques :

L'étude pratique est réalisée sur trois patients diagnostiqués pour la LMC.

Dans cette étude, nous cherchons le chromosome Philadelphie positif par cytogénétique classique et/ou moléculaire.

○ Résultats de caryotype :

Le caryotype permettra d'identifier la présence de la $t(9;22)(q34;q11)$ et donc le chromosome Ph⁺. Il permettra aussi de détecter des caryotypes plus complexes dont la recherche se fait par cytogénétique conventionnelle et par cytogénétique moléculaire, dans le cas de caryotype normale avec chromosome Ph⁻.

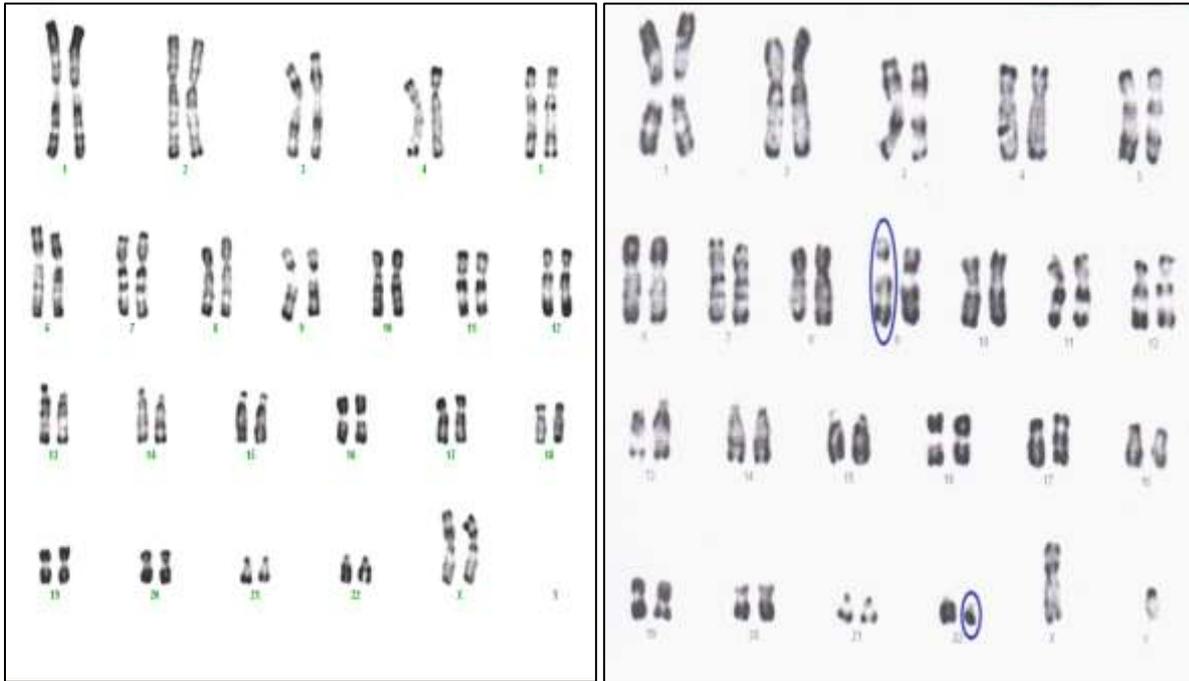


Figure 37 : Caryotype d'une personne saine à gauche. Caryotype d'une personne atteinte de LMC à droite.

La translocation t(9 ; 22) est mise en évidence: elle est caractérisée par la présence d'un bras long du chromosome 9 rallongé, et le chromosome 22 raccourci avec présence du gène de fusion.

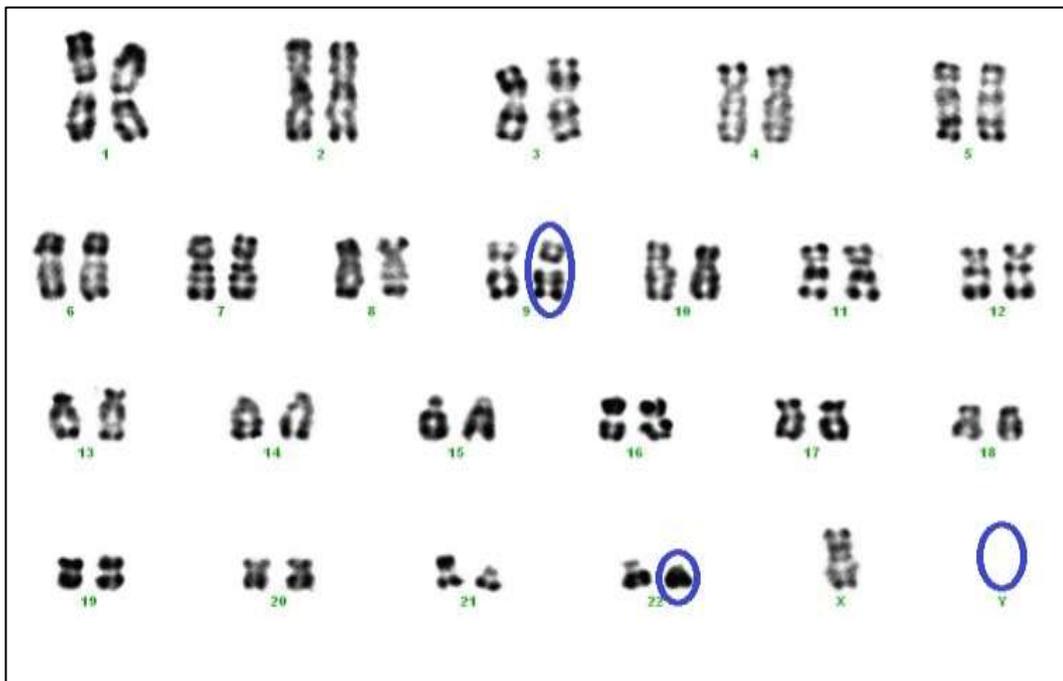


Figure38 : Caryotype complexe du patient 2 : 45,X,t(9;22)(q34;q11) .

Il s'agit d'un exemple d'anomalie de nombre, où la translocation (9;22) avec une perte du chromosome Y, est observée.

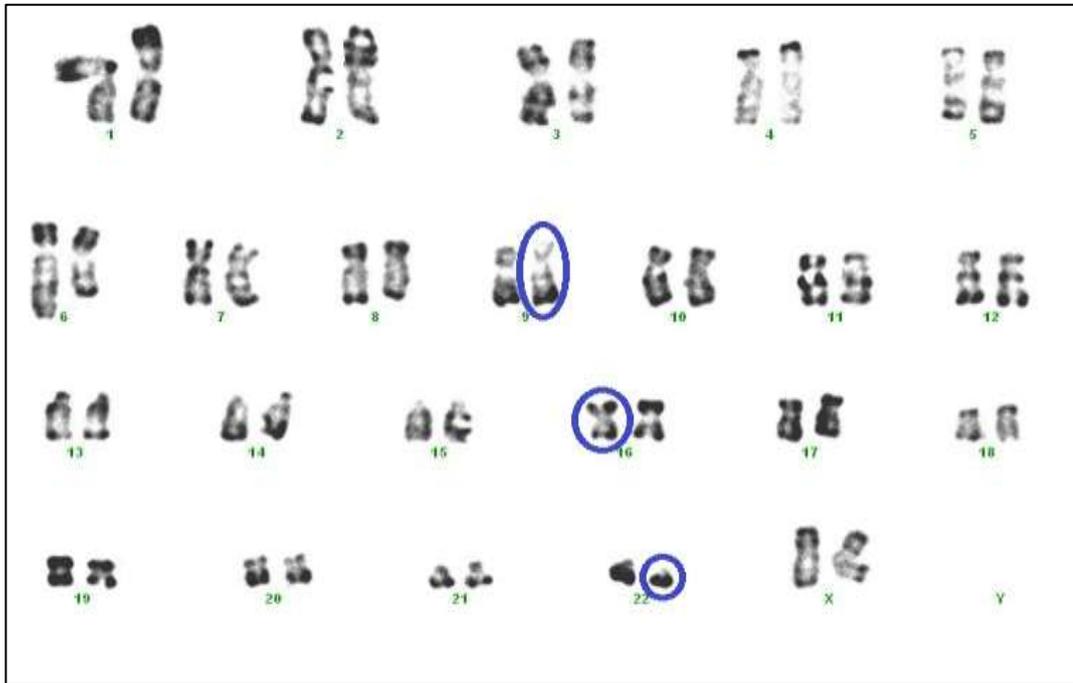


Figure 39 : Caryotype complexe de la patiente 3: 46, XX, t(9;22) (q34;q11) der(16).

Cette patiente présente une anomalie de structure.

○ Les résultats de la cytogénétique moléculaire (FISH) :

La première indication de la FISH est la discordance entre les données du caryotype (qui n'identifie pas de Ph⁺) et les autres données biologiques, qui sont compatibles avec le diagnostic de LMC. La mise en évidence d'un gène hybride BCR-ABL par FISH confirmera alors le diagnostic de la LMC, donc cette technique présente comme avantage la détection des chromosomes Philadelphie «masqués» non visualisés par la cytogénétique conventionnelle. Sa sensibilité est meilleure que la cytogénétique conventionnelle en particulier avec les sondes double fusion.

Les sondes spécifiques BCR et ABL sont choisies en fonction de leur position par rapport au point de cassure, Dans le laboratoire, la sonde «Vysis LSI BCR/ABL Dual Color, Single Fusion Translocation Probe Set» est utilisée (Figure 40), son diagnostic repose sur la détection par fluorescence du gène de fusion BCR-ABL.

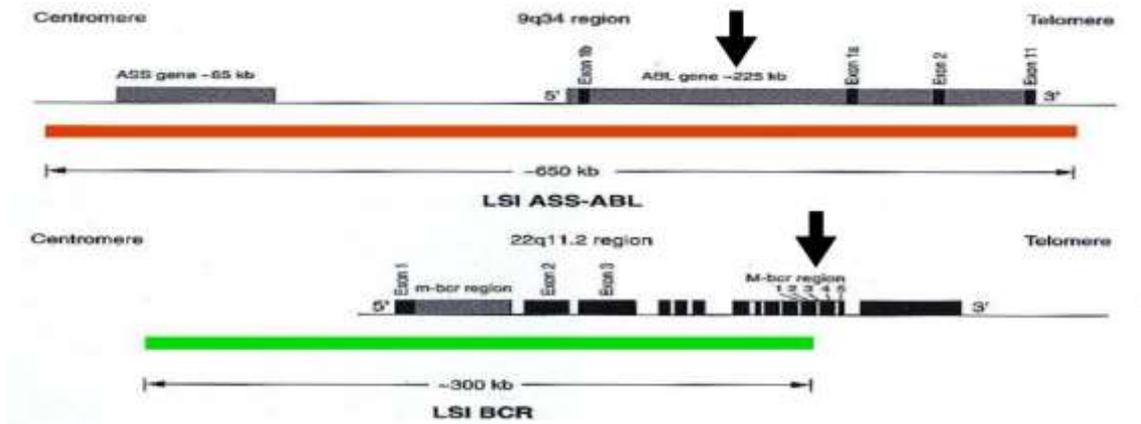


Figure 40 : Sondes spécifiques BCR/ABL «Vysis LSI BCR/ABL Dual Color, Single Fusion Translocation Probe Set».

chez les patients ayant un caryotype normal avec Ph⁻, la présence du gène de fusion BCR/ABL a été identifiée par la FISH. Le résultat montre la présence de ce gène (Figure 42).

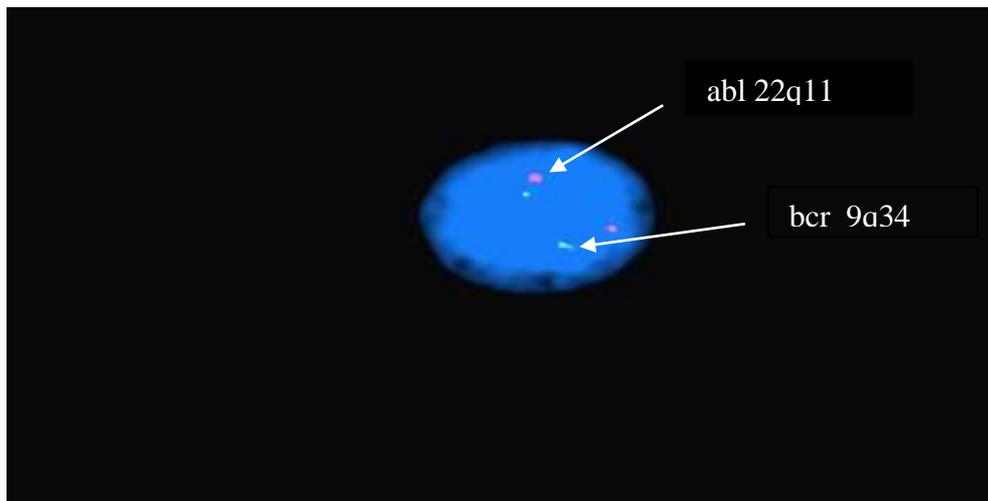


Figure 41 : Résultat d'une FISH négative du patient sain.

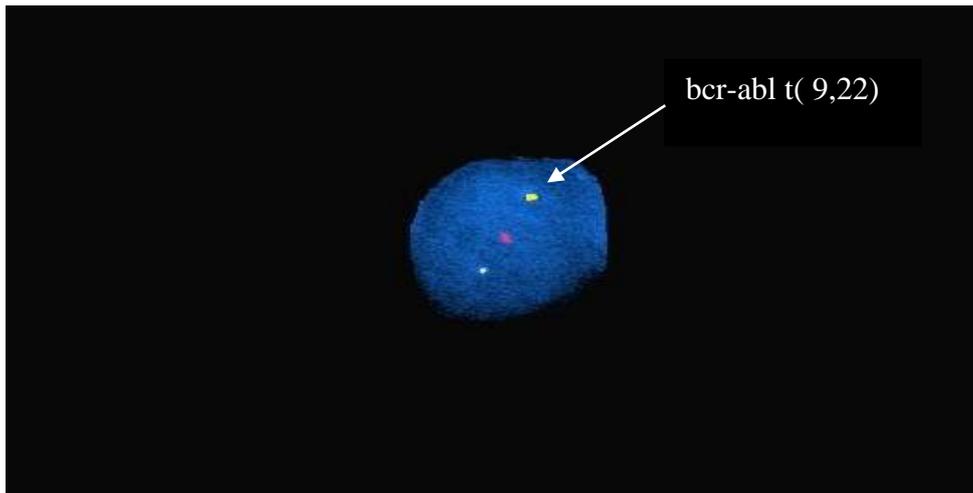


Figure 42 : Résultat d'une FISH positive du patient avec caryotype normale avec chromosome Ph-.

Discussion

Etude rétrospective

Selon le nombre :

Parmi les 334 patients diagnostiqués au niveau de l'unité de génétique, il existe une différence dans la répartition du nombre des différents types d'hémopathie maligne.

Le type de leucémie le plus représenté de 2010 à 2015 est la LMC suivi par SMD Puis LAL.

Le nombre des patients diagnostiqués pour LLC et LAM a diminué dans la période 2014-2015, en comparaison avec 2012-2013.

Selon les résultats de l'épidémiologie actuelle des hémopathies malignes de l'hôpital du point G, Bamako, MALI, l'hémopathie la plus fréquente, par rapport aux autres leucémies est LMC, elle représente 78,5%. (21).

En 2012, selon une estimation nationale en France, les nouveaux cas des hémopathies malignes enregistrés sont les LLC et LAM. (22)

Ces résultats concordent avec ceux obtenus dans notre étude.

Selon l'âge :

Les hémopathies malignes atteignent tous les âges. En ce qui concerne leur répartition, nos résultats permettent de dire que la LMC est plus fréquente chez les patients adultes âgés de 38- à 58 ans. Pour SMD, il est diagnostiqué chez les patients dont l'âge est supérieur à 60 ans.

La LAL touche plus rarement les adultes que les jeunes, cependant, les LAM et LLC sont des hémopathies qui touchent les adultes et les jeunes au même temps.

Les résultats obtenus ne concordent pas avec ceux de la littérature. Les résultats de la cytologie des hémopathies malignes à Kinshasa montrent que les entités les plus touchées par LMC sont des patients dont l'âge se situe entre 20 et 39 ans ; pour les SMD et LAM entre 50- 59 ans et au-delà de 60 ans, la LMC prédomine. Ces résultats sont incompatibles avec les notre (23) . Cette différence peut éventuellement être corrélée à la taille de notre échantillon qui n'est pas très significative.

Etude pratique

Cytogénétique classique :

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. (24)

Dans notre série d'étude, la translocation $t(9;22)(q34;q11)$ est retrouvée dans 78,05% de nos patients ce pourcentage est faible par rapport aux données de la littérature.(24)

En ce qui concerne les 3 translocations complexes, elles correspondent à 3 patients dont le myélogramme indique que les 3 patients sont en phase chronique. Ces caryotypes complexes restent un résultat de mauvais pronostics qui ne confortent pas la littérature qui établit que parmi les critères clino-biologiques de la phase d'accélération, les anomalies surajoutées sont présentes.

La cytogénétique conventionnelle permet de détecter les anomalies secondaires importantes pour le pronostic des patients. (24)

Dans le cas des trois translocations variantes retrouvées dans notre série d'étude, elles ont été détectées par un simple caryotype sans faire appel à d'autres techniques complémentaires ou performantes telle que la FISH.

La cytogénétique moléculaire : La 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 (24), ces sondes dites spécifiques pour un locus donné sont utilisées pour la détection de translocations, délétions ou amplifications géniques. (25)

La cytogénétique classique possède cependant des limite de 2,5% (pour Virgine et Françoise) à 5% (pour Dine et al.). Les patients présentant une translocation masquée, autrement dit une LMC à chromosome Ph négatif, leur produit de fusion est visible uniquement en biologie moléculaire (24,26). En utilisant la technique de FISH, 21,95% des cas de Ph négatif ont été trouvés dans notre série. Ce résultat est très loin de la littérature.

Ces différences de résultats peuvent être dues à un manque d'étude épidémiologique nationale de la LMC au Maroc ou à un travail multicentrique sur une période donnée. De telles études auraient pu nous donner une idée sur la prévalence et l'incidence nationale de la maladie. Pour cette raison, notre étude était donc limitée à l'aspect clinique, symptomatologique et hématologique.

Résumé :

Les hémopathies malignes constituent un groupe de tumeurs qui repose sur la transformation maligne de la moelle osseuse et des cellules dérivées. Elles se caractérisent par un très grand nombre d'anomalies chromosomiques telles les anomalies numériques, les délétions, ou les translocations récurrentes.

La cytogénétique conventionnelle par le caryotype, est probablement l'une des meilleures méthodes pour aider au diagnostic et à la compréhension des hémopathies malignes. Elle est basée sur la division cellulaire et montre les diverses anomalies.

La cytogénétique moléculaire (FISH) permet de mieux cerner certaines anomalies et mettre en évidence de nouvelles anomalies cytogénétiques où le caryotype est apparemment normal. Elle met en évidence également des translocations équilibrées de petites parties chromosomiques, ou des modifications interstitielles fines non détectables par la cytogénétique conventionnelle (caryotype).

Cette étude montre l'importance des techniques de cytogénétique pour des fins de diagnostic différentiel positif et le suivi du traitement.

RÉFÉRENCE :

- (1) E. Delabesse ., V. Asnafi ., E. Macintyre ., 2003. Application à l'hématologie maligne des techniques de biologie moléculaire. revue générale. 335–352.
- (2) L'Association des Cytogénéticiens de Langue Française, Le Groupe Français de Cytogénétique Hématologique, Le Groupe Français de Cytogénétique Oncologique ,2013. Guide de bonnes pratiques en cytogénétique.
- (3) Achouria Bouriach ,2012. La cytogénétique et classification des hémopathies malignes.
- (4) D. Rabineau et JM. Dupont,2001.Notion de base de la cytogénétique .
- (5) Y. RUMPLER , 1967 .Le caryotype humain et ses anomalies, page77 - 85
- (6) Professeurs des Universités de Fribourg, Lausanne, Berne (Suisse),2002.Anomalie de nombre ou de la structure des chromosomes, cours universitaires.
- (7) D. Rabineau et JM. Dupont, 2001.Cytogénétique humaine
- (8) Abdelmoula, NB; Portnoï, MF; Vialard, F; Amouri, A; Van den Akker, J; Taillemite, JL ,2000.Les techniques de cytogénétiques moléculaires : principes et progrès.
- (9) Thomas FEAUGAS, Quentin NICOLAS , Loghan VIAUD,2013.La FISH.
- (10) C.Binet ,2008. Hématopoïèse.
- (11) R. Nasr, A. Bazarbachi ,2012. Leucémie myéloïde chronique : « archétype » de l'impact des traitements ciblés, Livre : Pathologie Biologie, Volume 60, Issue 4 , Pages 239–245.
- (12) La Société de leucémie et lymphome ,2004.La leucémies myéloïde chronique.
- (13) Dr Martine Delain, 2003.Leucémie aiguë myeloblastiques

- (14) Van der Reijden, B. A., et al, 1999. *Oncogene*, page : 543-550
- (15) Andersen, M. K., et al. 2002. *Genes Chromosomes Cancer*, page : 395-400.
- (16) Odile Beyne-Rauzy¹, Guy Laurent², Daniel Adoue¹, 2007, Syndromes myélodysplasiques de l'adulte, *la presse medicale* ,36, 481–491.
- (17) H.cavi , 2014 , *Biologie des leucémies aiguës lymphoblastiques ; Volume 21, Issue 5, Supplément 1*, pages 6–7.
- (18) Equipe medicale medinfos ;2007. *Leucemies aiguës lymphoblastiques*
- (19) Mme Duclos , 2013. *Leucémie lymphoïde chronique*.
- (20) T. Aurran-Schleinitz , C. Arnoulet , V. Ivanov , D. Coso , J. Rey , J.-M. Schiano , A.-M. Stoppa , R. Bouabdallah , J.-A. Gastaut, 2008 , *Prise en charge actuelle de la leucémie lymphoïde chronique Chronic lymphocytic leukaemia: Current management*, *La Revue de médecine interne* 29 , page : 424–435.
- (21) : D A Diallo, L S Cissoko, Y Cissoko, Y Diallo, M Baby, J Mouhaha, C T Diop, M Dembélé, A T Sidibé, V NDjinga NDjinga, G M Salissou, M S Dicko, H A Traoré, 2005. *Epidémiologie actuelle des hémopathies malignes dans les services d'hématologie oncologie médicale et de médecine interne de l'hôpital du Point G, Bamako, Mali*.
- (22) Agence d'expertise sanitaire et scientifique en cancérologie ,2013. *Estimation de l'incidence des hémopathies malignes en France, entre 1980 et 2012, par sous-type histologique, selon la classification la plus récente*
- (23) JP. Mufuta¹, NZ.Kayembe, EK. Gini, K. Mbayo, M. Mbuyi, J.Muwonga, 2014. *Cytologie des hémopathies malignes de type myéloïde a Kinshasa*.

- (24) : Virginie Eclache, Françoise Lejeune, 2002, Détection du chromosome Philadelphie chez les patients atteints de leucémie myéloïde chronique, Place respective de la cytogénétique de l'hybridation in situ en fluorescence et de l'analyse moléculaire par RT-PCR, Revue Française des Laboratoires, N°339.
- (25) : Francine Mugneret, Christiane Charrin, 2002 Cytogénétique conventionnelle et moléculaire des leucémies aigues, Revue Française des Laboratoires, N°344.
- (26) Dine G., Y. Rehn, S. Brahimi, N. Ali Ammar, B. Gaillard, Y. Bocq, G. Fumagalli, 2013, Maladie résiduelle et leucémie myéloïde chronique, La revue : Immuno-Analyse et Biologie Spécialisée, volume : 28, pages : 201-206.