

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



Faculté des Sciences De La Nature Et De La Vie  
Département de Biologie Moléculaire Et Cellulaire

**MEMOIRE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE  
MASTER**

**Domaine :** Sciences de la nature et de la vie      **Filière :** Sciences Biologiques

**Spécialité :** Génétique

**Présenté par :**  
BENABBES Kahina  
RASSOUL Selma  
TAHRI Malek

*Intitulée*

**L'APPORT DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE DANS LE DIAGNOSTIC  
DES HEMOPATHIES MALIGNES**

Soutenue le : Juin 2024

Devant le Jury composé de :

**Nom et Prénom**

<b>Pr. HAMIDECHI Mohamed Abdelhafid</b>	Univ. Abbes Laghrou Khenchela	Président
<b>Dr. HAMADA Youcef</b>	Univ. Abbes Laghrou Khenchela	Examinateur
<b>Dr. BENZAADA Mostefa</b>	Univ. Constantine 1	Encadrant

Année Universitaire : 2023/2024

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

*AU NOM DE DIEU  
LE TOUT MISERICORDIE  
LE TRES MISERICORDIEUX*

## **Remerciements**

*Nous remercions « Allah » de nous avoir accordé des connaissances de la science et de nous avoir aidés à réaliser ce travail, et qui sans sa miséricorde ce travail n'aura pas abouti.*

*Au terme de ce modeste travail nous tenons à remercier chaleureusement et respectivement notre encadrant **Mr. BENSAADA Mostefa** pour nous avoir proposé ce sujet et avoir dirigé nos travaux, pour ses encouragements, sa gentillesse, patience et sa rigueur dans le travail. Un suivi permanent enrichit de beaucoup d'encouragements.*

*Mes profonds remerciements vont aux membres du Jury  
Je tiens à remercier chaleureusement **Monsieur HAMIDECHI Mohamed Abdelhafid** notre président de jury pour avoir accepté de participer à l'évaluation de ce mémoire.*

*Mes sincères reconnaissances à **Monsieur HAMADA Youcef** de nous avoir honoré en acceptant d'en être examinateur du jury.*

*À tous les membres du personnel du **Département des sciences biologiques**, et en particulier à tous **mes professeurs et enseignants** qui sont intervenus durant notre formation universitaire, je souhaite exprimer ma gratitude pour avoir partagé leurs connaissances avec nous. Ils m'ont fait découvrir la spécialité de la génétique.*

*Les mots ne suffisent pas pour remercier **nos parents** et toutes **nos familles** pour leur soutien et pour avoir toujours cru en nous. Ce travail est aussi le fruit de leur patience.*

*Enfin, nous adressons nos plus sincères remerciements à tous **nos proches, amis et collègues** et toute **la promotion de génétique**, qui ont toujours soutenu et encouragé au cours de la réalisation de ce mémoire.*

*Merci à tous et à toutes et que toute personne qui a contribué de près ou de loin à la réalisation de notre projet, trouve ici l'expression de nos sincères sentiments.*

***Merci ...***

# *Dédicace*

*Avec l'aide de **Dieu** le Tout-puissant qui m'a éclairé les chemins du savoir, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie à :*

*À celui que j'aime le plus au monde. À celui qui m'a tout donné sans compter. A la source de laquelle j'ai toujours puisé soutien, courage et persévérance... **mon très cher père** Puisse Dieu tout-puissant t'accorder longue vie, bonheur, santé et prospérité.*

*À la femme qui a souffert sans me laisser souffrir et qui n'a épargné aucun effort pour me rendre heureuse... **mon adorable mère** tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, le fil d'espoir qui allumer mon chemin. Tes prières m'ont été d'un grand soutien au cours de ce long parcours.*

*À mon frère « **Imed Eddine** » et ma sœur « **Insaf** » et son mari et notre petit ange « **Ghaith Erahmane** »*

*En témoignage de l'attachement, de l'amour et de l'affection que je porte pour vous. Vous êtes toujours dans mon cœur. Je vous remercie d'être l'épaule sur qui je peux toujours compter. Que Dieu te protège et consolide les liens sacrés qui nous unissent.*

*À mes copines « **Selma** » « **Dorsaf** » et « **Manel** » Vous êtes devenues pour moi de véritables sœurs qui n'ont cessé de me soutenir et m'accompagner en toute épreuve le long de mes études. Vous avez toujours donné l'exemple de mes amis attentifs et fidèles, et des camarades serviables et marrantes. Je vous souhaite santé, bonheur, prospérité et le succès.*

*Sans oublier mon binôme « **Selma** » et « **Malek** » pour son soutien moral sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.*

*À tous mes collègues **de promotion de « master génétique »** pour ces années inoubliables passées à leurs côtés, pour leur soutien indispensable tout au long de mes études je vous souhaite que de succès.*

*À tous **mes professeurs** qui m'ont enseigné Puisse ce modeste travail vous exprimez ma profonde reconnaissance, mon respect.*

*À tous qui m'aiment.*

***BENABBES** Kahina*

# *Dédicace*

*Celui qui a dit " je suis à elle ", l'a obtenue.  
Le voyage n'était pas court et il ne devrait pas l'être, le rêve n'était pas proche et le chemin n'était pas pavé de facilités. Mais je l'ai fait et je l'ai obtenu.*

*Louange à Dieu, avec amour, gratitude et reconnaissance, grâce à qui aujourd'hui je regarde un rêve longtemps attendu qui est maintenant une réalité dont je suis fière.  
À l'achèvement de ce projet de fin d'études, je tiens à exprimer ma gratitude la plus sincère à toutes les personnes qui ont contribué à mon parcours.*

*En premier lieu, je remercie chaleureusement mon ange pur et ma force après Dieu, mon premier et éternel soutien, **ma mère Naziha**, qui a inculqué dans son sein comment être humain avant que je ne pousse mon premier cri dans ce monde. Je te dédie cet accomplissement qui sans tes sacrifices, n'aurait pas existé, reconnaissante que Dieu t'ait choisie pour moi parmi les humains, toi qui es le meilleur soutien et compensation.*

*À celui qui m'a soutenu sans limites et qui m'a donné sans rien attendre en retour, **mon père Boumaaraf**, qui m'a élevé sous son aile pour être honnête avant que je ne fasse mon premier pas sur le chemin de la vie.*

*À ceux qui ont tendu la main sans ne se lasser ni se fatiguer quand j'étais faible, **mes frères Abd Ennour et Taha Abd Elbasset**, que dieu vous garde comme des piliers solides pour moi.*

*À celle qui a cru en mes capacités et a la sécurité de mes jours, **ma sœur Soumia**, à celle qui me rappelle ma force et qui se tient derrière moi comme mon ombre, **ma petite sœur Yasmine Oum Elkhir**. Aux compagnons du premier pas et de l'avant-dernier pas, à ceux qui ont été pendant les années de disette un nuage pluvieux.*

*Je souhaite remercier chaleureusement mes amies et mes copines **Kahina, Aya et Manel**, pour les moments de partage, les conseils avisés et les souvenirs inoubliables que nous avons créés ensemble, je suis reconnaissante.*

*Un merci spécial à mon binôme, **Kahina et Malek** avec qui j'ai partagé les défis et les succès, et dont la collaboration a été essentielle à la réalisation de ce travail.*

*Je n'oublie pas mon fidèle compagnon, **mon chat Bagira**, pour sa présence apaisante et les moments de détente qu'il m'a offerts durant les périodes de travail intense.*

*RASSOUL Selma*

## **Dédicace**

*Tout d'abord, je tiens à remercier et rendre grâce à DIEU de m'avoir donné la capacité, la volonté de mener à bien terminer ce modeste travail et la patience d'aller jusqu'au bout du rêve.*

*Du profond de mon cœur, je dédie ce modeste travail en signe de respect, reconnaissance et de remerciement :*

*Au meilleur des pères « **Messaoud** »*

*Pour m'avoir soutenu moralement et matériellement jusqu'à ce jour, pour son amour, et ses encouragements. Que ce travail, soit pour vous, un faible témoignage de ma Profonde affection et tendresse. Qu'ALLAH le tout-puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur et te protège de tout mal.*

*À ma très chère maman « **Saliha** »*

*Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études. Qu'ALLAH te protège et te donne la santé, le bonheur et longue vie.*

*À mes chers frères « **Soheib** » et « **Dhirar** » et ma sœur « **Noussaiba** » et sa petite famille aucune dédicace ne saurait exprimer tout ce que je ressens pour vous, je vous remercie pour tout le soutien exemplaire que vous me portez je vous souhaite tout le bonheur du monde.*

*À mes copines « **Tharaâ Malki** » et « **Malek Bouadjehine** » Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection et mes pensées, vous êtes pour moi des sœurs et des amies sur qui je peux compter. En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.*

*En particulier à mon binôme « **Selma** » et « **Kahina** » pour tous les souvenirs pendant les années d'études ensemble surtout les deux dernières années vous avez une place spéciale dans mon cœur.*

*JAHIR Malek*

# *Résumé*

Un cancer du sang appelé hémopathie maligne n'apparaît pas dans les organes comme les autres cancers. Leur prolifération est favorisée par des anomalies de la moelle osseuse et des cellules sanguines matures (responsables d'hémopathies d'évolution lente ou chronique) ou immatures (responsables d'hémopathies d'évolution rapide ou aiguë).

Les hémopathies malignes sont donc des croissances anormales et instables de cellules hématopoïétiques ou de cellules sanguines. Cela explique la grande variété des cancers du sang qui comprennent des types tels que la leucémie, le lymphome et le myélome.

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est un syndrome condition myéloproliférative clonale à prédominance granuleuse, résultant de la transformation d'une cellule-souche pluripotente. Cette maladie est associée à une anomalie génétique impliquant la fusion du gène ABL du chromosome 9 avec le gène BCR du chromosome 22, cette fusion conduit à la formation d'un chromosome anormal appelé chromosome Philadelphie.

Le réarrangement BCR-ABL est généralement détecté par biologie moléculaire. Toutefois, lorsqu'il s'agit d'un variant complexe de la translocation de chromosome Philadelphie, le réarrangement BCR-ABL peut ne pas être détecté par biologie moléculaire. Dans cette situation, une étude à l'aide de FISH. La leucémie myéloïde chronique représente un exemple de cancérogenèse. Son pronostic s'est considérablement amélioré grâce aux inhibiteurs de tyrosine kinase ou ITK. En ce moment, le suivi moléculaire, l'analyse cytogénétique (caryotype, FISH) et la biologie moléculaire (RT-PCR) sont actuellement des examens clés pour le diagnostic.

Le diagnostic moléculaire a révolutionné la prise en charge des hémopathies malignes en fournissant des outils précieux pour le diagnostic, le pronostic, la stratification du risque et la surveillance de la maladie. Il permet une identification précise des sous-types homéopathiques, détecte les mutations génétiques spécifiques, surveille la maladie résiduelle et guide le choix des traitements. Sur le plan économique, il réduit les coûts en évitant des examens et traitements inutiles, améliore l'efficacité des traitements et optimise l'allocation des ressources médicale.

Notre travail se résume en une étude bibliographique ayant pour objectifs la mise en évidence du diagnostic moléculaire dans les hémopathies malignes. Comme nous n'avons pas effectué d'étude pratique, nous avons présenté des résultats émanant des différentes études qui ont été ensuite discutées à partir des données obtenues.

**Mots clés :** les hémopathies malignes ; Leucémie ; Lymphome ; Myélome ; Leucémie myéloïde chronique ; Chromosome Philadelphie ; Gène BCR ; Gène ABL ; Biologie moléculaire.

# *Abstract*

Blood cancers, known as hematological malignancies, do not appear in the organs like other cancers. Their proliferation is favored by abnormalities of the bone marrow and mature blood cells (responsible for slow or chronic hemopathies) or immature cells (responsible for rapid or acute hemopathies).

Hematological malignancies are therefore abnormal and unstable growths of hematopoietic or blood cells. This explains the wide variety of blood cancers, including types such as leukemia, lymphoma and myeloma.

Chronic myeloid leukemia (CML) is a predominantly granular clonal myeloproliferative disorder resulting from the transformation of a pluripotent stem cell. The disease is associated with a genetic abnormality involving the fusion of the ABL gene on chromosome 9 with the BCR gene on chromosome 22, leading to the formation of an abnormal chromosome known as the Philadelphia chromosome.

The BCR-ABL rearrangement is usually detected by molecular biology. However, in the case of a complex variant of the Philadelphia chromosome translocation, the BCR-ABL rearrangement may not be detected by molecular biology. In this situation, a study using FISH is recommended. Chronic myeloid leukemia is an example of carcinogenesis. Its prognosis has improved considerably thanks to tyrosine kinase inhibitors or TKIs. Today, molecular monitoring, cytogenetic analysis (karyotype, FISH) and molecular biology (RT-PCR) are key diagnostic tests.

Molecular diagnostics have revolutionized the management of hematological malignancies, providing invaluable tools for diagnosis, prognosis, risk stratification and disease monitoring. It enables precise identification of homeopathic subtypes, detects specific genetic mutations, monitors residual disease and guides treatment choices. In economic terms, it reduces costs by avoiding unnecessary tests and treatments, improves treatment efficacy and optimizes the allocation of medical resources.

Our work can be summed up as a bibliographical study with the aim of highlighting molecular diagnosis in hematological malignancies. As we did not carry out any practical studies, we presented the results of the various studies, which were then discussed on the basis of the data obtained.

**Key words** : Hematological malignancies ; Leukemia ; Lymphoma ; Myeloma ; Chronic myeloid leukemia ; Philadelphia chromosome ; BCR gene ; ABL gene ; Molecular biology.

## ملخص

لا يتطور سرطان الدم المسمى بالأورام الدموية الخبيثة في الأعضاء مثل السرطانات الأخرى. ويحدث تكاثرها بسبب تشوهات في نخاع العظم وخلايا الدم الناضجة (المسؤولة عن اعتلالات الدم البطيئة أو المزمنة) أو غير الناضجة (المسؤولة عن اعتلالات الدم السريعة أو الحادة).

وبالتالي فإن الأورام الخبيثة في الدم هي نمو غير طبيعي وغير مستقر للخلايا المكونة للدم أو خلايا الدم. وهذا ما يفسر التنوع الكبير في أنواع سرطانات الدم، والتي تشمل أنواعاً مثل اللوكيميا والورم اللمفاوي والورم النخاعي. سرطان الدم النقوي المزمن (LMC) هو في الغالب متلازمة حالة تكاثر نقوي نسيلي حبيبي، ناتجة عن تحول خلية جذعية متعددة القدرات. يرتبط هذا المرض بخلل جيني يتمثل في اندماج الجين ABL الموجود على الكروموسوم 9 مع الجين BCR الموجود على الكروموسوم 22، ويؤدي هذا الاندماج إلى تكوين كروموسوم غير طبيعي يسمى كروموسوم فيلادلفيا.

يتم اكتشاف إعادة ترتيب BCR-ABL بشكل عام عن طريق البيولوجيا الجزيئية. ومع ذلك، في حالة المتغير المعقد لانتقال كروموسوم فيلادلفيا، قد لا يتم الكشف عن إعادة ترتيب BCR-ABL بواسطة البيولوجيا الجزيئية. في هذه الحالة، يوصى بإجراء دراسة باستخدام FISH. يُعدّ ابيضاض الدم النخاعي المزمن مثلاً على التسرطن. وقد تحسن تشخيصه بشكل كبير بفضل مثبطات التيروسين كيناز أو مثبطات التيروسين كيناز. في الوقت الحاضر، تُعد المراقبة الجزيئية والتحليل الوراثي الخلوي) النمط النووي و (FISH والبيولوجيا الجزيئية (RT-PCR) اختبارات تشخيصية رئيسية.

أحدثت التشخيصات الجزيئية ثورة في إدارة الأورام الخبيثة الدموية حيث توفر أدوات لا تقدر بثمن للتشخيص والتشخيص والتصنيف الطبقي للمخاطر ومراقبة المرض. فهي تُمكن من التحديد الدقيق للأنواع الفرعية المتجانسة، وتكشف عن طفرات جينية محددة، وترصد المرض المتبقي وترشد إلى اختيار العلاجات. من الناحية الاقتصادية، فهو يقلل التكاليف من خلال تجنب الاختبارات والعلاجات غير الضرورية، ويحسن فعالية العلاجات ويحسن تخصيص الموارد الطبية على النحو الأمثل.

تم تلخيص عملنا في دراسة ببيولوجيا جزيئية تهدف إلى تسليط الضوء على التشخيص الجزيئي في الأورام الدموية الخبيثة. وبما أننا لم نقوم بإجراء دراسة عملية، فقد قدمنا نتائج من الدراسات المختلفة التي تمت مناقشتها بعد ذلك بناءً على البيانات التي تم الحصول عليها.

**الكلمات المفتاحية:** الأورام الخبيثة الدموية؛ سرطان الدم؛ سرطان الغدد الليمفاوية؛ النخاع الشوكي؛ ابيضاض الدم النقوي المزمن؛ كروموسوم فيلادلفيا؛ الجين BCR ؛ جين ABL ؛ البيولوجيا الجزيئية.

# Sommaire

REMERCIEMENT

DEDICACES

RESUMES

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES ABREVIATIONS

Introduction Générale ..... 1

## CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES HEMOPATHIES MALIGNES

1.Le sang .....	3
2.La moelle osseuse .....	3
3.Les cellules souches hématopoïétiques .....	4
4.L'hématopoïèse .....	4
5.La régulation de l'hématopoïèse.....	5
6.Les hémopathies malignes .....	6
7.Classification des hémopathies malignes .....	6
7.1.La leucémie .....	6
7.1.1.Leucémie aigüe .....	7
7.1.1.1.La leucémie aigüe lymphoblastique (LAL).....	7
7.1.1.2.La leucémie aigüe myéloblastique (LAM).....	7
7.1.2.Leucémie chronique .....	7
7.1.2.1.Leucémie myéloïde chronique (LMC) .....	8
7.1.2.2.Leucémie lymphoïde chronique (LLC) .....	8
7.2.Les lymphomes .....	8
7.2.1.Les lymphomes de Hodgkin .....	8
7.2.2.Les lymphomes non Hodgkiniens (LNH) .....	9
7.3.Les myélomes .....	9
8.L'épidémiologie.....	9
9.Les facteurs de risque.....	11
9.1.Les facteurs non génétiques.....	11
9.2.Les facteurs génétiques .....	11
10.Les symptômes .....	13

10.1.Les symptômes de la Leucémie .....	13
10.2.Les symptômes des myélomes.....	14
10.3.Les symptômes des lymphomes .....	15
11.Physiopathologie moléculaire des hémopathies malignes .....	15
11.1.Physiopathologie des LAL .....	15
11.2.Physiopathologie des LAM .....	15
11.3.Physiopathologie des LLC .....	16
11.4.Physiopathologie des LMC .....	16
11.4.1.Le chromosome Philadelphie.....	16
11.4.2.Gène ABL.....	17
11.4.3.Gène BCR.....	19
11.4.4.Le gène de fusion hybride BCR/ABL.....	19

## CHAPITRE II : DIAGNOSTIC DES HEMOPATHIES MALIGNES

I.DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE.....	21
1.Le myélogramme .....	21
2.L'hémogramme .....	21
3.La cytochimie .....	22
4.L'immunophénotypage.....	22
II.DIAGNOSTIC CYTOGENETIQUE.....	22
1.Le caryotype .....	22
2.Hybridation in situ en fluorescence (FISH) .....	23
2.1.La FISH sur métaphase : .....	24
2.2.La FISH interphasique .....	24
3.LA CGH ARRAY.....	25
III.DIAGNOSTIC MOLECULAIRE .....	25
1.Séquençage à haut débit (NGS) :.....	25
2.RT-PCR en temps réel ou quantitative .....	26
2.1.L'intérêt de RT-PCR en temps réel ou quantitative.....	27
I.MATERIEL ET METHODE .....	29
1.La RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) : .....	29
2.Le principe de la PCR quantitative dans le cas du diagnostic BCR-ABL .....	30
3.Protocole de la QR-PCR .....	31
4.Principe du kit :.....	32
II.RESULTATS .....	45

Etude de cas exemple.....	45
II.1.Résultats de la technique RT-PCR :.....	46
III.DISCUSSION DES RESULTATS.....	49
Conclusion générale.....	51
Références bibliographiques .....	51

## *Liste des figures*

<b>Figure 1:</b> La composition du sang. ....	3
<b>Figure 2:</b> Schéma de la moelle osseuse .....	4
<b>Figure 3:</b> Processus schématique de l'hématopoïèse humaine . ....	5
<b>Figure 4.</b> Répartition des structures hospitalières prenant en charge les hémopathies malignes en Algérie . ....	11
<b>Figure 5.</b> La translocation chromosomique t (9;22) (q34;q11) est responsable de la formation du chromosome Philadelphie .....	17
<b>Figure 6.</b> Structure de gène ABL .....	18
<b>Figure 7.</b> Structure de gène BCR. ....	19
<b>Figure 8 .</b> Gène hybride BCR-ABL .....	20
<b>Figure 9.</b> Les gènes de fusion BCR-ABL et leurs protéines résultantes .....	20
<b>Figure 10.</b> Myélogramme montrant une hyperplasie granuleuse . ....	21
<b>Figure 11.</b> Présentation du chromosome Philadelphie sur le Caryotype à la phase chronique de la LMC .....	23
<b>Figure 12.</b> Le résultat FISH de la translocation t(9;22) .....	24
<b>Figure 13.</b> Illustration schématique des étapes de la RT-PC. ....	30
<b>Figure 14.</b> Séquences amorce/sonde du gène de fusion BCR-ABL. ....	31
<b>Figure 15.</b> Schéma résumé de la PCR en temps réel quantitative. ....	33
<b>Figure 16.</b> Résultat obtenu après analyse en RtgPCR.....	40

<b>Figure 17.</b> Courbes d'amplification et courbes standard de l'ABL. ....	41
<b>Figure 18.</b> Représentation des patients concernés par l'étude. ....	46
<b>Figure 19.</b> Photographie du profil électrophorétique présentant les différents transcrits du gène chimère Bcr-Abl. ....	46
<b>Figure 20.</b> Répartition des transcrits du gène chimère Bcr-Abl chez la population LMC..	47

---

---

***Liste des tableaux***

---

---

<b>Tableau 1.</b> Les enquêtes épidémiologiques en Algérie portant sur les hémopathies malignes des sujets âgés (1992-2021).....	10
<b>Tableau 2.</b> Sexe, effectifs et âge moyen des cas analysés. ....	46
<b>Tableau 3.</b> Distribution des transcrits du gène chimère Bcr-Abl chez la population LMC. ....	47

---

*Liste des Abréviations*

<b>ABL</b>	Abelson ; le gène de la tyrosine-protéine kinase ABL1
<b>ACA</b>	Anomalies cytogénétiques additionnelles
<b>ACM</b>	Anticorps monoclonaux
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	Acide désoxyribonucléique complémentaire
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>ATM</b>	Ataxia telangiectasia mutated
<b>BAC</b>	Chromosomes artificiels de bactéries
<b>BCR</b>	Break Point Cluster Region
<b>CGH</b>	Hybridation génomique comparative
<b>CRAB</b>	Calcium ; reins ; anémie ; bones
<b>CSF</b>	Colony Stimulating Factor
<b>CSH</b>	Les Cellules Souches Hématopoïétiques
<b>dCTP</b>	Désoxycytidine triphosphate
<b>EPO</b>	Eosinophil Peroxidase
<b>FISH</b>	Hybridation in situ en fluorescence
<b>GAP</b>	GTPase-activating protein
<b>GDP</b>	Guanosine diphosphate
<b>GG</b>	Ganglionnaire
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
<b>GTP</b>	Guanosine triphosphate
<b>HM</b>	Hémopathies malignes
<b>HTLV</b>	Virus T-lymphotrope humain
<b>IGF</b>	Insulin-like growth factor
<b>Ig</b>	Antigènes
<b>IL</b>	Interleukin
<b>JAK2</b>	Janus kinase 2
<b>KDa</b>	Kilodalton
<b>LA</b>	Leucémies aiguës
<b>LAL</b>	Leucémie lymphoblastique aiguë
<b>LAM</b>	Leucémie Myéloïde Aiguë
<b>LLC</b>	Leucémie lymphoïde chronique
<b>LIF</b>	Facteur Inhibiteur de la Leucémie
<b>LMA</b>	Leucémie myéloblastique aiguë
<b>LMC</b>	Leucémie myéloïde chronique
<b>LNH</b>	Lymphome non hodgkinien
<b>M-BCR</b>	Major-Break point Cluster Region
<b>M-CSF</b>	Macrophage Colony Stimulating Factor
<b>MIP1-<math>\alpha</math></b>	Macrophage inflammatory protein-1 alpha
<b>ML</b>	Mixed-Lineage Leukemia
<b>MO</b>	Moelle Osseuse
<b>MRD</b>	Maladie résiduelle minimale
<b>NGS</b>	Séquençage de nouvelle génération
<b>NK</b>	Natural killer cell
<b>NLS</b>	Nuclear Localization Signal
<b>ORL</b>	Oto-rhino-laryngées

<b>PCB</b>	Polychlorobiphényle
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>PDGF</b>	Platelet-derived growth factor
<b>PH</b>	Philadelphie
<b>PN</b>	Peptides Natriurétiques
<b>PV</b>	Polyglobulie de Vaquez
<b>RUNX1</b>	Runt related transcription factor 1
<b>RT-PCR</b>	Réaction de transcription inverse-polymérase chain
<b>RT-QPCR</b>	Rétrotranscription quantitative real time polymerase chain reaction
<b>SCF</b>	Stem Cell Factor
<b>SH</b>	Src homology
<b>SMP</b>	Syndrome myéloprolifératif
<b>SMD</b>	Syndromes myélodysplasiques
<b>TCR</b>	Récepteur des lymphocytes T
<b>TE</b>	Thrombocytémie essentielle
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming growth factor beta
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor necrosis factor alpha
<b>TPO</b>	Thyroid peroxidase
<b>VIH</b>	Human immunodeficiency viruses
<b>WD</b>	Maladie de Waldenström
<b>YAC</b>	Yeast artificial chromosome

---

# **INTRODUCTION**

## **GENERALE**

## **Introduction Générale**

Les hémopathies malignes sont des proliférations anarchiques, clonales et acquises caractérisée par la prolifération excessive et incontrôlée, dans la moelle osseuse et des cellules souches hématopoïétiques. Elles sont classées en trois types différents (leucémie, lymphome, myélome) selon les cellules impliquées et l'évolution.

Les principales formes de leucémie sont séparées en quatre catégories selon le type cellulaire impliqué (myéloïde et lymphoïde), et le caractère aiguë ou chronique de la prolifération. Une leucémie chronique évolue lentement, alors que la leucémie aiguë évolue rapidement.

Les études biologiques (myélogramme, hémogramme, cytochimie, immunophénotypage). Et les études cytogénétiques (caryotype, hybridation in situ en fluorescence (FISH)) sont actuellement des examens clés pour le diagnostic et le suivi thérapeutique. Ainsi, l'analyse moléculaire basée sur différentes techniques, telles que la réaction en chaîne de la polymérase (PCR), est devenue un élément essentiel du panel de diagnostic de la leucémie aiguë.

Au cours de la maladie, la charge résiduelle de cellules leucémiques peut être contrôlée par des techniques quantitatives de PCR très sensibles ("PCR en temps réel"). Actuellement, de nouvelles techniques, telles que le séquençage à haut débit (séquençage de nouvelle génération, NGS) ou le profilage de l'expression des gènes à l'aide de puces à ADN, sont explorées en vue d'une utilisation dans les hémopathies malignes et sont évaluées dans le cadre d'études précliniques.

Cela démontre que les diagnostics moléculaires pour les leucémies aiguës sont en développement continu.

Cette leucémie est caractérisée par une anomalie cytogénétique acquise, dite « le chromosome de Philadelphie » correspondant à une translocation réciproque entre une portion du gène Bcr en 22q11.23 et le gène Abl « Abelson » en 9q34.1. La conséquence de cette translocation est la naissance d'un gène de fusion Bcr-Abl, conduisant à la formation d'une protéine chimérique Bcr-Abl activée constitutivement avec une dérégulation de la production de la tyrosine kinase à l'origine de la maladie.

La détection du gène BCR-ABL par transcriptase inverse quantitative - réaction en chaîne de la polymérase (RT-PCR) est la pratique standard pour le suivi de la maladie résiduelle chez les patients atteints de leucémie myéloïde chronique qui reçoivent des traitements à base d'inhibiteurs de la tyrosine kinase.

**OBJECTIF DU TRAVAIL :**

Faire une recherche sur l'apport de la biologie moléculaire dans le diagnostic et le suivi des hémopathies malignes en mettant l'accent sur le diagnostic de la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) par la RT-PCR

**CHAPITRE I :**  
**GENERALITES SUR LES**  
**HEMOPATHIES MALIGNES**

## 1. Le sang

Le sang, un tissu conjonctif fluide, circule à l'intérieur des vaisseaux sanguins, comprenant artères, veines et capillaires : les globules rouges (hématies), représentant la majorité (environ 99%), assurent le transport de l'oxygène des poumons vers les tissus corporels, avec une durée de vie moyenne de 120 jours. Les globules blancs (leucocytes), jouent un rôle crucial dans la défense immunitaire de l'organisme, leur durée de vie variant de quelques jours à plusieurs années. Les plaquettes, ou thrombocytes, des fragments cellulaires, participent à la coagulation sanguine et ont une durée de vie de 5 à 7 jours. Quant au plasma, il est principalement constitué d'eau (environ 90%), de protéines telles que l'albumine, les globulines, le fibrinogène et les facteurs de coagulation, ainsi que de sels minéraux, de glucides, de lipides, d'hormones, d'enzymes et de pigments (1).

En outre, le plasma est également impliqué dans le transport des cellules immunitaires et des hormones à travers l'organisme, garantissant ainsi le bon fonctionnement et l'homéostasie générale du corps (2).

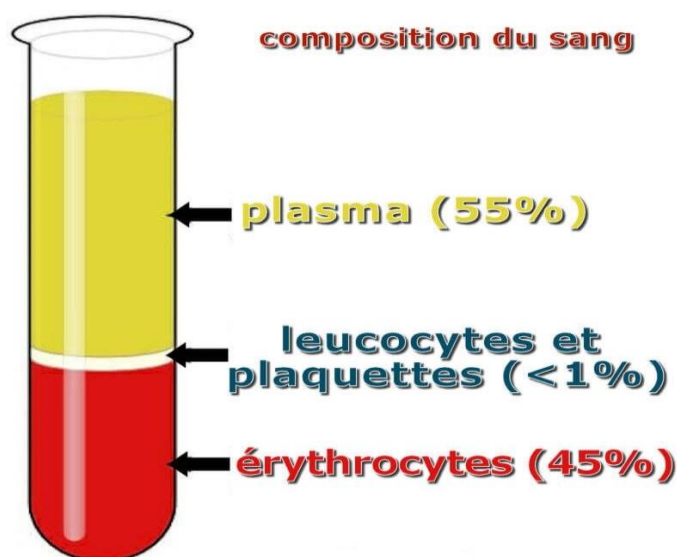


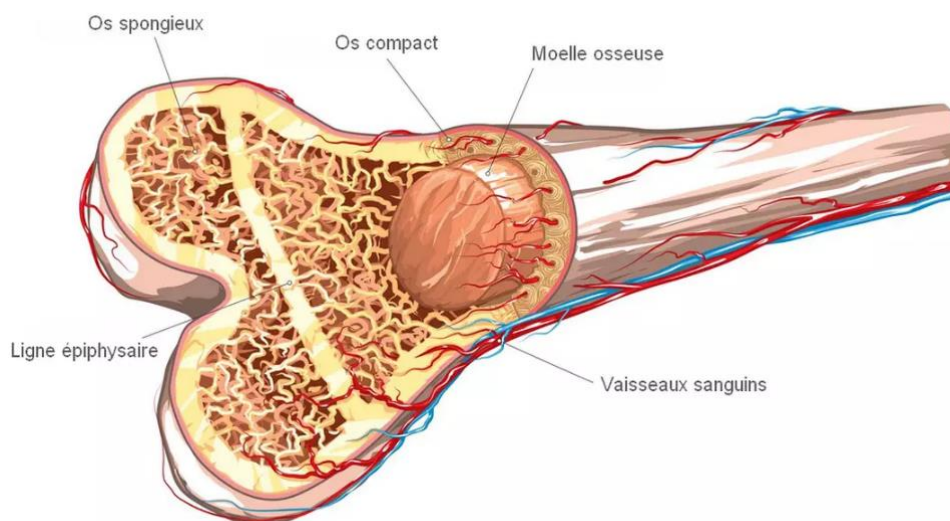
Figure 1: La composition du sang. (3)

## 2. La moelle osseuse

La moelle osseuse est une substance spongieuse riche en nutriments qu'on trouve dans les parties creuses des os longs et plats comme le sternum ou les os des hanches. Sa principale fonction est de produire les différentes cellules sanguines notamment les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes à partir des cellules souches hématopoïétiques (4).

La moelle osseuse est un organe essentiel du système immunitaire, qui fabrique des lymphocytes pour aider à combattre les infections et détruire les cellules anormales. Les maladies de la moelle osseuse sont classées en deux grandes catégories : la première comprend la prolifération des cellules hématopoïétiques les plus immatures (explosives) avec une maturation arrêtée, comme les leucémies aiguës, et la deuxième comprend l'augmentation des cellules hématopoïétiques sans

maturation stoppée, comme la myélodysplasie (5).



**Figure 2:** Schéma de la moelle osseuse (6).

### 3. Les cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont à l'origine de toutes les cellules du sang, telles que les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes des cellules qui sont présentes dans la moelle osseuse. Elle joue un rôle fondamental pour l'hématopoïèse. Elles apparaissent au cours de la vie embryonnaire, durant la phase embryonnaire ; les cellules souches hématopoïétiques émergent et transitent par divers organes hématopoïétiques avant de coloniser la moelle osseuse (7).

Ces cellules caractérisées par deux propriétés, celle de s'auto-renouveler et celle de se différencier :

- **L'auto-renouvellement** : c'est à dire la capacité de se diviser et de donner naissance, à de nouvelles CSHs sans se différencier
- **La différenciation** : Les cellules souches hématopoïétiques peuvent produire tous les types cellulaires matures du sang et du système immunitaire par différenciation en raison de leur capacité multi potentielle (8).

### 4. L'hématopoïèse

L'hématopoïèse correspond à l'ensemble des mécanismes biologiques assurant la différenciation progressive et la maturation des cellules souches hématopoïétiques (CSH) en cellules sanguines matures.

Cette production est réalisée grâce à l'influence de divers facteurs à l'extérieur et à l'intérieur des cellules, qui guident et orientent une différenciation au fil des étapes des cellules souches vers les différentes lignées sanguines (9).

Le renouvellement des circulations sanguines chez les adultes est assuré par la moelle osseuse des vertèbres, des côtes, du crâne, du bassin et de la partie proximale du fémur (10).

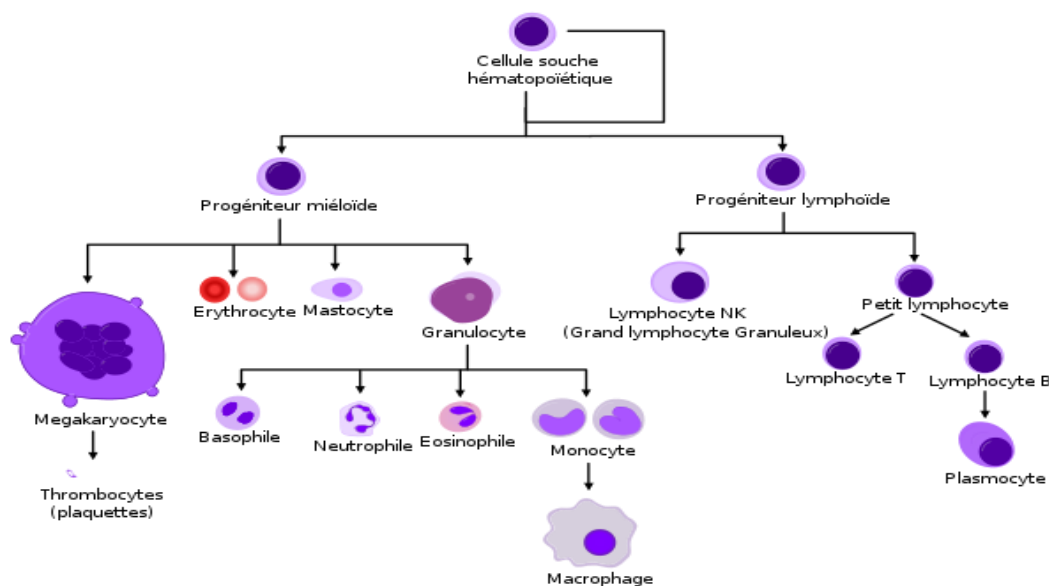


Figure 3. Processus schématisé de l'hématopoïèse humaine (11).

## 5. La régulation de l'hématopoïèse

Trois composants sont essentiels pour garantir un processus d'hématopoïèse correcte :

- A. **Le microenvironnement** donne aux cellules souches les conditions anatomiques et intercellulaires nécessaires à l'hématopoïèse. Il est constitué du :
  - **Stroma médullaire**, qui regroupe des fibroblastes, des cellules endothéliales, des macrophages, des cellules épithéliales et des adipocytes organisés au sein des logettes hématopoïétiques. Ces cellules sécrètent des matrices extracellulaires ainsi que des facteurs de croissance (CSF) (1).
  - **La matrice extracellulaire** est composée d'un réseau fibrillaire, notamment de collagène de type I-II, ainsi que de glycoprotéines et de protéoglycanes tels que la fibronectine, la laminine et la thrombospondine (1).
- B. **Les vitamines** telles que la vitamine B12 et l'acide folique sont essentielles pour la synthèse de l'ADN et donc pour la division cellulaire. Leur déficit entraîne des anomalies de formation dans toutes les lignées cellulaires (1).
- C. **D'autres éléments**, comme le fer, sont nécessaires à la formation de protéines spécifiques de différentes lignées cellulaires, en particulier pour l'érythropoïèse et la synthèse de l'hémoglobine, ainsi que les oligoéléments (1).
- D. **Les facteurs de croissances ou CSF** : ces facteurs de croissance jouent un rôle crucial dans la régulation de l'hématopoïèse, allant de la survie et la différenciation des cellules souches à la maturation des cellules hématopoïétiques, offrant ainsi des perspectives prometteuses pour le traitement des maladies hématologiques (1).

On distingue schématiquement 3 types de facteurs de croissance selon leur lieu d'action au cours de l'hématopoïèse.

- **Facteurs multipotents** : Ces facteurs agissent sur les cellules souches les plus immatures ainsi que sur les progéniteurs les plus différenciés, voire sur les cellules les plus matures. Exemples : IL3 (ou SCF) et GM-CSF (1).

- **Facteurs de promotion** : Ces facteurs augmentent le nombre de cellules souches en cycle cellulaire et sensibilisent les cellules souches totipotentes à l'action des autres facteurs de croissance. Exemples : IL1, IL4, IL6, LIF (facteur inhibiteur de la leucémie) (1).
- **Facteurs restreints** : Ils agissent sur les cellules souches engagées et favorisent la multiplication cellulaire et la maturation des précurseurs. Exemples : G-CSF, M-CSF, IL5, IL4, IL6, EPO, TPO (1).

**E. Facteurs de croissance non spécifiquement hématopoïétiques** : Ils ont une action potentialisatrice et nécessitent la présence d'autres facteurs de croissance, notamment l'érythropoïétine, pour obtenir des colonies de certaines cellules. Exemples : IGF1-2, PDGF, STH, hormones thyroïdiennes, androgènes, cortisone, dexaméthasone (1).

**F. Régulation négative de l'hématopoïèse (les inhibiteurs)** : Certains facteurs agissent comme inhibiteurs de la prolifération des cellules hématopoïétiques. Exemples : interféron- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , prostaglandines E, lactoferrine, isoferitines acides, peptides isolés des PN (1).

## 6. Les hémopathies malignes

Un cancer du sang appelé hémopathie maligne n'apparaît pas dans les organes comme les autres cancers. Leur prolifération est favorisée par des anomalies de la moelle osseuse et des cellules sanguines matures (responsables d'hémopathies d'évolution lente ou chronique) ou immatures (responsables d'hémopathies d'évolution rapide ou aigüe) (12). Les hémopathies malignes sont donc des croissances anormales et instables de cellules hématopoïétiques ou de cellules sanguines (tels que les globules rouges, les globules blancs, les plaquettes et les ganglions). Cela explique la grande variété des cancers du sang (13).

## 7. Classification des hémopathies malignes

### 7.1. La leucémie

La leucémie (cancer du sang) est un cancer pédiatrique le plus courant et le plus "connu", mais il peut également affecter les adolescents, les adultes et les personnes âgées.

La leucémie est une maladie du sang caractérisée par une augmentation significative du nombre de globules blancs qui envahissent le sang, les organes et la moelle osseuse. Ils empêchent les autres cellules sanguines (globules rouges et plaquettes) de se produire, de se développer et de se mûrir (13).

Les cellules leucémiques peuvent également envahir d'autres organes comme les ganglions lymphatiques, le taux, le foie, la peau, les viscères, les testicules ou le système nerveux central (14).

#### ❖ Les différents types de leucémie

La leucémie classée en différents types, en fonction de :

- Taux de progression de la maladie (aigüe ou chronique).
- Le type spécifique de cellules souches dans la moelle osseuse (myéloïde ou lymphoïde).

### 7.1.1. Leucémie aigüe

La moelle osseuse est envahie par des proliférations monoclonales incontrôlées de cellules hématopoïétiques immatures, appelées blastes, entraînant des leucémies aiguës (LA) (15).

#### ❖ Classification de leucémies aiguës :

La leucémie aiguë peut être classée en deux types principaux en fonction de la prolifération des blastes, selon que les blastes sont d'origine lymphoïde ou myéloïde :

- La leucémie lymphoblastique aiguë (LAL).
- La leucémie myéloblastique aiguë (LMA).

#### 7.1.1.1. La leucémie aigüe lymphoblastique (LAL)

La leucémie aiguë lymphoblastique est un trouble dans la moelle osseuse se caractérise par une croissance anormale des lymphoblastes malins. Ces lymphocytes jouent un rôle crucial dans la protection contre les infections et dans l'élimination des cellules anormales.

La prévalence de cette maladie est plus élevée chez les jeunes enfants que chez les adultes, (2 et 5 ans) (13).

#### 7.1.1.2. La leucémie aigüe myéloblastique (LAM)

Les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) constituent un ensemble diversifié d'hémopathie maligne caractérisé par une prolifération incontrôlée de précurseurs myéloïdes, incluant les lignées granuleuses et monocytaires. Cela se traduit par une altération de la différenciation cellulaire et une perturbation de l'hématopoïèse normale, entraînant une insuffisance médullaire (16).

Les LAM sont les leucémies aiguës les plus fréquentes chez les adultes (17).

### 7.1.2. Leucémie chronique

Le terme "chronique" fait référence à une progression graduelle de la maladie, caractérisée par une évolution lente au fil des mois ou des années. Dans un premier temps, cette évolution est spontanée, car les cellules responsables de la prolifération dans les leucémies chroniques ont déjà atteint un stade avancé de maturation. Il est important de noter que, contrairement aux leucémies aiguës, les cellules dans les leucémies chroniques restent anormales tout en étant plus matures (18). Les leucémies chroniques sont principalement observées chez les individus âgés (19).

#### ❖ Classification de leucémies chroniques

La leucémie chronique peut être classée en deux types principaux :

- Leucémie myéloïde chronique (LMC).
- La leucémie lymphoïde chronique (LLC).

### 7.1.2.1. Leucémie myéloïde chronique (LMC)

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est un syndrome condition myéloproliférative clonale à prédominance granuleuse, résultant de la transformation d'une cellule souche pluripotente (20). Elle se caractérise par une production excessive et persistante de leucocytes (globules blancs) dans la moelle osseuse, dont une partie est composée de cellules immatures. Ces cellules, lorsqu'elles pénètrent dans la circulation sanguine, présentent des déficiences dans leur développement normal.

L'origine de la maladie est associée à une anomalie génétique impliquant la fusion de deux chromosomes des cellules souches de la moelle osseuse. Cette fusion conduit à la formation d'un chromosome anormal appelé chromosome Philadelphie, nommé d'après la ville américaine où les chercheurs l'ont découvert dans les années 60. Cette anomalie résulte de l'association accidentelle du gène ABL du chromosome 9 avec le gène BCR du chromosome 22, formant ainsi le gène BCR-ABL spécifique aux cellules de la maladie.

Le gène BCR-ABL génère de manière anormale une enzyme appelée tyrosine kinase, qui est responsable de la surproduction de globules blancs. En conséquence, la LMC se caractérise par une prolifération incontrôlée de ces cellules immatures, contribuant aux symptômes et à la progression de la maladie (21).

### 7.1.2.2. Leucémie lymphoïde chronique (LLC)

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est une maladie maligne caractérisée par la multiplication et l'accumulation de petits lymphocytes B matures d'origine monoclonale présentant un phénotype distinctif dans le sang et les organes hématopoïétiques tels que la moelle osseuse, les ganglions, la rate et le foie (22). Elle affecte principalement les individus de plus de 60 ans, et son apparition avant l'âge de 30 ans est extrêmement rare (23).

## 7.2. Les lymphomes

Les néoplasies lymphoïdes ou lymphomes représentent la catégorie la plus fréquente des hémopathies, et elles occupent la troisième place parmi les cancers les plus courants chez les enfants.

Les cellules cancéreuses lymphocytaires, tout comme leurs homologues sains, prolifèrent dans diverses parties du corps, incluant les ganglions lymphatiques, la rate, la moelle osseuse et d'autres organes. Il est possible qu'un lymphome se développe à partir de l'une des deux grandes catégories de lymphocytes : les lymphocytes B ou les lymphocytes T (24).

### ❖ Classification des lymphomes

Il existe deux catégories principales de cancers du système lymphatique :

- Le lymphome hodgkinien, (maladie de Hodgkin).
- Le lymphome non hodgkinien (LNH).

### 7.2.1. Les lymphomes de Hodgkin

Le lymphome de Hodgkin, se caractérise par une prolifération incontrôlée de lymphocytes B anormaux, identifiables par des caractéristiques morphologiques spécifiques appelées « cellules de

---

Reed-Sternberg » (25).

Cette néoplasie, fréquente chez les jeunes adultes, se manifeste principalement par l'apparition d'adénopathies dans divers territoires, en particulier dans le médiastin, bien qu'elle puisse également affecter la rate, la moelle osseuse et d'autres organes. Il est important de noter que, comme tous les cancers, la maladie de Hodgkin n'est pas contagieuse (26).

### **7.2.2. Les lymphomes non Hodgkiniens (LNH)**

Le lymphome non hodgkinien est plus connu que le lymphome hodgkinien. Il présente une prévalence plus élevée chez les hommes que chez les femmes, avec une fréquence accrue entre 60 et 70 ans.

Les lymphomes non hodgkiniens se développent généralement dans les ganglions lymphatiques, mais ils peuvent également affecter n'importe quel organe du corps. Ils forment un groupe varié de proliférations malignes impliquant les cellules lymphoïdes B ou T, pouvant se manifester sous la forme de leucémies ou de tumeurs solides (24).

Les lymphomes hodgkiniens se caractérisent par une prolifération maligne ganglionnaire impliquant un type spécifique de cellule appelée cellule de Sternberg (27).

### **7.3. Les myélomes**

Le myélome multiple est cancer qui se forme dans la moelle osseuse, dérivant des plasmocytes, des cellules normalement présentes dans la moelle osseuse et responsables de la production d'anticorps pour la protection contre les infections. Dans cette maladie, les plasmocytes deviennent anormaux et connaissent une prolifération incontrôlée. Ils génèrent excessivement un type particulier d'anticorps appelé immunoglobuline monoclonale. Les plasmocytes anormaux envahissent alors la moelle osseuse, remplaçant les cellules saines et entraînant divers symptômes et complications associés au myélome multiple (19).

## **8. L'épidémiologie**

Une analyse méta-analytique a été effectuée sur toutes les enquêtes épidémiologiques nationales concernant les hémopathies malignes chez les personnes âgées, couvrant la période de 1992 à 2021. Les maladies étudiées comprenaient le Myélome multiple (MM), la Leucémie lymphoïde chronique (LLC), les Leucémies myéloïdes aiguës (LAM), les Syndromes myélodysplasiques (SMD), les Lymphomes, les syndromes myéloprolifératifs non LMC, les syndromes lymphoprolifératifs autres que la LLC et la maladie de Waldenström. L'âge au moment du diagnostic a été l'objet de l'évaluation.

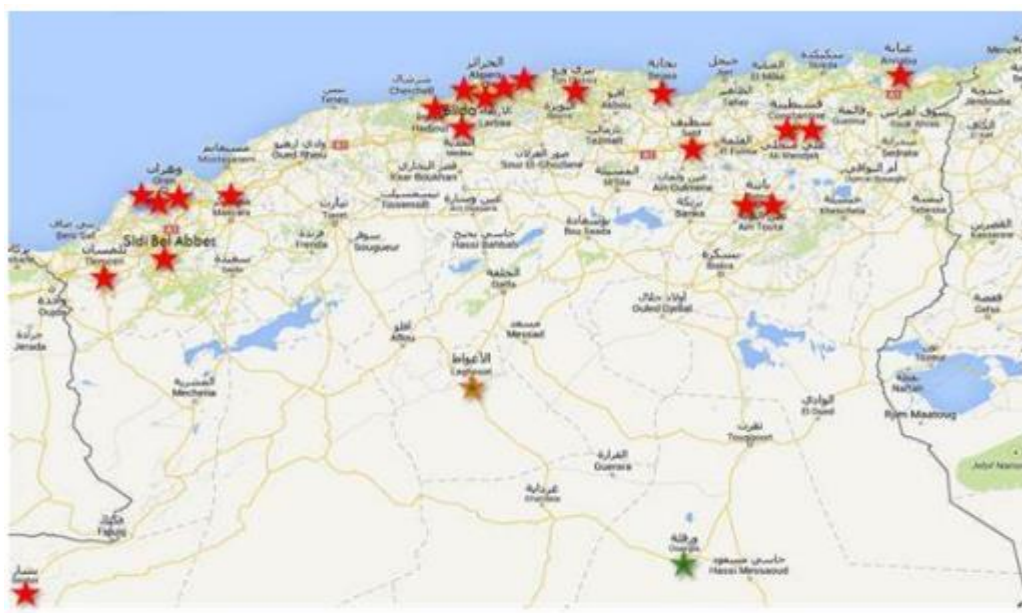
Au cours d'une période de 30 ans, 25.017 patients atteints de 22 types d'hémopathies malignes ont été recensés. Les résultats montrent une augmentation graduelle de l'âge au moment du diagnostic

pour plusieurs maladies : une augmentation de 10 ans pour les Leucémies myéloïdes aigües (LAM), un gain de 4 ans pour les Syndromes myélodysplasiques (SMD), une augmentation de 3 ans pour le Myélome multiple (MM), et un gain de 5 ans pour la Leucémie lymphoïde chronique (LLC) (28).

**Tableau 1.** Les enquêtes épidémiologiques en Algérie portant sur les hémopathies malignes des sujets âgés (1992-2021).

Période d'étude	Pathologie : HM	N patients
1992-2002	LNH GG	1723
2007-2012	LNH GG	2915
1994-2005	MM	1515
1995-2005	SMD	304
1995-2005	LAM	1877
1996-2005	TE	187
2002-2011	PV	484
2006-2010	LAM	1426
2006-2012	MM	1938
2007-2009	Sd LP hors LLC	168
2007-2011	LLC	1024
2009-2013	LNH extra GG	1057
2009-2013	WD	91
2009-2013	LLC	1210
2010-2013	Sd hors LLC	285
2010-2014	SMD	243
2011-2017	LAM	2358
2014-2016	MM	1010
2014-2019	SMD	670
2015-2019	SMP non LMC	1475
2016-2020	LLC	1473
2018-2021	LAM	1584
1992-2021	HM	20.017

HM= hémopathies malignes, LNHN= lymphome non Hodgkinien, GG= ganglionnaire, MM= myélome multiple, SMD=syndrome myélodysplasique, LAM= leucémie aigüe myéloïde, TE= thrombocytémie essentielle, PV= polyglobulie de Vaquez, Sd LP or LLC= syndrome lymphoprolifératif hors leucémie lymphoïde chronique, LLC= leucémie lymphoïde chronique, WD= maladie de Waldenström, LLC= leucémie lymphoïde chronique, SMP= syndrome myéloprolifératif, LMC= leucémie myéloïde chronique (29).



**Figure 4.** Répartition des structures hospitalières prenant en charge les hémopathies malignes en Algérie (30).

## 9. Les facteurs de risque

La plupart des leucémies n'ont pas de causes connues, mais on peut distinguer divers facteurs de risques pour expliquer leur apparition, ces facteurs se répartissent en des facteurs génétiques et non génétiques.

### 9.1. Les facteurs non génétiques

- **L'âge** : certaines leucémies sont plus fréquentes chez les enfants (leucémie aiguë lymphoblastique, par exemple), d'autres sont plus fréquentes chez les personnes âgées (leucémie aiguë myéloblastique ou leucémie myélomonocytaire chronique, par exemple).
- **Radiations** : l'exposition à de fortes doses de radiations ionisantes figure parmi les causes du cancer en général, (rayonnements ionisants : Les leucémies liées aux rayonnements ionisants sont également reconnues comme maladies professionnelles) (31).
- **Le benzène** présent dans le carburant sans plomb ou la fumée de cigarette ; l'exposition à toutes sortes de produits cancérigènes (pesticides, solvants, etc.) (32).

### 9.2. Les facteurs génétiques

#### a. Prédisposition familiale :

- Antécédents familiaux de leucémies, lymphomes ou autres cancers du sang peuvent augmenter le risque.
- Certains syndromes héréditaires sont associés à un risque accru, tels que :
  - La maladie (ou anémie) de Fanconi : C'est une maladie génétique qui touche les enfants. Elle se caractérise par un arrêt de fonctionnement progressif de la moelle osseuse qui se traduit par une anémie, un manque de plaquettes et de globules blancs. Elle accroît le risque de syndrome myélodysplasique (SMD), de leucémie aiguë myéloblastique (LAM), de cancer de la cavité buccale et de cancer de l'oropharynx.
  - Le syndrome de Bloom : C'est une maladie héréditaire autosomale récessive caractérisée par l'apparition de taches sur la peau à la lumière (télangiectasies), un faible poids à la naissance et des troubles du développement (33).

**b. Mutations génétiques spécifiques :**

- Des mutations dans des gènes tels que BCR-ABL1, JAK2, FLT3, TP53 et RUNX1 sont liées à certaines formes d'hémopathies malignes. Par exemple, la fusion des gènes BCR (Break Point Cluster Region) et ABL1 (Abelson), formant ainsi le gène de fusion BCR-ABL1 est caractéristique de la leucémie myéloïde chronique (34).

**c. Chromosomes anormaux :**

Des anomalies chromosomiques, telles que :

- La translocation t (9;22), également connue sous le nom de chromosome de Philadelphie, est une anomalie chromosomique qui joue un rôle clé dans la leucémie myéloïde chronique (LMC).
- La trisomie 21 (syndrome de Down ou trisomie 21), le risque de leucémie aiguë myéloblastique (LAM) est multiplié par 15 par rapport à la population générale.
- Le syndrome de Klinefelter : Il touche les garçons et se caractérise par l'existence d'un chromosome X supplémentaire soit une formule chromosomique XXY au lieu de XY.
- Le syndrome de Turner : Il touche les filles et se caractérise par un seul chromosome X (monosomie) au lieu de deux normalement.

**d. Facteurs épigénétiques :**

- Les modifications chimiques de l'ADN et des histones peuvent influencer l'expression des gènes impliqués dans ces cancers.

**e. Hématopoïèse clonale :**

Des mutations acquises dans les cellules souches hématopoïétiques entraînent une prolifération anormale et la transformation maligne (35).

## 10. Les symptômes

Chaque type de cancer du sang présente des symptômes différents.

### 10.1. Les symptômes de la Leucémie

La manifestation des symptômes de la leucémie dépend de son type, qu'elle soit aiguë ou chronique. Les symptômes de la leucémie aiguë ressemblent souvent à ceux de la grippe et peuvent survenir soudainement en quelques jours ou semaines. En revanche, la leucémie chronique peut ne présenter que peu de symptômes, voire aucun. Les symptômes, lorsqu'ils se manifestent, apparaissent généralement de manière progressive. De nombreuses personnes atteintes de leucémie chronique déclarent simplement ne pas se sentir bien. La maladie est souvent détectée lors d'un examen sanguin de routine.

Les symptômes apparaissent graduellement :

- **Anémie** : Une diminution du nombre de globules rouges dans le sang peut entraîner une pâleur, un essoufflement, de la fatigue et une accélération du rythme cardiaque.
- **Thrombopénie** : Lorsque le taux de plaquettes diminue, des saignements peuvent survenir, notamment au niveau des gencives ou du nez. Dans certains cas, ces saignements peuvent être plus graves s'ils se produisent au niveau du cerveau ou du système digestif. Les patients peuvent également présenter des hématomes (bleus) spontanés ou suite à de légers coups.
- **Leucopénie** : La réduction du nombre de globules blancs matures augmente le risque d'infections (36).

D'autres signes moins fréquents peuvent également se manifester :

- **Adénomégalie** : Cela se réfère à un volume anormal des ganglions lymphatiques. Si vous remarquez des ganglions enflés.
- **Leucémides** : Ce sont de petites lésions cutanées. Si vous observez de telles lésions, il est recommandé de consulter un médecin pour un examen approfondi.
- Perte de poids ou perte d'appétit.
- **Difficultés respiratoires, troubles de la vigilance, convulsions et troubles de la vision** : Ces symptômes peuvent être associés au syndrome de leucostase (37).
- **Fièvre, Frissons et Maux de tête** : Ces symptômes peuvent accompagner une hépatomégalie.
- **Faiblesse ou Fatigue Persistante** : Une sensation de faiblesse ou de fatigue prolongée peut être un signe d'anomalies hépatiques.
- **Infections Fréquentes** : Des infections récurrentes, telles que celles des poumons, des voies urinaires, des gencives, du contour de l'anus, de l'herpès ou des feux sauvages, peuvent être

liées à une hépatomégalie (un gonflement du foie ou de la rate).

- **Saignements et Ecchymoses** : Des saignements fréquents, tels que ceux du nez, des gencives ou des menstruations abondantes, ainsi que des ecchymoses spontanées, peuvent être associés à des problèmes hépatiques.
- **Pétéchies** : Ce sont de petits points rouges sur la peau (38).

## 10.2. Les symptômes des myélomes

Les symptômes initiaux du myélome multiple varient en fonction des individus et du stade de progression de la maladie.

Pour les patients qui présentent des symptômes, ceux-ci peuvent inclure des douleurs et des fractures osseuses. Un système, connu sous le nom de système CRAB, a été mis en place pour aider à identifier la présence d'un myélome multiple :

- C = calcium ;
  - R = reins ;
  - A = anémie ;
  - B = bones c'est-à-dire os.
- **Une hypercalcémie** : la destruction osseuse stimulée par les plasmocytes libère du calcium en excès, et génère des troubles intestinaux (nausées, vomissements, douleurs abdominales) ainsi que des arythmies cardiaques.
  - **Les infections** : sont principalement dues à un déficit de l'immunité humorale. Cette diminution est principalement causée par la sécrétion de certaines molécules par les cellules tumorales, comme MIP1- $\alpha$ . Le principal risque est la survenue d'infections répétées, principalement des infections bactériennes causées par des germes encapsulés, comme le pneumocoque, qui est responsable d'infections ORL et broncho-pulmonaires.
  - **Les complications neurologiques** : Les symptômes comprennent une douleur dorsale, une sensation de faiblesse, ou une paralysie des membres inférieurs (39).
  - **Une insuffisance rénale (myélome à chaîne légère)** : les excès de calcium et d'anticorps peuvent former un dépôt au niveau des reins, d'où une fatigue anormale, une perte de poids, des démangeaisons et nausées.
  - **Une anémie** : pâleur, vertiges, fatigue, dyspnée.
  - **Une fragilisation de l'os** : elle entraîne des douleurs, voire des fractures osseuses (40).

**10.3. Les symptômes des lymphomes**

Au stade initial, les lymphomes indolents, qui progressent lentement, ne provoquent généralement pas de symptômes.

Cependant, lorsque la malignité de cette maladie du sang devient plus avancée, ou en cas de lymphome agressif, les individus affectés peuvent commencer à remarquer des signes non spécifiques, tels que :

- Des épisodes de fièvre.
- Une fatigabilité accrue.
- Une perte d'appétit et de poids.
- Des symptômes en lien avec une chute du taux de globules rouges (anémie) et de globules blancs (risque d'infection, fièvre).
- Des difficultés respiratoires.

En plus des signes non spécifiques, les individus atteints de la maladie peuvent également présenter des symptômes plus spécifiques du lymphome. Par exemple, ils peuvent développer une adénopathie, qui se caractérise par une augmentation de la taille d'un ganglion. Ce ganglion reste mobile et indolore, et peut se situer au niveau du cou, de la clavicule, ou à tout autre endroit du corps (41).

**11. Physiopathologie moléculaire des hémopathies malignes****11.1. Physiopathologie des LAL**

Les lymphoblastes représentent des précurseurs anormaux de développement des cellules lymphoïdes, appartenant soit à la lignée B soit à la lignée T. L'émergence d'un clone malin résulte d'un dysfonctionnement dans le processus de différenciation des cellules progénitrices lymphoïdes, suivi d'une augmentation de leur capacité à survivre et à se multiplier de manière incontrôlée (42). Cette perturbation peut découler d'une expression inappropriée des gènes ou des altérations structurales de ceux-ci, causées par des mutations ponctuelles ou des anomalies chromosomiques (43).

**11.2. Physiopathologie des LAM**

La physiopathologie de la leucémie myéloïde aiguë (LAM) implique l'acquisition séquentielle de mutations génétiques qui confèrent au phénotype leucémique à une cellule souche hématopoïétique (CSH) normale ou à un progéniteur déjà engagé dans la différenciation. Ces

mutations, issues de divers événements chromosomiques ou mutationnels, ont été identifiées comme des cibles potentielles pour des thérapies ciblées.

La composition du clone leucémique est schématiquement organisée en trois compartiments distincts :

- Un compartiment minoritaire de cellules souches leucémiques principalement quiescentes mais capables d'auto renouvellement ou de prolifération/maturation.
- Un compartiment plus mature de progéniteurs leucémiques avec une capacité réduite d'auto renouvellement mais une forte prolifération et des propriétés clonogéniques.
- Un compartiment majoritaire de blastes leucémiques ayant une capacité de différenciation limitée, caractérisant la classification morphologique de la maladie (44).

### 11.3. Physiopathologie des LLC

La physiopathologie de la LLC reste encore inconnue, cependant, parmi les hémopathies lymphoïdes B, elle se distingue par trois caractéristiques principales.

- 1) **Un défaut d'apoptose** : la LLC n'est pas simplement une maladie de prolifération cellulaire, mais plutôt une dysrégulation de l'apoptose qui entraîne une accumulation de cellules.
- 2) **Une forte prévalence** : de phénomènes auto-immuns, principalement dirigés contre les cellules hématopoïétiques.
- 3) **Un déficit immunitaire sévère** : notamment une hypogammaglobulinémie qui s'aggrave au cours de l'évolution de la maladie (22).

### 11.4. Physiopathologie des LMC

La leucémie myéloïde chronique (LMC) se développe à partir d'une prolifération monoclonale initiée par une mutation survenant au niveau d'une cellule souche hématopoïétique pluripotente, c'est-à-dire une cellule encore peu différenciée. Cette mutation conduit à la formation du chromosome Philadelphie (Ph), qui devient un marqueur distinctif de la maladie. Il est important de noter que le chromosome Ph est présent dans toutes les cellules d'origine monocytaires, granuleuse, érythroblastique, mégacaryocytaire, ainsi que dans les lymphocytes (B, T, NK) (45).

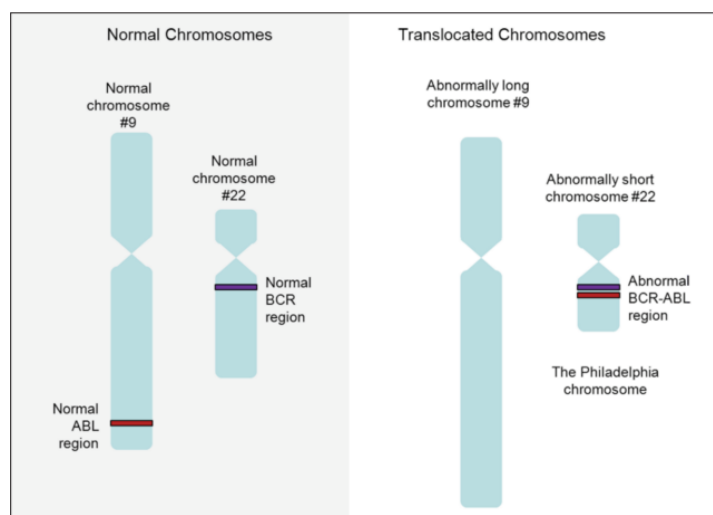
#### 11.4.1. Le chromosome Philadelphie

La translocation t(9;22) (q34;q11), également connue sous le nom de chromosome Philadelphie, est l'une des anomalies chromosomiques les plus reconnues dans le cancer. Ce phénomène se produit lorsque le matériel génétique du chromosome 9 en position q34 échange sa

place avec celui du chromosome 22 en position q11. Ce processus génère une fusion entre les gènes des deux chromosomes, créant ainsi un gène oncogène appelé BCR-ABL. Ce gène nouvellement formé contient les instructions nécessaires à la production d'une protéine anormale, responsable du développement de la leucémie. La particularité de cette protéine anormale est qu'elle est constamment active, contrairement aux protéines normales qui sont régulées et peuvent être désactivées au besoin.

Les points de cassure chromosomique sont spécifiques :

- Sur le chromosome 9, la cassure se produit en amont de l'exon 2 de l'oncogène d'Abelson (ABL1), situé en position 9q34. Ce gène tire son nom de son homologue viral, le gène Abelson (vABL), impliqué dans une forme de leucémie chez la souris.
- Sur le chromosome 22, la cassure survient au niveau du gène BCR (Break Cluster Region), situé sur le bras long du chromosome 22. Le gène BCR a été identifié en clonant la région connue sous le nom de Major-Break point Cluster Region (M-BCR), où la majorité des cassures chromosomiques se produisent (46).



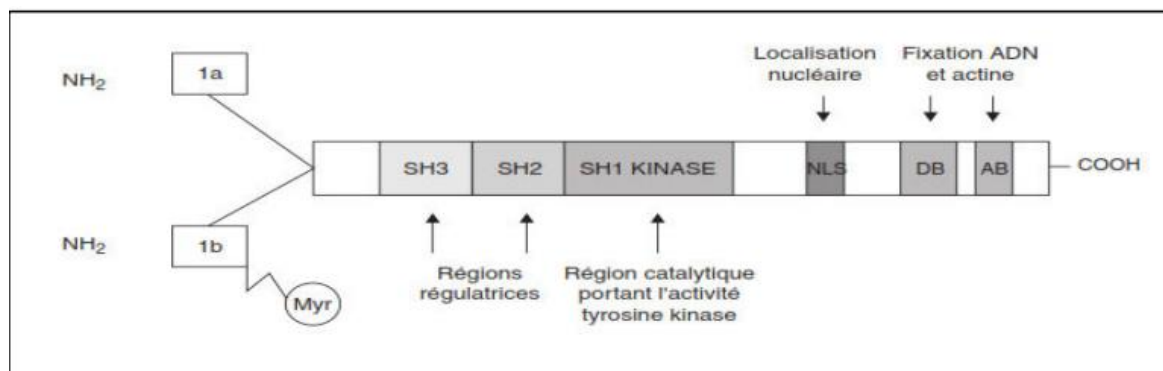
**Figure 5.** La translocation chromosomique t (9;22) (q34;q11) est responsable de la formation du chromosome Philadelphie (47).

#### 11.4.2. Gène ABL

Le gène ABL, situé sur le chromosome 9 en position 9q34, code pour une protéine appelée protéine ABL. Cette protéine est une tyrosine kinase de 145 kDa qui ne possède pas de fonction de récepteur. Il s'agit de l'homologue humain de l'oncogène v-abl du virus leucémogène murin Abelson.

La protéine contenant l'exon 1b subit une myristoylée, une modification qui consiste en l'ajout d'un groupement lipidique de type acide gras saturé à un résidu de glycine, ce qui entraîne sa localisation à la membrane plasmique (48).

En revanche, dans la forme majoritaire exon 1a, l'absence de ce résidu de glycine conduit à une localisation nucléaire prédominante. La structure de la protéine Abl est hautement conservée. Comme la majorité des protéines impliquées dans la transmission de signaux intracellulaires, la protéine Abl possède des domaines SH (Src homology) similaires à ceux de la protéine Src. Le domaine SH3 agit comme un régulateur négatif du domaine SH2, qui, à son tour, régule positivement le domaine SH1, responsable de l'activité tyrosine kinase de la protéine Abl. Dans la partie C-terminale de la protéine, on trouve une séquence de localisation nucléaire appelée NLS (Nuclear Localization Signal), ainsi que des domaines permettant la liaison aux filaments d'actine et à l'ADN (49).



**Figure 6.** Structure de gène ABL (46).

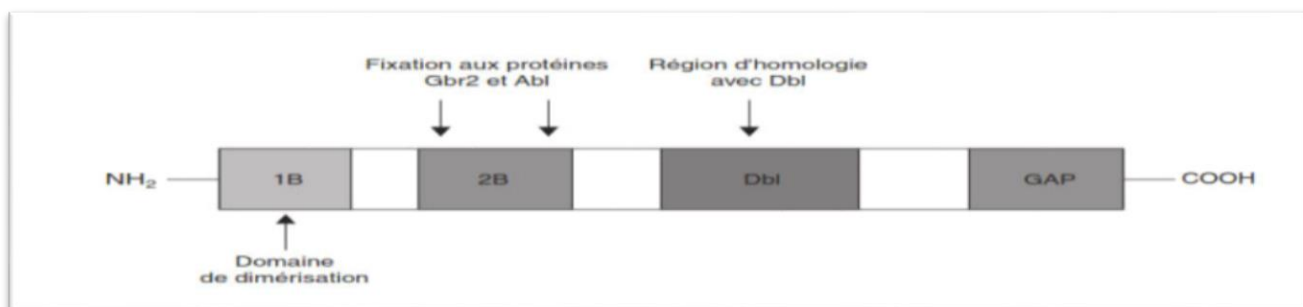
La protéine Abl présente une dualité structurale et fonctionnelle importante, grâce à ses domaines de régulation. Cette dualité lui permet de jouer des rôles distincts à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme de la cellule, et de transiter entre ces deux compartiments. Il est crucial de noter que la fonction de la protéine Abl dépend fortement de sa localisation cellulaire, soulignant ainsi son rôle multifonctionnel et régulé dans divers processus cellulaires.

Dans des conditions normales, la protéine Abl se trouve dans un état inactif en raison de son interaction avec un domaine de la protéine appelé "auto-inhibition kinase". Pour devenir actif, Abl doit être activé par l'intervention d'autres protéines, y compris d'autres kinases, qui interagissent avec Abl pour lever cette auto-inhibition. Ce processus modifie la conformation de la protéine Abl de manière à permettre à son substrat et à l'ATP d'accéder au site de phosphorylation, déclenchant ainsi son activité kinase (50).

### 11.4.3. Gène BCR

Le gène BCR, localisé sur le bras long du chromosome 22, a été identifié en clonant une région connue sous le nom de major-break point cluster region (M-BCR), où la plupart des cassures chromosomiques associées à la leucémie myéloïde chronique (LMC) se produisent. Ce gène s'étend sur 135 kb et comprend 23 exons. Il génère deux types d'ARN messagers, pesant respectivement 4,5 et 6,7 kb, qui codent pour une protéine de 160 kDa. Cette protéine est exprimée de manière ubiquitaire, c'est-à-dire qu'elle est présente dans de nombreux types de cellules.

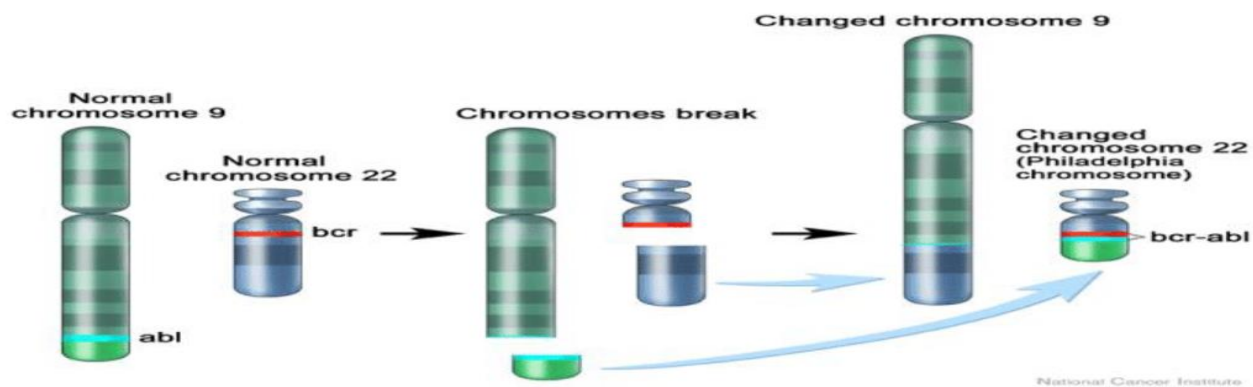
La protéine BCR se compose de plusieurs domaines fonctionnels. Dans sa partie N-terminale, le domaine 1B joue un rôle crucial en permettant la dimérisation de la protéine Bcr-Abl, ce qui entraîne l'activation de l'activité kinase. Le domaine 2B, quant à lui, contient deux sites de liaison aux domaines SH2 similaires à ceux présents dans la protéine Abl et la protéine Grb2. Au niveau de sa région centrale, la protéine Bcr présente un domaine homologue aux protéines Dbl, qui sont des facteurs d'échange guanosine triphosphate (GTP)/guanosine diphosphate (GDP). Cette région est importante pour les processus de régulation de la signalisation cellulaire. Enfin, la partie C-terminale de la protéine Bcr, qui a une fonction de GAP (GTPase-activating protein) pour les protéines G de type Rac, est absente dans la protéine de fusion Bcr-Abl (46).



**Figure 7.** Structure de gène BCR. (46)

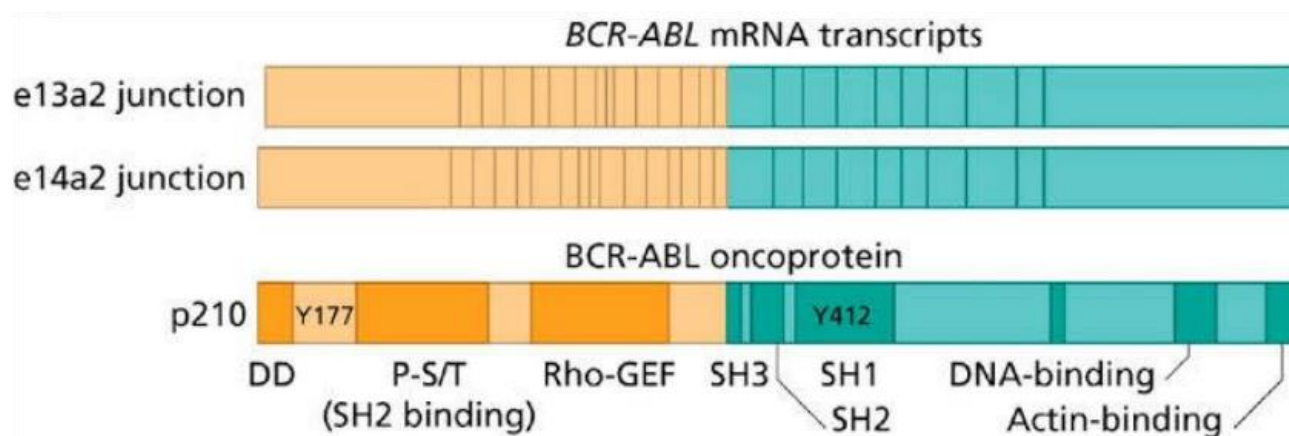
### 11.4.4. Le gène de fusion hybride BCR/ABL

Le gène BCR-ABL1 est formé par l'hybridation du segment 5' (N-terminal) du gène BCR avec le segment 3' (C-terminal) du gène ABL1. Cette fusion résulte de la translocation chromosomique t(9;22) (q34;q11) transpose un segment de l'oncogène ABL situé en position 9q34, à la place d'un segment du gène BCR situé en position 22q11, créant ainsi un gène hybride BCR-ABL (51).



**Figure 8 .** Gène hybride BCR-ABL (52).

La protéine de fusion BCR-ABL1, localisée dans le cytoplasme, possède une activité tyrosine kinase constamment active en raison de la dimérisation par le domaine 1B de BCR et la transphosphorylation. La perte de la région N-terminale, contenant la partie inhibitrice d'ABL1, conduit à une désactivation de la régulation négative, permettant une activation permanente de sa tyrosine kinase. Les cassures dans ABL1 se produisent généralement entre les exons 1a et 1b, tandis que dans BCR, elles peuvent varier, générant différents transcrits. La majorité des cas (95 %) présentent des cassures dans la région M-BCR, formant deux types d'ARNm BCR-ABL1, produisant la protéine p210 BCR-ABL1. Des cassures plus rares dans d'autres régions entraînent des protéines de fusion de poids moléculaire différent : p190 BCR-ABL1 (si la cassure se produit entre les exons 1 et 2 de BCR) et p230 BCR-ABL1 (si la cassure se situe entre les exons 19 et 20 dans la région  $\mu$ BCR). Dans des cas encore plus rares, la cassure dans ABL1 peut se produire dans l'intron 2, entraînant la formation des protéines de fusion e13a3 ou e14a3 (53).



**Figure 9.** Les gènes de fusion BCR-ABL et leurs protéines résultantes (51).

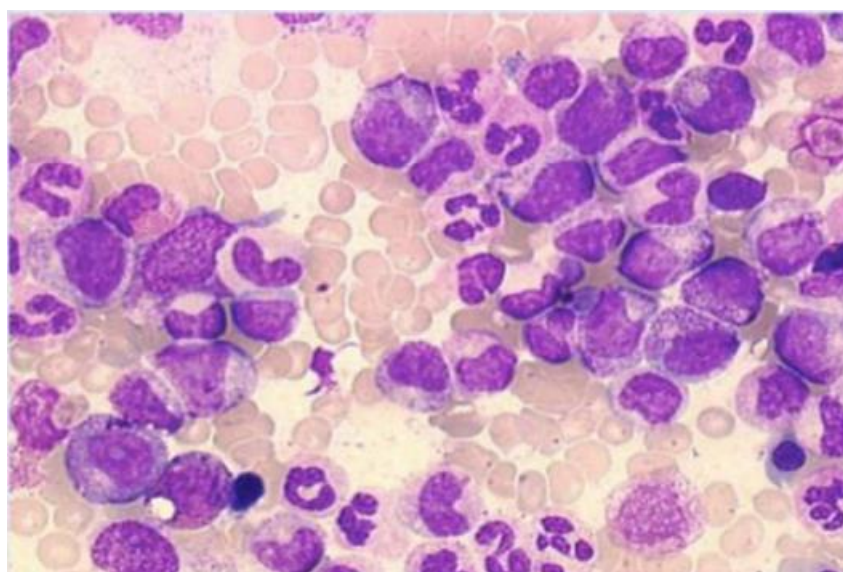
**CHAPITRE II :**  
**DIAGNOSTIC DES HEMOPATHIES**  
**MALIGNES**

## I. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

L'ensemble de ces examens permet de proposer au patient la stratégie thérapeutique la plus adaptée à son cas (54).

### 1. Le myélogramme

Les frottis médullaires révèlent une hyperplasie marquée des cellules granulaires à tous les stades de maturation, sans anomalies morphologiques des lignées granulaires et érythroblastiques. Le nombre de blastes aide à classifier la maladie. Les mégacaryocytes sont souvent augmentés en nombre avec une morphologie anormale, généralement de petite taille et à noyaux hypolobés. Le test cherche à détecter le chromosome Philadelphie Ph, présent chez 95% des patients, dans la moelle osseuse. Chez les 5% restants, le Ph pourrait être masqué par une translocation complexe ou d'autres anomalies.



**Figure 10.** Myélogramme montrant une hyperplasie granuleuse (55).

### 2. L'hémogramme

L'hémogramme est une analyse quantitative et qualitative des éléments figurés du sang, cruciale pour le diagnostic des leucémies. Une thrombopénie, souvent présente et parfois sévère avec des taux inférieurs à 10 G/l, ainsi qu'une leucocytose très variable, allant de la leucopénie (moins de 3 G/l) à une hyperleucocytose majeure (plus de 100 G/l), sont également observées. Une neutropénie est fréquente, avec des taux inférieurs à 1,5 G/l. Les blastes circulants peuvent constituer la majorité des leucocytes dans les formes hyperleucocytaires, mais peuvent être absents ou très rares dans les

formes leucopéniques. Leur morphologie varie d'une leucémie aiguë à l'autre, ce qui rend parfois leur identification difficile (56).

### **3. La cytochimie**

La cytochimie est une technique utilisée pour affiner la classification des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) ou myéloblastiques (LAM) lorsque l'analyse cytologique standard est insuffisante. La cytochimie implique la coloration de structures cellulaires spécifiques en fonction de leurs propriétés chimiques particulières.

L'utilisation de la cytochimie ultra structurale contribue à identifier une population blastique avec plus de précision (57).

### **4. L'immunophénotypage**

L'immunophénotypage des blastes par cytométrie de flux est une méthode utilisée pour détecter et quantifier l'expression des antigènes (Ig) à la surface et dans le cytoplasme des cellules hématopoïétiques, qu'elles soient normales ou pathologiques. Cette technique joue un rôle crucial dans le diagnostic et le suivi de la plupart des hémopathies malignes (58).

## **II. DIAGNOSTIC CYTOGENETIQUE**

### **1. Le caryotype**

Le caryotype, une technique classique de cytogénétique, s'est maintenant intégré dans les analyses essentielles au diagnostic des leucémies aiguës. Ces méthodes, qu'elles soient conventionnelles ou moléculaires, sont cruciales pour identifier les anomalies chromosomiques qui aident à caractériser le type spécifique de leucémie. De plus, ces anomalies chromosomiques servent souvent de facteurs pronostiques indépendants, ce qui est essentiel pour orienter les décisions thérapeutiques. Le caryotype demeure un outil fondamental parmi les techniques disponibles pour examiner le génome. Il offre une vue d'ensemble efficace et relativement simple de la structure chromosomique globale, contribuant ainsi au diagnostic des entités leucémiques les plus courantes (59).

Le caryotype médullaire conventionnel est systématiquement réalisé pour détecter la présence du chromosome Philadelphie, qui est présent dans environ 95 % des cas de leucémie myéloïde chronique (LMC), confirmant ainsi le diagnostic. Cette analyse permet également de repérer d'autres anomalies cytogénétiques éventuelles (ACA), parmi lesquelles les plus fréquentes sont la duplication

du chromosome Philadelphie, les trisomies 8 et 19, ainsi qu'un isochromosome (17q). Ces anomalies clonales supplémentaires observées dans les métaphases positives pour le chromosome Philadelphie (ACA/Ph1+) indiquent une progression clonale de la maladie. Elles sont considérées comme des signes d'échec thérapeutique et d'évolution de la pathologie (60).

Cependant, cette technique présente quelques inconvénients, notamment la nécessité souvent de prélever de la moelle osseuse, ainsi que sa durée. L'interprétation des résultats repose exclusivement sur la présence d'anomalies chromosomiques clonales, qui doivent être identiques dans plusieurs mitoses pour être validées.

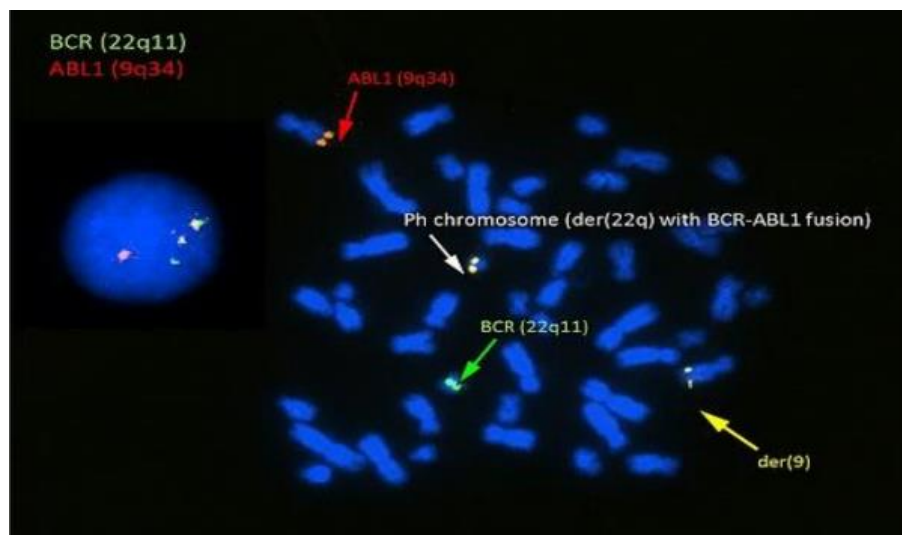


**Figure 11.** Présentation du chromosome Philadelphie sur le Caryotype à la phase chronique de la LMC (61).

## 2. Hybridation in situ en fluorescence (FISH)

Grâce à l'application de la FISH sur des métaphases et des noyaux, certaines de ces limites ont été franchies. (62) Dans le domaine de la cytogénétique moléculaire, l'utilisation de sondes permet de produire des fragments d'ADN de différentes tailles correspondant à différentes parties d'un chromosome. L'utilisation de sondes spécifiques de régions chromosomiques ou de sondes capables de s'hybrider sur les bras d'une paire chromosomique donnée est utilisée pour la FISH. La marque de ces sondes est une molécule fluorescente qui peut être détectée à l'aide d'un microscope à fluorescence. Des préparations de chromosomes (cellules en métaphase) ou de noyaux en interphase sont mises en contact avec ces sondes (63).

Elle permet de visualiser directement le gène de fusion BCR-ABL1 dans le noyau (FISH interphasique) ou sur la mitose (FISH métaphasique) par un mélange des signaux rouges et verts.



**Figure 12.** Le résultat FISH de la translocation t(9;22) (64)

### 2.1. La FISH sur métaphase : un complément du caryotype

Le diagnostic d'anomalies chromosomiques récurrentes dans les hémopathies malignes, La plupart des altérations de structure chromosomique impliquées dans la pathogénèse des leucémies et des lymphomes sont clonales, récurrentes, non aléatoires et souvent propres à un type d'hémopathie maligne. Les translocations équilibrées sont fréquemment observées, ce qui entraîne une recombinaison de deux gènes au point de cassure. Ainsi, un « gène de fusion » est créé qui contient une protéine chimérique qui est responsable de la prolifération maligne. Ces remaniements géniques sont diagnostiqués par FISH en utilisant des sondes spécifiques du locus ou des gènes concernés. Par exemple, les mutations du gène MLL, qui comporte plus de 70 partenaires et se trouve en 11q23, sont facilement repérées grâce à l'utilisation d'une sonde.

### 2.2. La FISH interphasique

La détection des anomalies chromosomiques récurrentes dans hémopathies malignes, L'étude des chromosomes dans les hémopathies malignes présente des défis, notamment la présence de mosaïcismes et de chromosomes fortement modifiés qui sont difficiles à identifier. De plus, dans certains types de cancers, obtenir un nombre suffisant de mitoses provenant de cellules cancéreuses pour établir un diagnostic sûr peut être ardu. Dans ces situations, l'utilisation de la technique FISH en interphase est la méthode la plus simple pour détecter les anomalies chromosomiques spécifiques qui influencent le diagnostic et le pronostic de l'hémopathie en question. Par exemple, les modifications du gène MLL dans les leucémies aiguës peuvent être facilement recherchées sur les noyaux en interphase. Il y a des maladies pour lesquelles certaines équipes n'utilisent que la FISH interphasique

comme examen des chromosomes. C'est le cas des leucémies lymphoïdes chroniques, où elles recherchent uniquement par FISH interphasique les délétions des gènes P53 et ATM et du locus 13q14, ainsi que la trisomie 12, anomalies qui influencent le pronostic.

En somme, la FISH sur métaphase est devenue un complément indispensable du caryotype. Sur le noyau en interphase, elle permet de se passer de la culture cellulaire. Cependant, elle reste un examen ciblé du génome qui nécessite de connaître l'anomalie à rechercher (65).

### **3. LA CGH ARRAY**

La CGH, ou hybridation génomique comparative, est une technique qui permet d'examiner l'ensemble du génome pour détecter les déséquilibres chromosomiques (gains ou pertes) entre l'ADN d'une référence et celui d'un patient (66).

La CGH array permet non seulement de détecter les anomalies chromosomiques déséquilibrées détectées par le caryotype (taille supérieure à 5 et 10 Mb) mais aussi celles qui sont cryptiques. Aujourd'hui, c'est une technique fiable, reproductible et qui peut être automatisée (67).

## **III. DIAGNOSTIC MOLECULAIRE**

Cette approche permet de rechercher des altérations génétiques spécifiques, qui peuvent être associées aux hémopathies malignes.

### **1. Séquençage à haut débit (NGS) :**

Le séquençage à haut débit, également connu sous le nom de séquençage de nouvelle génération (NGS), Le séquençage de nouvelle génération (NGS) est une technologie permettant de déterminer et d'identifier la séquence d'ADN ou d'ARN afin d'étudier la variation génétique associée à des maladies ou à d'autres phénomènes biologiques (68).

Les cancers hématologiques sont basés sur des anomalies génétiques, notamment sur de grandes mutations qui sont à l'origine des diverses formes de cancers hématologiques. Les troubles hématologiques ont utilisé les technologies NGS dans différents domaines : diagnostic d'orientation (réarrangement du gène TCR pour déterminer la clonalité des lymphocytes T), sous-classification (translocations cytogénétiques récurrentes dans la leucémie myéloïde aiguë), pronostic (chromosome de Philadelphie positif dans la leucémie lymphoblastique aiguë) et tests de maladie résiduelle minimale (MRD) (transcriptions BCR-ABL dans la leucémie myéloïde chronique), ce qui permet souvent d'identifier de nouvelles mutations.

L'étude des leucémies, des lymphomes et des myélomes est en constante évolution et implique l'identification précise de mutations courantes supplémentaires qui peuvent avoir un impact pronostique significatif et important (69).

## **2. RT-PCR en temps réel ou quantitative**

La PCR, également connue sous le nom de réaction en chaîne par polymérase, est une méthode *in vitro* efficace et rapide pour l'amplification enzymatique de séquences d'ADN ou d'ARN spécifiques provenant de différentes sources (70).

La RT-PCR (réaction de transcription inverse-polymérase en chaîne) est utilisée dans le domaine du diagnostic clinique pour étudier la charge virale des virus ARN et analyser le produit de l'expression des gènes. La RT-PCR est également utile lorsque de gros gènes doivent être séquencés. Le développement d'approches quantitatives utilisant la PCR en temps réel a récemment conduit à un élargissement majeur des applications de la RT-PCR dans le diagnostic clinique. Cependant, la réaction RT est complexe en raison de son manque de reproductibilité, de la labilité de l'ARN et de sa fréquente contamination par l'ADN (71).

Au diagnostic, il est essentiel de chercher le transcrite de fusion BCR-ABL1 dans le sang afin de déterminer le type de transcrite. Le nombre de cellules leucémiques dans l'organisme est indirectement représenté par elle. Il est nécessaire de procéder à une extraction préalable des ARN à partir des globules blancs totaux et à une rétrotranscription de l'ARN en ADNc. Ensuite, on effectue une recherche du transcrite en utilisant la PCR multiplex (avec plusieurs couples d'amorces) au point final, ce qui permet d'amplifier tous les types de transcrits BCR-ABL1, peu importe leur point de cassure.

En visualisant la taille du transcrite amplifié sur gel d'agarose, il est possible de déterminer les points de cassure. Le type supposé de transcrite sera confirmé par PCR simplex en utilisant le couple d'amorce approprié. Il est essentiel de procéder au typage du transcrite au diagnostic pour sélectionner le couple d'amorces approprié pour quantifier le transcrite BCR-ABL1. Cette vérification se fait par PCR en temps réel sur l'ADNc obtenu après les étapes d'extraction et de rétrotranscription (RT-QPCR) (rétrotranscription quantitative real time polymerase chain reaction) (72).

La RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) permet de détecter le transcrite BCR-ABL à partir de cellules médullaires ou plus facilement, à partir d'un prélèvement sanguin (73).

L'amplification directe de la LMC est impossible en raison de la grande variabilité des seuils d'ADN. Ainsi, des enzymes doivent être utilisées. Le contraire est exact. Transcriptase qui transforme

l'ARNm en ADNc (ADN complémentaire, ARNm). Par la suite, la sonde peut servir à réaliser une réaction d'amplification supplémentaire à l'une des séquences BCR et ABL (74).

### **2.1. L'intérêt de RT-PCR en temps réel ou quantitative**

L'importance de la RT-PCR dans la LMC réside dans sa capacité à quantifier de manière précise les niveaux de transcrits BCR-ABL, permettant ainsi de surveiller le taux résiduel de la maladie chez les patients sous traitement. Le système de détection des molécules amplifiées repose sur deux techniques : l'utilisation d'agents intercalants se liant directement à l'ADN double brin ou l'emploi d'une sonde fluorogénique spécifiquement hybridée au fragment amplifié. En raison de la difficulté à obtenir des résultats fiables et reproductibles, il existe de nombreuses stratégies de quantification. La PCR en temps réel offre l'avantage d'une détection "en tube fermé" des produits de PCR formés après chaque cycle d'amplification, ce qui la rend plus précise car elle permet un plus grand nombre de mesures. Cette technique utilise une molécule reporter fluorescente dont l'intensité de fluorescence augmente à chaque cycle de PCR, permettant ainsi de tracer une courbe et d'identifier les différentes phases de la cinétique de la PCR. Une relation claire a été établie entre le niveau de réponse au traitement, le nombre de cellules leucémiques et la valeur du ratio BCR-ABL/ABL. La quantification des ARNm est réalisée en présence d'une gamme de standards (plasmides BCR-ABL et ABL), et afin de standardiser les résultats, des conditions opératoires ont été définies au niveau européen, avec des facteurs de conversion propres à chaque laboratoire (75)

# **MATERIEL ET METHODE**

## **I. MATERIEL ET METHODE**

Nous avons réalisé une revue bibliographique exhaustive sur les hémopathies malignes, en mettant particulièrement l'accent sur le diagnostic moléculaire de la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC). Dans cette partie, nous examinerons comment la biologie moléculaire contribue au diagnostic de la LMC en détectant le transcrite BCR-ABL. En général, le diagnostic de la LMC repose sur la détection du chromosome Philadelphie par la technique de RT-QPCR.

### **1. La RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) :**

Actuellement, la méthode de choix pour mesurer et quantifier les transcrits BCR-ABL à partir d'échantillons de moelle osseuse ou de sang périphérique demeure la RT-PCR en raison de sa grande sensibilité. Elle permet de détecter des quantités minuscules du gène BCR-ABL, même lorsque le chromosome Ph n'est pas détectable par les tests cytogénétiques standard ou même le FISH, avec un ratio d'une cellule leucémique pour 10<sup>5</sup> à 10<sup>6</sup> cellules normales. Cette technique repose sur l'amplification par PCR de l'ADN complémentaire (ADNc) obtenu à partir de l'ARN de la séquence d'ADN cible, à l'aide d'enzymes d'origine rétrovirale, telles que la transcriptase inverse. Cependant, l'extraction de l'ARN pour cette réaction est délicate, car ces molécules sont extrêmement sensibles à la dégradation par les ribonucléases (RNases).

Pour obtenir de l'ARN pur, trois étapes sont nécessaires. Tout d'abord, la lyse cellulaire libère l'ARN, suivie de la déprotéinisation du lysat à l'aide de la technique phénolchloroforme. Cette méthode, bien qu'efficace, est chronophage et est souvent remplacée par des kits d'extraction rapides. Ensuite, il est recommandé d'inhiber la réaction de transcription inverse, de détruire ou de dénaturer l'hybride ARN/ADNc, et d'amplifier l'ADNc par réaction enzymatique catalysée par la Taq polymérase en utilisant deux amorces : l'une dédiée à la séquence BCR et l'autre complémentaire à la séquence ABL. Un deuxième cycle d'amplification de l'amplicon, en utilisant une paire d'amorces situées à l'intérieur de la séquence précédemment amplifiée, peut accroître à la fois la sensibilité et la spécificité de la méthode. Enfin, l'analyse des produits de PCR peut être réalisée directement sur un gel d'agarose après coloration au bromure d'éthidium ou après transcription Southern et hybridation avec des oligonucléotides spécifiques des jonctions BCR et ABL, respectivement. Le marquage de ces sondes oligonucléotidiques peut être isotopique ou non-isotopique.

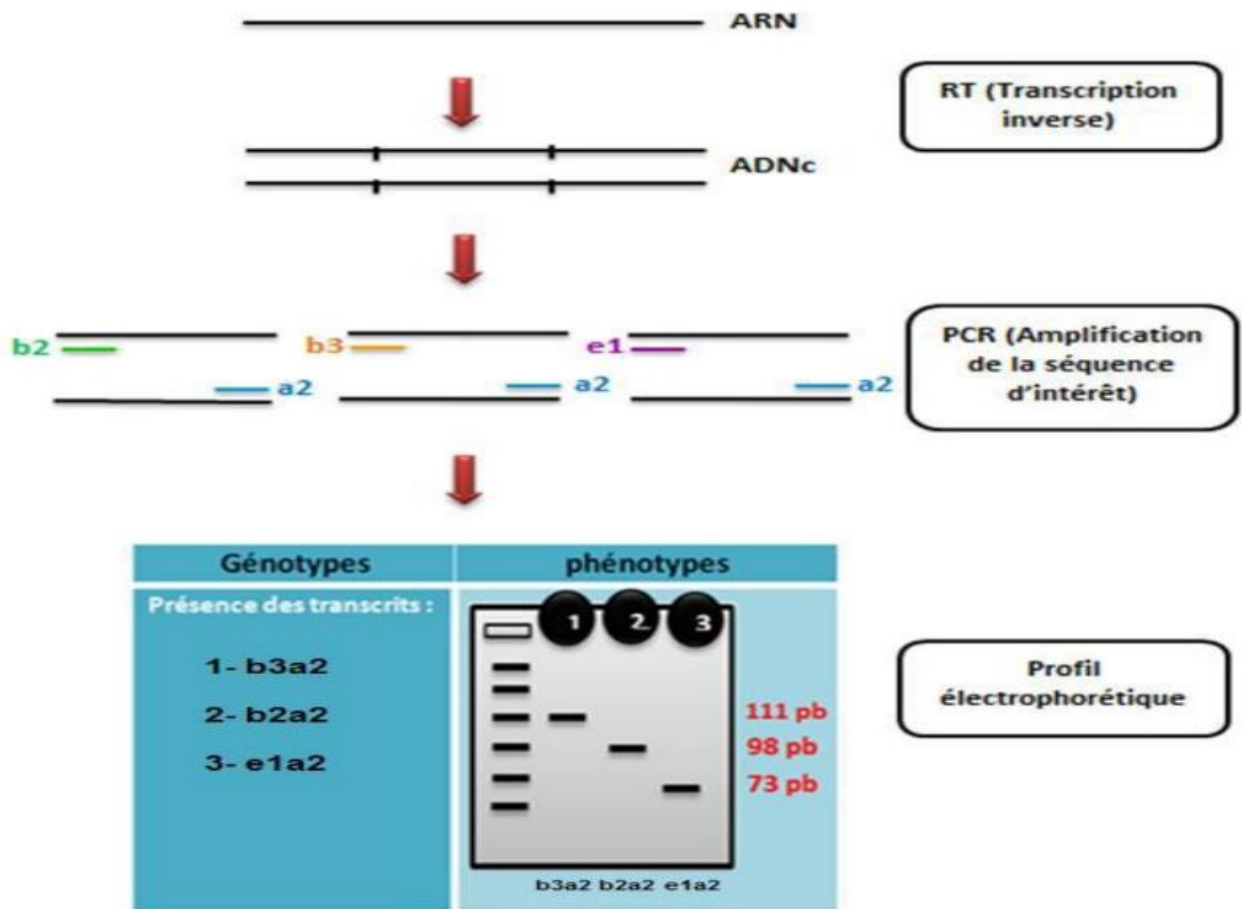


Figure 13. Illustration schématique des étapes de la RT-PCR. (76)

## 2. Le principe de la PCR quantitative dans le cas du diagnostic BCR-ABL

Le diagnostic est habituellement présenté sous forme d'un rapport entre le niveau de transcrit BCR-ABL et le niveau de transcription du gène contrôle de référence. La normalisation à un gène de référence compense les variations d'efficacité de réaction et de qualité de l'ARN entre les échantillons.

Le gène de contrôle de référence le plus largement utilisé dans la surveillance du BCR-ABL est le gène ABL de type sauvage. Les amorces PCR utilisées pour le BCR-ABL facilitent l'amplification des transcrits b2a2 et b3a2, qui comprennent les exons b2/b3 du BCR et l'exon 2 de l'ABL. Une sonde d'hydrolyse à double marquage (5' 6-FAM et 3' TAMRA comme extincteur) a été utilisée pour la détection en temps réel de l'accumulation de produit à chaque cycle. Les séquences d'amorces et de sondes sont illustrées à la figure 18. Nous avons utilisé le gène ABL de type sauvage

comme gène de référence. Les amorces largement utilisées pour la quantification de l'ABL amplifient également le transcrite de fusion BCR-ABL.

Il a été rapporté, et nous l'avons également observé, que cela peut entraîner un biais dans les résultats, en particulier lorsqu'une grande quantité de BCR-ABL est présente dans l'échantillon. Les séquences d'amorces et de sondes d'hydrolyse que nous avons utilisées pour l'ABL ont été déterminées pour s'hybrider uniquement avec l'ABL de type sauvage et non avec le BCR-ABL (77).

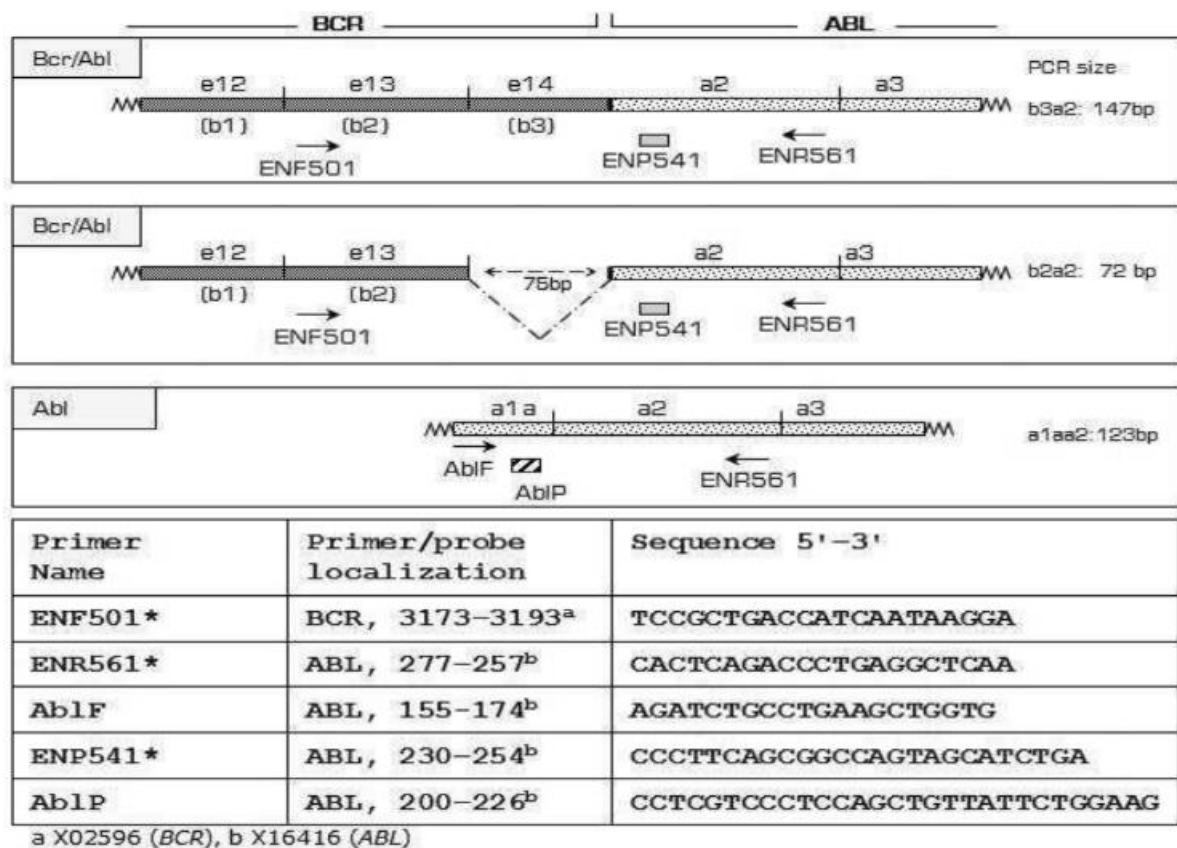


Figure 14. Séquences amorce/sonde du gène de fusion BCR-ABL.

### 3. Protocole de la QR-PCR

Nous utilisons un kit standardisé, le kit ipsogen BCR-ABL1 MbcR IS-MMR, pour quantifier les transcrits BCR-ABL1 p210 b2a2 ou b3a2. Ces kits sont des outils de diagnostic in vitro conçus pour être utilisés sur des instruments tels que le Rotor-Gene Q et d'autres instruments de PCR en temps réel. Ils contiennent des réactifs optimisés pour détecter et quantifier de manière fiable et sensible les transcrits BCR-ABL p210 b2a2 ou b3a2 dans les échantillons de moelle osseuse ou de sang périphérique de patients atteints de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) ou de leucémie

myéloïde chronique (LMC) ayant déjà reçu un diagnostic lié à l'expression du gène de fusion BCR-ABL Mbc. Ce test permet d'évaluer le niveau de réponse moléculaire, offrant ainsi des informations précieuses pour le suivi de la maladie résiduelle imperceptible (MRI) (78).

Ce test exploite le principe de la qPCR par hydrolyse des sondes TaqMan (figure 2). Il utilise un étalon IS-MMR (calibrateur) standardisé selon l'échelle internationale, permettant de convertir les résultats en nombre de copies normalisé (NCN) sur cette échelle. Des standards avec un nombre connu de molécules sont également employés pour réaliser une courbe d'étalonnage. 4 dilutions standards sont utilisées pour le gène ABL1 (SP3, SP4, SP5 et SP6) et 5 pour le gène de fusion MBCR-ABL1 (SP1, SP2, SP3, SP5 et SP6) (79).

#### **4. Principe du kit :**

Le kit BCR-ABL P210 (Mbc) One-Step Detection « ENTROGEN » est prévu pour la détection quantitative des transcrits de fusion BCR-ABL p210 (b2a2 et b3a2) dans des échantillons de sang périphérique de patients pour lesquels un diagnostic de leucémie Myéloïde Chronique (LMC) a été établi. Ce kit utilise un jeu d'amorces et des sondes d'hydrolyses marquées, une sonde marquée FAM pour détecter et quantifier la présence du transcrite de fusion BCRABL et une sonde marquée VIC pour détecter et quantifier l'amplification d'ABL comme contrôle interne. Cela permet au kit d'utiliser la quantification comparative (méthode Pfaffl) pour déterminer les ratios gène cible /gène de référence, sans recourir à la réalisation d'une gamme de standards avec un nombre de copies connu.

Ce kit a été formulé pour réaliser avec une haute reproductibilité, la synthèse d'ADNc premier brin suivie d'une PCR en temps réel, dans un seul tube (80).

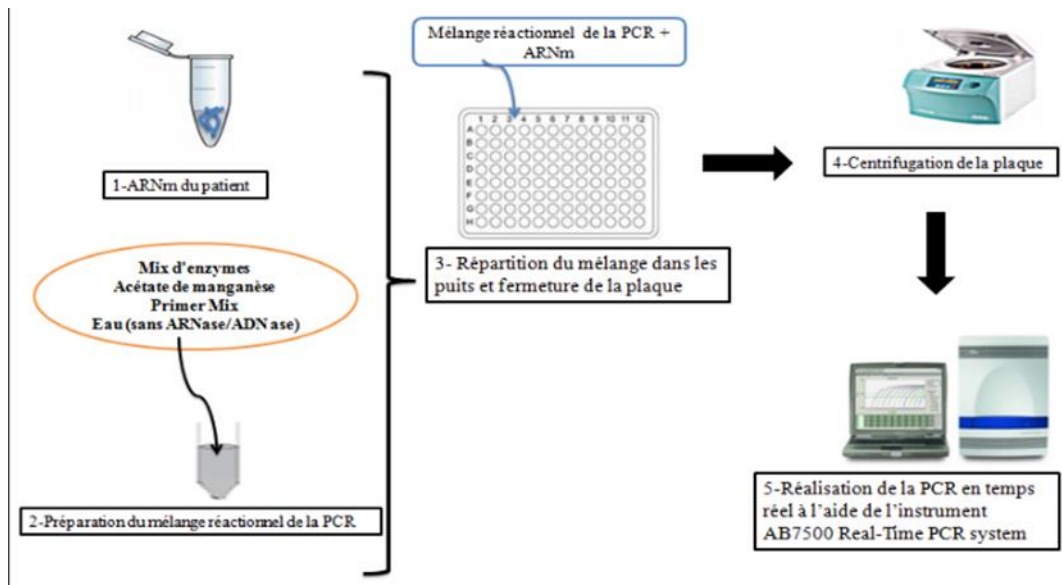


Figure 15. Schéma résumé de la PCR en temps réel quantitative.

## Matériels :

### ➤ Échantillon

- Prélèvements de sang périphérique ou de moelle osseuse pour l'analyse p210 BCR-ABL.
- Lignée cellulaire K562 de LMC.
- Lignée cellulaire SU-DHL-16 de lymphome non hodgkinien.

### ➤ Préparation de l'échantillon

- Solution de lyse des GR (Qiagen).
- Réactif Trizol (Invitrogen), conserver à 4°C.
- Chloroforme.
- Isopropanol.
- Éthanol à 75 %.
- H<sub>2</sub>O.
- Matériel de laboratoire général, y compris mélangeur vortex, centrifugeuse de bureau, microcentrifugeuse et spectrophotomètre.
- Thermocycleur PCR.
- Pour la transcription inverse, nous utilisons le kit Gene Amp RNA PCR Kit, qui comprend :
  - Gene Amp 25 mM MgCl<sub>2</sub>.
  - Gene Amp 10× PCR Buffer II (500 mM KCl ; 100 mM Tris-HCl, pH 8,3).
  - Gene Amp 10 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP.
  - Inhibiteur de RNase ABI.
  - Hexamères aléatoires ABI.
  - Transcriptase inverse ABI MuLV.

### ➤ RT-PCR quantitative ou RT-PCR en temps réel

- Système ABI 7900HT Fast Real-Time PCR avec module standard de 96 puits 96 puits standard.
- Plaque de réaction MicroAmp™ Optical à 96.

- Film adhésif optique.
- Mélange maître PCR universel TaqMan.
- H<sub>2</sub>O.
- Amorces avant et arrière spécifiques des transcrits du gène cible.
- Sonde TaqMan spécifique des transcrits du gène cible.
- Amorces avant et arrière spécifiques des transcrits du gène de contrôle.
- Sonde TaqMan spécifique des transcrits du gène de contrôle.

### **Méthodes :**

Des précautions particulières doivent être prises lors de la manipulation des échantillons d'ARN afin d'éviter la dégradation de l'ARN, par exemple en portant des gants en permanence et en l'utilisation de réactifs et d'ustensiles en plastique exempts de nucléase.

#### **➤ Préparation de l'échantillon**

- Prélever du sang périphérique (3-5 ml) et/ou de la moelle osseuse (1-3 ml) dans des tubes EDTA (purple top) et les traiter ces échantillons dans les 8 heures suivant le prélèvement.
- Lyse des globules rouges (GR) dans les échantillons de sang périphérique et d'aspiration de la moelle osseuse avant de procéder à l'analyse de l'ADN et à l'isolement de l'ARN. Cette opération s'effectue à l'aide de la solution de lyse des globules rouges de Qiagen, conformément aux instructions du fabricant. Extraire l'ARN total des échantillons de sang ou de moelle osseuse à l'aide du réactif TRIzol, conformément aux recommandations du fabricant. Après l'extraction, les échantillons d'ARN peuvent être conservés temporairement à -20°C ou peuvent être stockés à plus long terme à -80°C jusqu'à ce qu'ils soient prêts à être utilisés. Un traitement ultérieur à la DNase de l'ARN pour éliminer une éventuelle contamination de l'échantillon par l'ADN est facultatif.
- Mesurer la concentration d'ARN à l'aide d'un spectrophotomètre (voir note 10) et ajuster la concentration d'ARN dans du H<sub>2</sub>O exempt de nucléase à une concentration de 0,2 mg/ml en vue de la synthèse ultérieure de l'ADNc.

➤ **Standards**

- Préparer les standards d'ARN pour la construction de la courbe standard. Nous utilisons la lignée cellulaire K562 CML pour préparer l'ARN pour les étalons BCR-ABL et ABLp210. L'ARN doit être isolé à partir des cellules K562 en utilisant le réactif TRIzol et le même protocole que pour les échantillons de patients, puis conservé dans du H<sub>2</sub>O exempt de nucléase. Pour des raisons de commodité, l'ARNm de la lignée cellulaire K562 peut être obtenu directement à partir de ressources commerciales si des installations de culture cellulaire ne sont pas disponibles. Ces ressources peuvent également être utilisées pour préparer les courbes standard.
- Déterminer la quantité d'ARN de la lignée cellulaire K562 à l'aide d'un spectrophotomètre et aliquoter la solution mère d'ARN de la lignée cellulaire K562 à haute concentration (>1 mg/ml) pour la conserver à -80°C). Une fois les aliquotes d'ARN réalisées, il convient d'éviter les cycles répétés de congélation-décongélation. Pour la préparation des courbes standard, une aliquote de la solution mère d'ARN K562 doit être ajustée à une concentration de 0,2 mg/ml dans de l'eau exempte de nucléase. Les aliquotes de la solution de travail d'ARN K562 doivent être conservées à -80°C.
- Diluer en série 5 ml de la solution de travail d'ARN de la lignée cellulaire K562 (0,2 mg/ml) au décuple pour la détermination de la courbe standard. Diluer l'ARN K562 dans de l'eau exempte de nucléase contenant 20 ng/ml d'ARN de levure et préparer sept étalons contenant de  $1 \times 10^{-6}$  mg à 1 mg d'ARN K562 afin de produire des courbes étalons pour la quantification des gènes BCR-ABL p210 et ABL. Cinq microlitres de chacune de ces dilutions d'ARN doivent ensuite être utilisés dans une réaction de transcription inverse. Les dilutions standard dérivées de l'ARN K562 doivent être analysées dans chaque plaque si la méthode de quantification par courbe standard est utilisée.

➤ **Contrôle**

- Utiliser un gène de contrôle endogène (ABL) pour normaliser la quantité d'ARN de l'échantillon ajoutée à la réaction PCR. Le gène de contrôle endogène doit être amplifié en même temps que le gène cible BCR-ABL p210.
- Des contrôles à blanc ou sans matrice d'ARN, constitués de H<sub>2</sub>O exempt de nucléase, doivent également être inclus dans la réaction de transcription inverse et dans la RQ-PCR afin de contrôler la contamination. Deux contrôles sans matrice sont recommandés pour la RQ-PCR dans chaque plaque de réaction.

- Un contrôle négatif ne contenant pas l'ARN du gène cible d'intérêt (par exemple, l'ARN de la lignée cellulaire BCR-ABL négative) doit également être inclus dans chaque RQ-PCR.
- Un contrôle de sensibilité positif, consistant en une dilution de  $10^{-4}$  (cette dilution peut varier en fonction des exigences de sensibilité de l'essai individuel) de l'ARN de la lignée cellulaire K562 dans un fond d'ARN de la lignée cellulaire BCR-ABL négatif, doit également être inclus dans la RQ-PCR. L'ARN de la lignée cellulaire BCR-ABL négative peut être préparé à partir de n'importe quelle lignée cellulaire ne contenant pas le gène de fusion BCR-ABL (nous utilisons l'ARN isolé de la lignée cellulaire de lymphome non hodgkinien SU-DHL-16). Les échantillons d'ARN de la lignée cellulaire K562 et de la lignée cellulaire SU-DHL-16 doivent être ajustés à une concentration de  $0,2 \text{ mg}/\mu\text{l}$  à l'aide de  $\text{H}_2\text{O}$  sans nucléase. Ensuite, la dilution  $10^{-4}$  est obtenue par une série de dilutions sérielles décuplées d'un volume de solution d'ARN K562 à neuf volumes de la solution d'ARN SU-DHL-16 à  $0,2 \text{ mg}/\mu\text{l}$ . Le contrôle de sensibilité est utilisé pour surveiller la sensibilité de l'essai et reproduit un échantillon clinique dans lequel des cellules tumorales p210 BCR-ABL positives sont présentes dans un fond de cellules normales.
- Si la RQ-PCR est utilisée pour la surveillance de la maladie résiduelle minimale, les contrôles positifs haut et bas doivent également être inclus dans l'essai. Dans cet exemple, les échantillons positifs pour p210 BCR-ABL qui contiennent des niveaux élevés et faibles de transcrits BCR-ABL p210 sont inclus dans chaque RQ-PCR afin de contrôler les performances de l'essai des paramètres tels que le maintien de la linéarité, la stabilité des étalons et la réussite de chacune des étapes de la RT et de la RQ-PCR.

➤ **RT-PCR RT-PCR quantitative en temps réel**

- **Transcription Inverse**

- Transcrire les échantillons d'ARN en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide du kit PCR GeneAmp® RNA complémentaire (ADNc) PCR, conformément aux instructions du fabricant.
- Pour la réaction de transcription inverse (RT), ajouter 1 mg d'ARN au volume total de 20 ml d'ARN dans le tube de réaction RT de 20 ml de volume total. Après la réaction de RT, utiliser 5 ml d'ADNc (équivalent à environ  $0,25 \text{ mg}$  d'ARN) pour la réaction de RT.  $0,25 \text{ mg}$  d'ARN pour l'analyse ultérieure par RQ-PCR. Si les échantillons sont analysés en double ou en triple, il est recommandé d'obtenir des échantillons répétés soient obtenus à partir de différents tubes de réaction RT afin de contrôler la reproductibilité du test.

**- Mise en place de la RT-PCR quantitative en temps réel**

- Conserver tous les réactifs décongelés et les échantillons de patients au frais sur de la glace humide avant utilisation. Les aliquotes de la sonde TaqMan doivent également être protégées de la lumière et ne doivent pas être décongelées jusqu'à ce qu'elles soient immédiatement utilisées.
  - Préparer deux tubes de mélange maître PCR - un pour p210 BCR-ABL RQ-PCR et un pour ABL RQ-PCR. Le volume final de chaque tube de mélange maître est basé sur le nombre total de réactions nécessaires pour chaque RQ-PCR. Chaque réaction doit contenir 6,2 ml de H<sub>2</sub>O sans nucléase, 12,5 ml de 2× Taqman Universal PCR Master Mix, 0,15 ml de chaque amorce directe et inverse (la concentration finale de chaque amorce doit être de 300 nM), et 1 ml de sonde TaqMan (la concentration finale de la sonde doit être de 200 nM). Les amorces et la sonde appropriées doivent être ajoutées à chacun des mélanges maîtres p210 BCR-ABL et ABL RQ-PCR.
  - Préparer la RQ-PCR dans une plaque à 96 puits avec 20 ml de mélange maître par puits et 5 ml d'ADNc (0,25 mg d'équivalent ARN) dans les puits appropriés. Les quatre rangées supérieures (48 puits) de la plaque à 96 puits peuvent être utilisées pour la RQ-PCR du gène p210 BCR-ABL (gène cible), et les quatre rangées inférieures pour la RQ-PCR ABL (gène de contrôle endogène), ou vice versa. Chaque plaque doit comprendre des étalons, des contrôles à blanc et négatifs, des contrôles de sensibilité et des échantillons de test en double ou en triple exemplaire. Lorsque vous avez fini de pipeter les échantillons dans la plaque de réaction à 96 puits, scellez la plaque avec un film optique adhésif.
  - Centrifuger la plaque de réaction à faible vitesse pendant 2 minutes, puis charger la plaque sur un instrument PCR en temps réel Applied Biosystems 7900HT. Utiliser le logiciel de détection de séquences (SDS) d'Applied Biosystems pour documenter et exécuter l'essai.
  - Effectuer la RQ-PCR en utilisant les conditions de cyclage thermique universelles modifiées : 50°C pendant 2 min, 95°C pendant 10 min, et 45 cycles de 95°C pendant 15 s et 60°C pendant 1 min.
- **Programmer et exécuter Instrument Applied Biosystems 7900HT**
- Utiliser l'instrument Applied Biosystems 7900HT et le logiciel SDS conformément aux recommandations du fabricant.

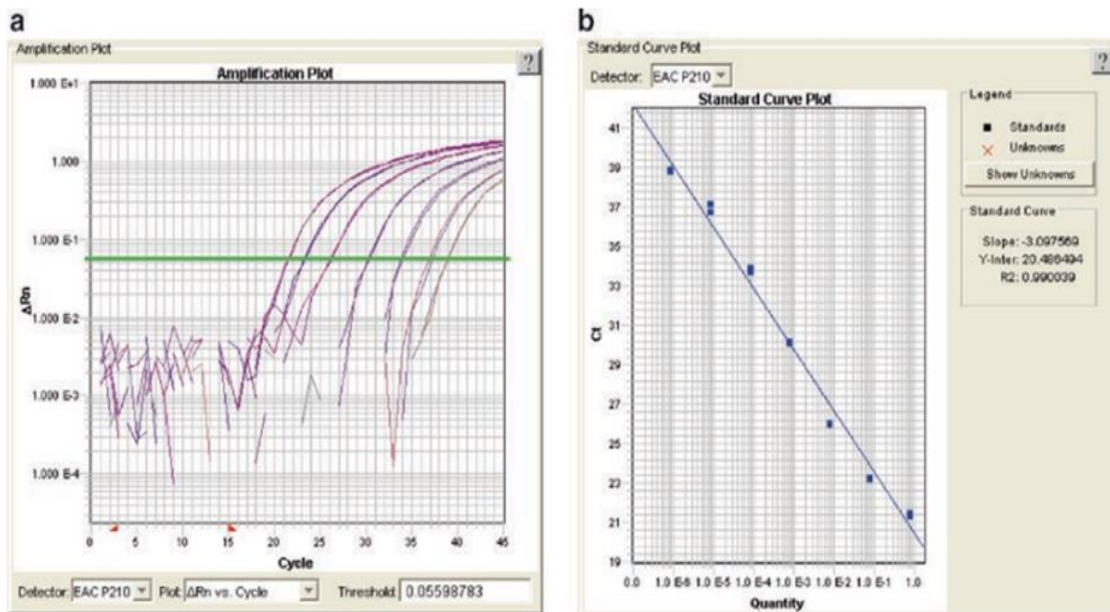
- Lancer brièvement le logiciel SDS et ouvrir une nouvelle fenêtre de modèle de plaque pour indiquer l'emplacement des puits sur la plaque à 96 puits pour les dilutions standard, les contrôles et les échantillons à tester. Enregistrer les valeurs standard (par exemple, 1, 0,1, 0,001 mg d'ARN, etc.) pour les puits contenant les dilutions d'échantillons pour les courbes standard p210 BCR-ABL et ABL. Les échantillons répliqués pour les échantillons de test doivent être en double ou en triple. Sauvegarder la fenêtre du modèle avec les données enregistrées en tant que fichier d'exécution SDS.
- Sélectionnez le bouton connecte, puis chargez la plaque à 96 puits dans l'instrument. Sélectionnez le bouton de démarrage pour commencer l'analyse.

➤ **Collecte et analyse des données**

- Une fois l'analyse terminée, retirez la plaque de l'instrument et enregistrez les résultats de l'analyse. Lorsque le bouton d'analyse est sélectionné dans le logiciel SDS, les résultats seront analysés automatiquement si les normes et les informations sur l'échantillon de test ont été enregistrées comme indiqué ci-dessus.
- Visualiser les résultats de la courbe standard dans les vues du tracé d'amplification et du tracé de la courbe standard dans le logiciel SDS. Sélectionner les seuils de croisement (CT) pour les courbes standard des RQ-PCR p210 BCR-ABL et ABL dans la phase exponentielle des réactions, manuellement ou automatiquement, afin d'obtenir les meilleures pentes et les meilleurs coefficients de corrélation (R<sup>2</sup>). Des exemples de courbes standard pour la BCR-ABL p210 et la RQ-PCR ABL sont illustrés dans les figures 16 et 17, respectivement.
- Si les courbes standard sont considérées comme ayant des pentes et des valeurs R<sup>2</sup> acceptables, exporter les résultats du logiciel SDS sous forme de fichier texte. Importer le fichier texte dans le logiciel Microsoft Excel pour les calculs ultérieurs des résultats.

➤ **Quantification relative à l'aide d'une courbe standard**

- Inclure les résultats de la BCR-ABL p210 et de la RQ-PCR ABL pour chaque échantillon dans le fichier Excel créé pour le calcul des résultats.

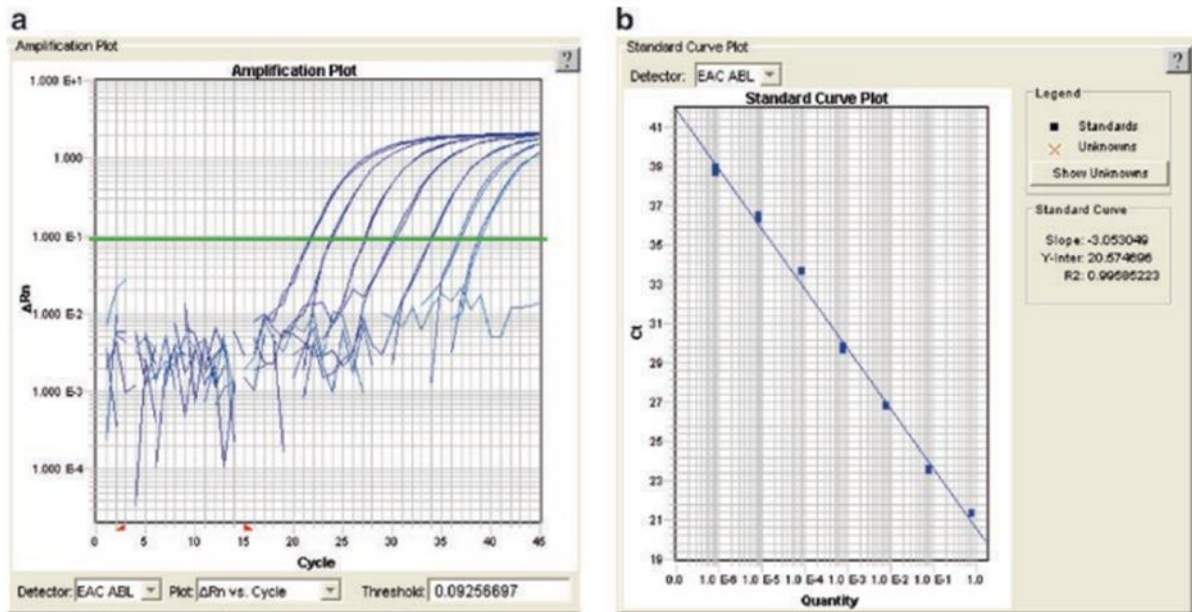


**Figure 16.** Résultat obtenu après analyse en RtqPCR.

### Explication du résultat obtenu

Les courbes standards BCR-ABL p210 servent de référence dans ce processus. Elles consistent en une série de dilutions précises d'ADN ou d'ARN contenant des quantités connues de transcrite BCR-ABL p210. En amplifiant simultanément ces standards et l'échantillon du patient, on peut comparer les résultats obtenus et déduire la quantité exacte de BCR-ABL p210 présente dans l'échantillon.

Les courbes d'amplification et courbes standard du BCR-ABL p210. Sur la figure 16, (a) Courbe d'amplification pour les doubles de sept étalons contenant de  $0,25 \times 10^{-6}$  mg à 0,25 mg d'équivalent ARN de K562. L'axe des y est une mesure du changement de fluorescence en fonction du nombre de cycles PCR sur l'axe des x. La barre grise horizontale épaisse représente le seuil de passage dans la phase exponentielle de la réaction d'amplification dans laquelle le cycle seuil (CT) est déterminé pour chaque dilution standard. (b) Courbe standard construite sur la base des valeurs CT déterminées pour chaque étalon à partir du diagramme d'amplification. La courbe standard est construite sur la base des valeurs CT en ordonnée et de la quantité de l'étalon en abscisse. Cette courbe est utilisée pour déterminer la quantité de transcrite BCR-ABL p210 dans un échantillon inconnu.



**Figure 17.** Courbes d'amplification et courbes standard de l'ABL.

**Explication des résultats :** Dans le cas d'un résultat positif : (a) Courbe d'amplification pour les doubles de sept étalons contenant de  $0,25 \times 10^{-6}$  mg à 0,25 mg d'équivalent ARN de K562. L'axe des y est une mesure du changement de fluorescence en fonction du nombre de cycles PCR sur l'axe des x. La barre grise horizontale épaisse représente le seuil de franchissement de la phase exponentielle de la réaction d'amplification dans laquelle le cycle seuil (CT) est déterminé pour chaque dilution standard. (b) Courbe standard construite sur la base des valeurs CT déterminées pour chaque étalon à partir de la courbe d'amplification. La courbe standard est construite sur la base des valeurs CT sur l'axe des y et de la quantité de l'étalon sur l'axe des x. Cette courbe est utilisée pour déterminer la quantité de transcrite ABL dans un échantillon inconnu.

- Les calculs requis pour cette méthode sont les suivants (1) calcul des moyennes, si des échantillons répétés sont testés ; (2) normalisation des résultats du gène cible (p210 BCR-ABL) par rapport aux résultats obtenus pour le gène de contrôle (ABL) ; (3) normalisation des résultats du gène cible par rapport à ceux obtenus à partir des échantillons d'étalonnage pour déterminer la valeur quantitative relative de p210 BCR-ABL.
- Reproduire les calculs de l'exemple moyen (voir le tableau suivant) :

p210 BCR-ABL	p210 BCR-ABL C <sub>T</sub>	p210 BCR-ABL quantity	ABL	ABL C <sub>T</sub>	ABL quantity
Replicate 1	25.90	0.0091	Replicate 1	25.26	0.0092
Replicate 2	25.97	0.0086	Replicate 2	25.55	0.0075
Replicate 3	25.99	0.0085	Replicate 3	25.57	0.0074
<i>Average</i>	25.95	0.0087	<i>Average</i>	25.46	0.0081

- **Exemple p210 Calibrateur BCR-ABL et ABL CT et résultats de quantité pour les calculs suivants :**

p210 BCR-ABL calibrator CT =23,23

p210 BCR-ABL quantité du calibre = 0,0568

Calibreur ABL CT =22,68

Quantité du calibreur ABL = 0,0574

- **Exemple de calculs de normalisation :**

Échantillon test p210 BCR-ABL normalisation = moyenne

p210 Quantité BCR-ABL ÷ moyenne Quantité ABL = 0,0087 ÷ 0,0081 = 1,074

Échantillon d'étalonnage p210 Normalisation BCR-ABL = p210

Quantité de l'échantillon calibrateur BCR-ABL ÷ Quantité ABL de l'échantillon calibrateur =  
0.0568 ÷ 0.0574 = 0.99

Résultats de l'échantillon final p210 BCR-ABL (valeur quantitative relative) = échantillon de test normalisé p210 BCR-ABL/ABL ratio ÷ échantillon de calibrage normalisé p210 BCR-ABL/ABL = 1,074 ÷ 0,99 = 1,09.

➤ **Quantification relative à l'aide de la méthode comparative de tomodynamométrie**

- Vérifier que les efficacités d'amplification des RQ-PCR pour le gène cible BCR-ABL p210 et le gène endogène ABL sont similaires et proches de 100 % avant d'utiliser la méthode CT comparative.
- Effectuer l'essai RQ-PCR de la même manière que celle décrite ci-dessus, sauf qu'aucune dilution de courbe standard ne doit être incluse dans la plaque de réaction. Cette méthode fait appel à une méthode de calcul connue sous le nom de méthode Delta Delta CT ( $\Delta\Delta CT$ ) et repose sur une comparaison du nombre CT entre le gène cible BCR-ABL p210 et le gène de

référence endogène ABL par rapport à un calibrateur. La formule de ce calcul est la suivante :  $2 - \Delta\Delta CT$

- **Les calculs requis pour cette méthode sont les suivants :**

1) calcul du  $\Delta CT$  pour l'échantillon test p210 BCR-ABL par rapport au contrôle endogène ABL et pour le calibrateur p210 BCR-ABL par rapport au calibrateur ABL.

2) calcul du 2-DDCT.

3) calcul du 2-DDCT pour obtenir la valeur quantitative relative.

- **Calculs du  $\Delta CT$  :**

$\Delta CT$  pour les échantillons de test = CT moyen du test BCR-ABL p210 CT moyen de l'échantillon du contrôle endogène ABL =  $25,95 - 25,46 = 0,49$

$\Delta CT$  pour les échantillons d'étalonnage = CT du BCR-ABL p210 CT de l'échantillon calibrateur ABL =  $23,23 - 22,68 = 0,55$

- **$\Delta DCT$  calculation :**

$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ for test samples} - \Delta CT \text{ for calibrator samples} = 0,49 - 0,55 = -0,06$

# **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

## II. RESULTATS

### Etude de cas exemple

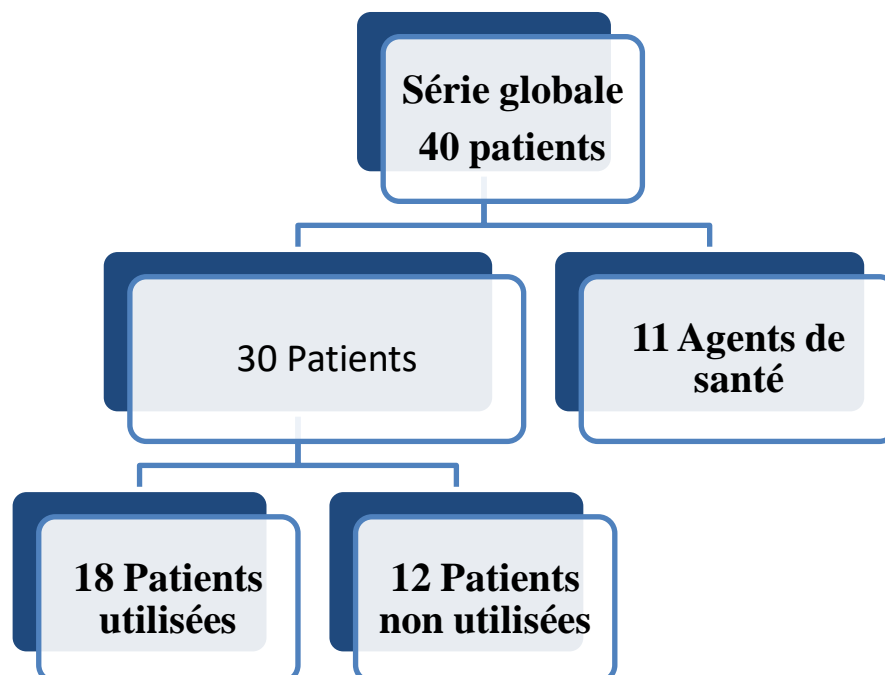
**Etude de l'association entre les polymorphismes génétiques C677T du méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) et risque de leucémie myéloïde chronique : à propos de cas cliniques d'une population Algérienne.**

(Cet exemple que nous proposons est un extrait d'une étude faite par MOHAMMEDI Kenza (Doctoral dissertation, Université Mohamed Khider-Biskra, 2015).

Nous reprenant ce travail pour illustrer l'intérêt du diagnostic moléculaire dans la prise en charge des hémopathies malignes).

#### ➤ La population d'étude

Un total de 40 patients a été inclus dans l'étude, parmi lesquels 30 patients et 11 agents de santé. L'analyse moléculaire n'a été réalisée que sur 18 des patients et les 11 agents. Les échantillons de 12 autres patients n'ont pas pu être utilisés en raison de la qualité insuffisante du sang prélevé et de la quantité insuffisante. Pour poursuivre ces recherches, il serait envisageable d'augmenter le nombre d'échantillons dans les deux groupes de population.

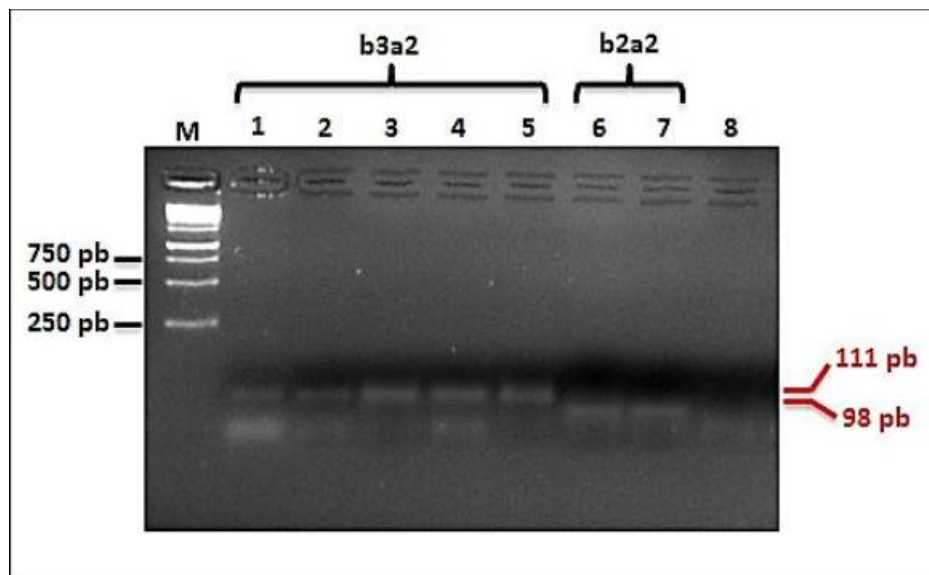


**Figure 18.** Représentation des patients concernés par l'étude.**Tableau 2.** Sexe, effectifs et âge moyen des cas analysés.

Sexe	Témoins sains		LMC	
	M	F	M	F
Effectifs	6	5	11	7
Age moyen (ans)	24	33	50	45

## II.1. Résultats de la technique RT-PCR :

- Amplification des transcrits du gène chimère Bcr-Abl



**Figure 19.** Photographie du profil électrophorétique présentant les différents transcrits du gène chimère Bcr-Abl.

Ce profil est obtenu après électrophorèse sur gel d'agarose à 3 % suivie d'une coloration au BET et visualisation sous U.V.

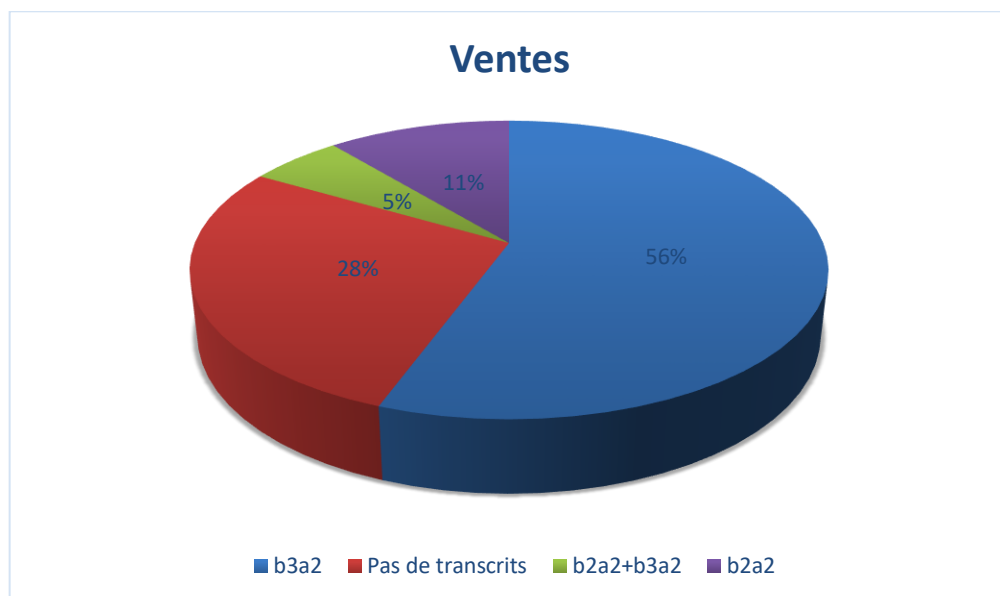
M : marqueur de poids moléculaire ; ligne 1, 2, 3, 4, et 5 : bandes de 111 pb, correspondant au transcrit b3a2 ; ligne 6 et 7 : bandes de 98 pb, correspond au transcrit b2a2 ; ligne 8 : témoin négatif.

- **Distribution des transcrits du gène chimère Bcr-Abl**

**Tableau 3.** Distribution des transcrits du gène chimère Bcr-Abl chez la population LMC.

Type de transcrit	N	%
<b>b2a2</b>	2	11
<b>b3a2</b>	10	55,6
<b>e1a2</b>	0	0
<b>b2a2+ b3a2</b>	1	5,6
<b>Pas de transcrits</b>	5	27,8
<b>Total</b>	18	100

N : Nombre de cas.



**Figure 20.** Répartition des transcrits du gène chimère Bcr-Abl chez la population LMC.

➤ **Programme d'amplification**

Utilisation d'un programme de PCR pour le gène chimère Bcr-Abl, permettant l'amplification maximale des fragments. Les amorces et la température d'hybridation utilisées dans la PCR ont été sélectionnées conformément à Bock O. et al. (2006). Le nombre de cycles a été optimisé à 40 cycles en fonction de l'intensité du signal obtenu.

➤ **Faux positifs et faux négatifs**

Le contrôle de la qualité de l'ARN sur gel d'agarose, effectué après l'extraction, a permis de résoudre le problème des faux négatifs, potentiellement causé par une dégradation des ARN totaux ou une mauvaise transcription inverse. Pour prévenir les faux positifs, toutes les solutions ont été préparées avec des réactifs exempts de RNase avant la réaction de transcription inverse.

➤ **Intensité des bandes**

Les bandes d'ADNc correspondant aux transcrits du gène chimère Bcr-Abl présentent des signaux différents en raison d'une mesure incorrecte de l'absorbance. Malgré nos tentatives de réaliser la mesure à partir de différents spectrophotomètres, le problème persiste, expliquant ainsi la discontinuité du signal.

### III. DISCUSSION DES RESULTATS

La RT-PCR est une technique très sensible (1 sur  $10^6$  cellules) par rapport à la cytogénétique (sensibilité d'environ 1 à 3 %). Elle offre la possibilité de détecter rapidement et sensiblement le réarrangement Bcr-Abl dans le sang des patients suspects de LMC, en parallèle - voire même avant - la réalisation du myélogramme avec le caryotype (81).

Deux facteurs peuvent limiter l'efficacité de la technique de RT-PCR : la qualité précaire du matériel de départ (ARNm) et la nécessité d'un marqueur moléculaire spécifique dans la pathologie étudiée.

La configuration moléculaire de la jonction Bcr-Abl, détectée dans l'ARNm de nos patients, se présente sous deux types : b2a2 et b3a2. Nous avons observé une prédominance du transcrite b3a2. Le transcrite e1a2 n'a pas été détecté, étant principalement associé à la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL).

Chez certains patients, aucun transcrite n'a été détecté, ce qui pourrait s'expliquer par une potentielle rémission moléculaire chez ces individus. Pour suivre la présence des transcrits, le sang d'un patient présentant le transcrite b3a2 a été prélevé après un mois de traitement par l'imatinib mésylate, et le résultat de la RT-PCR sur ce patient était positif (présence du transcrite b3a2), suggérant une possible résistance au traitement à l'imatinib.

La technique de RT-PCR revêt une importance primordiale dans la LMC, tant pour la confirmation diagnostique par la détection des transcrits du gène chimère Bcr-Abl que pour le choix approprié de la thérapie. Cependant, sa limite dans le suivi de la maladie réside dans sa nature qualitative à l'échelle moléculaire. Pour un suivi de la maladie résiduelle, une PCR quantitative est nécessaire, mesurant la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle en temps réel à l'aide d'un marqueur fluorescent. Cette méthode permet des mesures quantitatives, mais elle nécessite un équipement spécifique et des réactifs coûteux.

# **CONCLUSION GENERALE**

## Conclusion générale

### L'intérêt du diagnostic moléculaire dans les hémopathies malignes

Le diagnostic moléculaire a révolutionné le domaine des hémopathies malignes, offrant aux cliniciens des outils puissants pour le diagnostic, le pronostic, la stratification du risque et la surveillance de la maladie. Son impact se traduit par une meilleure prise en charge des patients, une optimisation des stratégies thérapeutiques et des économies de santé.

#### Amélioration du diagnostic et du pronostic :

- **Identification précise des sous-types hémopathiques :** Le diagnostic moléculaire permet de distinguer des entités distinctes au sein des hémopathies, affinant le diagnostic et permettant une classification plus précise de la maladie. Cela a des implications majeures pour le pronostic et le choix du traitement.
- **Détection de mutations génétiques :** L'analyse de mutations spécifiques, comme JAK2 V617F dans la polyglobulie myéloproliférative, permet de prédire l'évolution de la maladie et de guider la prise de décision thérapeutique.
- **Suivi de la maladie résiduelle :** La quantification du transcrite BCR-ABL par RT-PCR est essentielle pour le suivi de la leucémie myéloïde chronique (LMC) en rémission moléculaire, permettant une détection précoce d'une rechute.

#### Optimisation des stratégies thérapeutiques :

- **Sélection de thérapies ciblées :** Le diagnostic moléculaire peut identifier des mutations génétiques qui rendent les cellules cancéreuses sensibles à des thérapies ciblées spécifiques, comme les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) dans la LMC.
- **Stratification du risque et adaptation des traitements :** En identifiant les patients à haut risque, le diagnostic moléculaire permet d'adapter l'intensité du traitement, optimisant l'efficacité tout en minimisant les effets secondaires.
- **Surveillance de la réponse au traitement :** Le suivi des marqueurs moléculaires, comme la maladie résiduelle minimale (MRM), permet d'évaluer la réponse au traitement et d'identifier précocement une résistance thérapeutique, permettant d'ajuster la stratégie thérapeutique en conséquence.

#### Impact économique :

- **Réduction des coûts inutiles :** Un diagnostic précis et un pronostic plus fiable permettent d'éviter des examens complémentaires et des traitements inutiles, réduisant ainsi les coûts de santé.

- **Amélioration de l'efficacité des traitements** : Le choix de thérapies plus ciblées et mieux adaptées aux caractéristiques individuelles du patient conduit à une meilleure efficacité thérapeutique, réduisant les coûts liés aux hospitalisations prolongées et aux complications.
- **Optimisation de l'allocation des ressources** : Une meilleure compréhension de l'histoire naturelle de la maladie et des facteurs de risque permet une meilleure allocation des ressources médicales, en priorisant les patients qui en ont le plus besoin.

**REFERENCES**

**BIBLIOGRAPHIQUES**

**Références bibliographiques**

1. HAMDI-LEZZAR, Pr S. Sang hematopoiese et hematimétrie Pr Hamdi. studoco. [En ligne]
2. Khaoula, BOURAS. Hémopathies malignes : Génétique et nouvelles. [En ligne] 2021.
3. [En ligne] <https://www.aquaportail.com/blog/article/289/composants-et-types-de-sang..>
4. [En ligne] <https://www.christie.nhs.uk/media/zi5gj3l4/164-bone-marrow-harvest-htu-august-2022.pdf>.
5. Moelle osseuse : rôle, maladies, où se trouve-t-elle ? sante.journaldesfemmes. [En ligne] 11 12 2023.
6. [En ligne] <https://sante.journaldesfemmes.fr/fiches-maladies/2513718-cancer-de-la-moelle-osseuse-symptomes-stades-et-esperance-de-vie/>.
7. Robin, Jean-Charles Boisset et Catherine. Origine endothéliale des cellules souches hématopoïétiques. medecine sciences. [En ligne] 21 October 2011.
8. [En ligne] [https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/\\_Public/40/107/40107835.pdf](https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/40/107/40107835.pdf).
9. Najman, F. Delhommeau & A. Hématopoïèse normale et sa régulation. em consulte. [En ligne] 14 Janvier 2016.
10. L'hématopoïèse. arcagy.org. [En ligne] 07 Juillet 2022.
11. [En ligne] <https://fr.wikipedia.org/wiki/H%C3%A9matopo%C3%AF%C3%A8se..>
12. Bernard J, Lévy J P, Varet B, Claudel JP, Rain JD, Sultan Y. Abrégé D'hématologie. . Paris : 9ème ed. par Masson & cie. 1998:352p.
13. Espoir, F. L. (n.d.). . cancers du sang. [En ligne]
14. Évolution de la leucémie lymphoblastique aiguë. Société canadienne du cancer . [En ligne]
15. Bauduer, Frédéric. Aspects cliniques des leucémies aiguës. [En ligne] 2002. 13-018-G-

10.

16. R E Gale, H Wheadon, A H Goldstone, A K Burnett, D C Linch. Frequency of clonal remission in acute myeloid leukaemia. [En ligne] Jan 1993. 138-42.

17. Ashkan Emadi, Jennie York Law. Leucémie myéloïde aiguë (LMA). [En ligne] Oct 2023.

18. Les leucémies de l'adulte. . Fondation ARC pour la recherche sur le cancer. [En ligne] 2013. 36100.

19. Hémopathies malignes. institut cancerologie prive. [En ligne]

<https://www.institutcancerologieprive.fr/cancers/h%C3%A9mopathies-malignes>.

20. R. Gonon-Demoulian, J.M. Goldman, F.E. Nicolini. Historique de la leucémie myéloïde chronique : un paradigme de traitement du cancer. BULLETIN DU CANCER.

2014. Doi : 10.1684/bdc.2013.1876.

21. La leucémie myéloïde chronique. [En ligne]

[https://sfh.hematologie.net/sites/sfh.hematologie.net/files/medias/documents/leucemie\\_myeloide\\_chronique2.pdf](https://sfh.hematologie.net/sites/sfh.hematologie.net/files/medias/documents/leucemie_myeloide_chronique2.pdf).

22. Philippe Travade, Olivier Tournilhac. Leucémie lymphoïde chronique. Paris : Elsevier, 2000. 13-013-B-20.

23. Hémopathies malignes (cancers du sang). infocancer. [En ligne] 2022.

24. La cytogénétique et classification des hémopathies malignes. [En ligne]

<https://www.memoireonline.com/01/13/6744/La-cytogenetique-et-classification-des-hemopathies-malignes.html>.

25. La maladie de Hodgkin. [En ligne]

<https://sfh.hematologie.net/sites/sfh.hematologie.net/files/medias/documents/maladiedehodgkin.pdf>.

26. Houar.I. Généralités sur les hémopathies malignes et classification. [En ligne]

27. [En ligne] <http://wd.fmpm.uca.ma/biblio/theses/annee-htm/FT/2016/these98-16.pdf>.
28. Europe PMC. europe pmc. [En ligne] <https://europepmc.org/article/MED/22198187>.
29. Hématologie. Hématologie. [En ligne] <https://hematologie-dz.com/online/uploads/2023/RAH%20nume%CC%81ro%2016.pdf>.
30. hematologie-dz. [En ligne] <https://hematologie-dz.com/online/uploads/sahts-2014/h1/C1-Abad.pdf>.
31. passeport sante. passeport sante. [En ligne] <https://www.passeportsante.net/fr/Maux/Problemes/Fiche.aspx?doc=hemopathie-maligne>.
32. sante le figaro. sante le figaro. [En ligne] <https://sante.lefigaro.fr/sante/maladie/hemopathies-malignes/quels-sont-signes>.
33. pages jaunes. pages jaunes. [En ligne] <https://leucemie.pagesjaunes.fr/comprendre/facteurs-risque-leucemie>.
34. Haute Autorité De Santé. Haute Autorité De Santé. [En ligne] [https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2017-11/argumentaire\\_bcr-abl\\_vd.pdf](https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2017-11/argumentaire_bcr-abl_vd.pdf).
35. pages jaunes. pages jaunes. [En ligne] <https://leucemie.pagesjaunes.fr/comprendre/facteurs-risque-leucemie>.
36. fondation-arc. fondation-arc. [En ligne] <https://www.fondation-arc.org/cancer/leucemie-adulte/symptomes-diagnostic-cancer>.
37. vulgaris medical. vulgaris medical. [En ligne] <https://www.vulgaris-medical.com/encyclopedie-medicale/leucemie-cancer-du-sang-causes-symptomes-traitements/>.
38. passeport sante. passeport sante. [En ligne] <https://www.passeportsante.net/fr/Maux/Problemes/Fiche.aspx?doc=leucemie-symptomes>.
39. intergroupe francophone du myélome. intergroupe francophone du myélome. [En ligne] <https://www.myelome.fr/le-myelome/connaitre-le-myelome/les->

sympt%C3%B4mes-du-my%C3%A9lome.html.

40. passeport sante. passeport sante. [En ligne]

<https://www.passeportsante.net/fr/Maux/Problemes/Fiche.aspx?doc=myelome-multiple-definition-symptomes-traitement>.

41. journal des femmes. journal des femmes. [En ligne]

<https://sante.journaldesfemmes.fr/fiches-maladies/2741445-lymphome-symptomes-peau-debut/>.

42. Louise M Kelly, D Gary Gilliland. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2002. 3:179-98.

43. Schmidt, Aline Tanguy. Les leucémies aiguës lymphoblastiques en 2015 : contribution des facteurs de risque cytogénétiques et moléculaires à une thérapeutique adaptée. [En ligne] 2015.

44. F. Huguet, C. Récher. *Leucémies aiguës de l'adulte*. France : Elsevier Masson SAS, 2012. Article 4-0100.

45. Ashkan Emadi, Jennie York Law. Leucémie myéloïde chronique (LMC). [En ligne] Oct 2023.

46. T. Leguay, F.-X. Mahon. *Leucémie myéloïde chronique*. France : Elsevier SAS, 2005. Livre 13-011-B-10.

47. [En ligne]

<https://researchadvocacy.org/sites/default/files/resources/MolecularDiagnosticsTutorialFinal.pdf>.

48. S Thijsen, G Schuurhuis, J van Oostveen, G Ossenkoppele. Chronic myeloid leukemia from basics to bedside. *Leukemia.* 1999. 13(11):1646-74.

49. Oliver Hantschel, Giulio Superti-Furga. Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004. 5(1):33-44.

50. Treatment and molecular monitoring update in chronic myeloid leukemia management. *Ann Biol Clin. Paris* : s.n., 2017. Livre 1;75(2):129-145.
51. B D Lichty, S Kamel-Reid. Exon-skipping in BCR/ABL is induced by ABL exon 2, *Biochem J.* 2000. 15;348 Pt 1(Pt 1):63-9.
52. [En ligne] <https://acces.ens-lyon.fr/acces/thematiques/evolution/logiciels/anagene/programmes-de-1ere-s-2011/variabilite-genetique-et-sante/perturbation-du-genome-et-cancerisation/traitement-des-cancers/3-la-decouverte-de-la-nature-de-lanomalie-chromosomique>.
53. V H J van der Velden, A Hochhaus, G Cazzaniga, T Szczepanski, J Gabert, J J M van Dongen. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects, *Leukemia* . 2003. 17(6):1013-34.
54. Les symptômes et le diagnostic des leucémies aiguës. Fondation pour la recherche sur le cancer. [En ligne] <https://www.fondation-arc.org/cancer/leucemie-adulte/symptomes-diagnostic-cancer>.
55. Leucémie Myéloïde Chronique : diagnostic et suivi. Ponceau JF, Villarese P.
56. Kessal, F. A. T. M. A., Agournaz, S., Ouzid, S., Allouda, M., Dali, N., & Ait, H. Leucémies aiguës Aspects biologiques. *Hématologie*. 2018. Livre 24, 62.
57. Inwoley, K. A., Sawadogo, D., Mizero, L., Salou, M., Karim, N., & Sangare, A. *Biologie Clinique. Bull Soc Pathol Exot.* 2004. Livre 97(5), 319-322.
58. Merle-Béral H., Le Garff-Tavernier M. Immunophénotypage des hémopathies malignes par cytométrie. Paris : Elsevier Masson SAS, 2008. Livre 13-000-L-10.
59. Dastugue, N. Place de la cytogénétique conventionnelle et moléculaire dans l'étude des leucémies aiguës. *PATHOLOGIE BIOLOGIE*. France : Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS, 2003. 10.1016/S0369-8114(03)00082-8.

60. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian. The biology of chronic myeloid leukemia, *N Engl J Med*. 1999. 15;341(3):164-72.
61. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Cazzola M, James W Vardiman. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia, *Blood*. 2016. 19;127(20):2391-405.
62. [En ligne] 2010-2011. <https://archives.uness.fr/sites/campus-unf3s-2014/genetique-medicale/enseignement/genetique19/site/html/cours.pdf>.
63. CYTOGÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE (FISH). cytogen. [En ligne] <https://www.cytogen.fr/cytogenetique-moleculaire-fish>.
64. [En ligne] <https://www.leukemia-cell.org/atlas/res/photogallery/th-fig-3.jpg>.
65. [En ligne] 2010-2011. <https://archives.uness.fr/sites/campus-unf3s-2014/genetique-medicale/enseignement/genetique19/site/html/cours.pdf>.
66. Institut de Pathologie et de Génétique a.s.b.l. Institut de Pathologie et de Génétique a.s.b.l. [En ligne] <http://www.ipg.be/biologie-moleculaire/test-par-cgh-sur-micropuce/>.
67. The new england journal of medicine. The new england journal of medicine. [En ligne] <https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJMoa0808253?articleTools=true>.
68. What is Next-Generation Sequencing (NGS)? thermofisher. [En ligne] <https://www.thermofisher.com/dz/en/home/life-science/sequencing/sequencing-learning-center/next-generation-sequencing-information/ngs-basics/what-is-next-generation-sequencing.html>.
69. Serrati S, De Summa S et autre. Next-generation sequencing: advances and applications in cancer diagnosis. dovepress. [En ligne] 2 December 2016.
70. Applications de réaction en chaîne par polymérase (PCR). sigmaaldrich. [En ligne]
71. Acquaviva, Hélène Cavé et cécile. RT-PCR in clinical diagnosis. researchgate. [En ligne] November 2003.

72. dumas ccscd cnrs. [En ligne] <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02103653v1/document>.
73. Le diagnostic. infocancer. [En ligne] 12 décembre 2018.
74. Reinhardt, Thomas Burmeister et Richard. A multiplex PCR for improved detection of typical and atypical BCR–ABL fusion transcripts. sciencedirect. [En ligne] avril 2008.
75. Herlet, Sophie. Les inhibiteurs de tyrosine kinase dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique chez l'adulte Du Glivec® aux traitements de deuxième génération. [En ligne] 20 Mars 2018.
76. [En ligne] [http://thesis.univ-biskra.dz/1235/1/Bio\\_m3\\_2015.pdf](http://thesis.univ-biskra.dz/1235/1/Bio_m3_2015.pdf).
77. Jacque, N., & Leblond, V. La leucémie lymphoïde chronique. s.l. : La Presse Médicale 48(7-8), 2019. 807-815.
78. qiagen.com. qiagen.com. [En ligne] [file:///C:/Users/Client/Desktop/protocol/Kit\\_ABL\\_BCL\\_RTQPCR.pdf](file:///C:/Users/Client/Desktop/protocol/Kit_ABL_BCL_RTQPCR.pdf).
79. PubMed The National Center for Biotechnology Information . PubMed The National Center for Biotechnology Information . [En ligne] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19959086/>.
80. [En ligne] <https://di.univ-blida.dz/xmlui/bitstream/handle/123456789/2427/107%20M.GP.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
81. Lejeune, Virginie Eclache & Françoise. Détection du chromosome Philadelphie chez les patients atteints de leucémie myéloïde chronique : Places respectives de la cytogénétique de l'hybridation in situ en fluorescence et de l'analyse moléculaire par RT-PCR. [En ligne] 2008.
82. Y, Katsura. pubmed.ncbi. Redefinition of lymphoid progenitors. [En ligne] Feb 2002.