



Année 2022

Thèse N° 060/22

# PROFIL GÉNÉTIQUE DES PATIENTS ATTEINTS DE LEUCÉMIE MYÉLOÏDE CHRONIQUE

Expérience du CHU Hassan II de Fès

(À propos de 123 cas)

THÈSE

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 15/02/2022

PAR

M. OTHMANE BERRADA

Né le 23 Octobre 1996 à Fès

POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN MÉDECINE

MOTS-CLÉS :

Leucémie myéloïde chronique – Transcrit de fusion BCR-ABL- PCR multiplex-  
Inhibiteur tyrosine kinase

JURY

Mme. BENMILOUD SARRA .....	PRÉSIDENT
Professeur de Pédiatrie	
Mme. BOUGUENOUCHE LAILA.....	RAPPORTEUR
Professeur agrégé de Génétique	
Mme. KHAMMAR ZINEB .....	} JUGES
Professeur agrégé de Médecine interne	
Mme. TLAMÇANI IMANE.....	
Professeur agrégé d'Hématologie	

# PLAN

<b>PARTIE THEORIQUE .....</b>	<b>7</b>
I. Introduction .....	8
II. Historique .....	10
III. Épidémiologie .....	14
IV. Facteurs étiologiques .....	17
V. Physiopathologie .....	19
1. Rappel sur l'hématopoïèse .....	19
2. Le chromosome Philadelphie.....	21
3. Le gène ABL.....	23
4. Le gène BCR.....	25
5. Le gène de fusion BCR-ABL et sa protéine .....	27
6. Conséquences cellulaires .....	29
VI. Phases de la LMC.....	33
1. Phase chronique .....	35
2. Phase accélérée .....	35
3. Phase blastique.....	36
VII. Classification.....	38
VIII. Diagnostic positif .....	40
1. Diagnostic clinique .....	40
2. Diagnostic hématologique et biologique .....	42
2.1 Hémogramme.....	42
2.2 Myélogramme.....	42
2.3 Biopsie ostéomédullaire .....	43
2.4 Autres examens biologiques .....	43
3. Diagnostic cytogénétique et moléculaire .....	44
3.1 Caryotype.....	44
3.2 FISH .....	45

3.3	La RT-PCR .....	46
IX.	Diagnostic différentiel .....	48
1.	Dans la phase chronique .....	48
2.	En phase aiguë .....	49
X.	Traitement de la LMC.....	50
1.	Critères de réponse.....	50
1.1	Réponse hématologique .....	50
1.2	Réponse cytogénétique.....	50
1.3	Réponse moléculaire.....	51
2.	Traitement.....	54
2.1	Historique des traitements.....	54
2.2	La thérapie ciblée .....	56
3.	Résistance au traitement.....	60
	<b>PARTIE PRATIQUE.....</b>	<b>64</b>
I.	Matériel et méthodes .....	65
1.	Objectifs de l'étude.....	65
2.	Population étudiée et méthodes .....	66
3.	Caractérisation moléculaire .....	67
3.1	Extraction d'ARN et contrôle qualité.....	67
3.2	Reverse transcription .....	69
3.3	Amplification par PCR multiplex.....	70
3.4	Quantification par PCR quantitative en temps réel .....	72
3.5	PCR simplex et Séquençage .....	77
4.	Caractérisation bio-informatique .....	81
5.	Analyse Statistique.....	87
II.	Résultats .....	88
1.	Caractérisation épidémiologique .....	88

1.1 Répartition selon le sexe.....	89
1.2 Répartition selon l'âge .....	90
2. Caractérisation clinique.....	92
3. Caractérisation hématologique.....	94
4. Caractérisation du profil génétique .....	95
III. Discussion .....	108
1. Données épidémiologiques .....	108
1.1 L'âge .....	108
1.2 Le sexe.....	109
2. Données cliniques.....	110
2.1 Phases de la maladie.....	110
2.2 Examen clinique .....	110
2.3 L'hémogramme .....	111
3. Profil génétique .....	114
3.1 Type de transcrit de fusion .....	114
3.2 Corrélation clinico-biologique et type de transcrit de fusion.....	116
3.3 Réponse au traitement et type de transcrit .....	118
3.4 Résistance au traitement.....	120
IV. Conclusion .....	124
<b>RÉSUMÉS .....</b>	<b>125</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>130</b>

## Liste des abréviations

<b>ABL</b>	: Abelson
<b>ADN</b>	: Acide désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	: L'ADN complémentaire
<b>AKT</b>	: activation of protein kinase B
<b>AML</b>	: Leucémie Aigüe Myeloblastique
<b>ARN</b>	: Acide ribonucléique
<b>ARNm</b>	: Acide ribonucléique messenger
<b>ARNm</b>	: ARN messenger
<b>ATP</b>	: Adenosine Tri Phosphate
<b>BAD</b>	: Biotin Acceptor Domain
<b>BCR</b>	: Breakpoint Cluster Region
<b>CCyR</b>	: Réponse cytogénétique complète
<b>CMR</b>	: réponse moléculaire complète
<b>CSH</b>	: Cellule Souche Hématopoïétique
<b>ELN</b>	: EuropeanLeukemiaNet
<b>EUTOS</b>	: European Treatment and Outcome Study
<b>FISH</b>	: Hybridation in situ fluorescente
<b>GDP</b>	: guanidine diphosphate
<b>GTP</b>	: guanidine triphosphate
<b>IFN<math>\alpha</math></b>	: Interferon-alpha
<b>IL</b>	: Interleukine

<b>ITK</b>	: Inhibiteur Tyrosine Kinase
<b>JAK</b>	: Janus Kinase
<b>kDa</b>	: kilo Dalton
<b>LAL</b>	: Leucémie Aigüe Lymphoïde
<b>LAM</b>	: Leucémie Aigüe Myéloïde
<b>LMC</b>	: Leucémie Myéloïde Chronique
<b>LT</b>	: Lymphocyte T
<b>MBP</b>	: myeloid blast phase
<b>MCyRM</b>	: Réponse cytogénétique majeure
<b>MMR</b>	: réponse moléculaire majeure
<b>MR</b>	: Réponse moléculaire
<b>NFS</b>	: Numération formule sanguine
<b>PA</b>	: phase accélérée
<b>PB</b>	: peripheral blood
<b>PC</b>	: phase chronique
<b>PCR</b>	: Polymerase Chain Reaction
<b>PCyR</b>	: réponse cytogénétique partielle
<b>Ph</b>	: Philadelphia chromosome
<b>Ph+</b>	: Chromosome Philadelphie positif
<b>RMM</b>	: réponse moléculaire majeure
<b>RNA</b>	: ribonucleic acid
<b>RTq-PCR</b>	: Quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction
<b>UV</b>	: ultraviolets

# PARTIE THEORIQUE



## I. Introduction

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est un syndrome myéloprolifératif clonal à prédominance granuleuse dû à la transformation de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes [1]. Elle appartient au groupe des néoplasmes myéloprolifératifs chroniques.

Il s'agit d'une maladie rare dont l'incidence est de 1 à 2 cas pour 100 000 personnes chaque année. Elle est plus fréquente chez les personnes âgées avec un âge médian au moment du diagnostic d'environ 65 ans [3]. Elle représente 2 à 5 % des leucémies de l'enfant et 15 % des leucémies de l'adulte [2].

En deux siècles, les progrès de la médecine et de la recherche médicale ont permis de comprendre la physiopathologie de la leucémie myéloïde chronique. Cette hémopathie maligne est devenue un modèle essentiel de cancérogénèse dans lequel une lésion moléculaire unique, causant la prolifération des cellules, a été identifiée.

La LMC résulte d'une translocation  $t(9;22)(q34;q11)$  connue sous le nom de chromosome Philadelphie [4]. Cette translocation entraîne une juxtaposition du gène ABL du chromosome 9 et du gène BCR du chromosome 22, ce qui donne un gène de fusion BCR-ABL qui code pour les transcrits et les protéines de fusion BCR-ABL avec une activité tyrosine-kinase inhabituelle [5]. La pathogenèse moléculaire de la LMC est bien comprise, mais le mécanisme qui entraîne la translocation du gène est inconnu.

La LMC a une évolution clinique triphasique ou biphasique : elle passe d'une phase chronique à une phase accélérée, puis à une crise blastique terminale. Parfois, elle passe directement de la phase chronique à la crise blastique.

La plupart des patients sont diagnostiqués lors de la phase chronique alors qu'ils sont asymptomatiques, à l'occasion d'une analyse sanguine effectuée à d'autres fins. Les résultats typiques sont une leucocytose avec un nombre accru de cellules immatures et, occasionnellement, une thrombocytose [6].

Le diagnostic moléculaire est devenu essentiel dans la prise en charge des patients atteints de la LMC pour aider à prédire les résultats et à orienter les décisions thérapeutiques. La PCR quantitative en temps réel (RTq-PCR) est une méthode permettant actuellement d'atteindre des niveaux de sensibilité informatifs, et trouve une place croissante dans la prise en charge de la leucémie myéloïde chronique et la quantification de la maladie résiduelle.

En l'absence de traitement, la LMC évolue en 3 à 5 ans vers une leucémie aiguë rapidement mortelle.

Les traitements tels que l'hydroxyurée ou le busulfan ne modifient que très peu la survie des patients. L'allogreffe de moelle osseuse permet de guérir les malades mais ne peut être proposée qu'à un nombre limité de patients. L'interféron alpha a amélioré la survie des patients répondeurs mais ces derniers sont peu nombreux et les effets secondaires ont rendu son utilisation limitée.

Aujourd'hui, l'imatinib mésylate, premier inhibiteur de tyrosine kinase spécifique de la protéine BCR-ABL, est devenu le traitement de première intention de cette hémopathie, faisant de la LMC un exemple d'hémopathie à thérapeutique ciblée [2].

## II. Historique

Le premier cas de leucémie fut décrit en 1827 par le français Alfred Velpeau qui observa chez Monsieur Vernis, fleuriste parisien de 63 ans, une splénomégalie associée à de la fièvre, une asthénie ainsi qu'un sang épais, ressemblant plus à du pus qu'à du sang. Il spécula avec exactitude que l'aspect du sang était probablement dû aux corpuscules blancs observés post-mortem [7].

La première description de leucémie fut néanmoins créditée à John Hughes Bennett (figure 1A) qui fut le plus complet et scientifique dans son étude. Il décrivit la leucémie à Édimbourg en 1845, après que son mentor, David Craigie, eut observé chez deux patients admis à l'Infirmerie royale d'Édimbourg, un sang « purulent » associé à une tumeur splénique [8].

Au cours de la même année, Rudolph Virchow (figure 1B), de l'École de médecine militaire de Berlin, découvrit son premier cas de leucémie alors qu'il menait des études sur la phlébite. Il s'agissait d'une femme de 50 ans admise pour asthénie, épistaxis et gonflement des jambes et de l'abdomen [9].

L'hypothèse initiale de Craigie et Bennett, qui pensaient que l'apparence des sangs observés pouvait évoquer un processus infectieux inhabituel, fut réfutée par Virchow. Selon Virchow, la leucémie apparaissait comme une maladie progressive, caractérisée par une augmentation du taux de globules blancs [10].

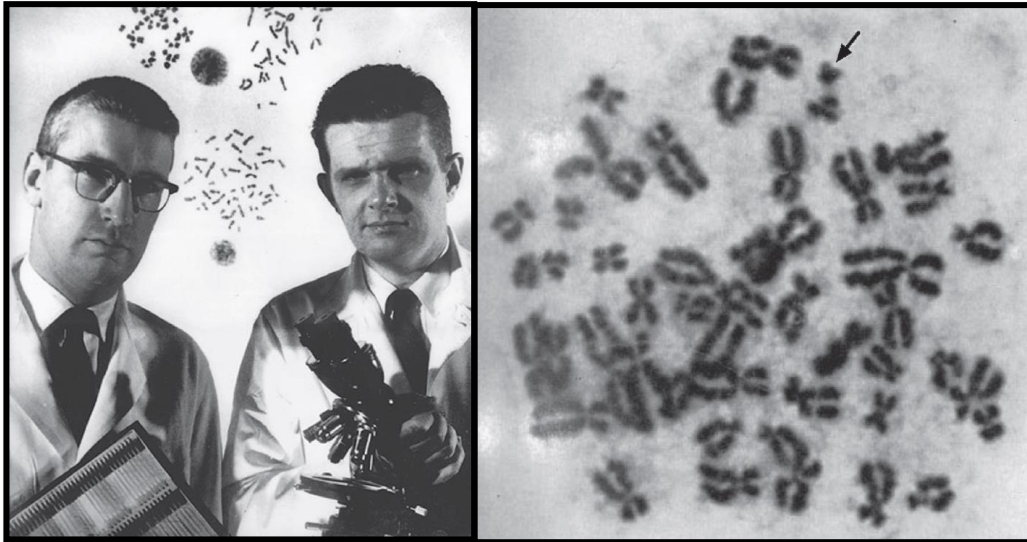
En 1847, Virchow suggéra le terme allemand « leukämie », du grec leukos qui signifie « blanc éclatant » et haima qui veut dire « sang », pour caractériser cette pathologie [11].



**Figure 1 :** A. Portrait de John Hughes Bennett. B. Portrait de Rudolf Virchow.

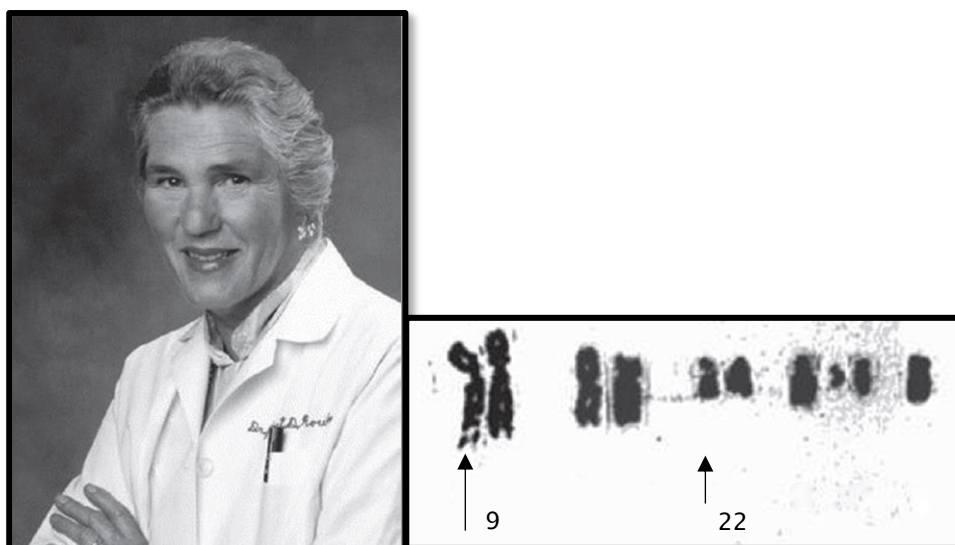
L'introduction de la coloration des cellules sanguines par Paul Ehrlich en 1878 en utilisant des radicaux acides, basiques et neutres, permit la différenciation des différents types leucocytaires. Ehrlich distingua les leucémies lymphoïdes et myéloïdes [12].

Une étape fondatrice de la compréhension de la physiopathologie de la LMC a été la découverte du chromosome Philadelphie par David Hungerford et Peter Nowell (figure 2A) en 1960 [13]. Ces deux chercheurs identifièrent un petit chromosome caractéristique chez deux patients atteints de LMC, qu'ils appelèrent « chromosome minute » [13] (figure 2B). Ce chromosome fut nommé « chromosome Philadelphie », en accord avec le Comité pour la standardisation des chromosomes qui avait suggéré que les chromosomes anormaux soient désignés par le nom de la ville dans laquelle ils avaient été découverts [14].



**Figure 2 :** A. Portraits de David Hungerford et Peter Nowell. B. Chromosome minute (flèche).

En 1973, Janet Rowley (figure 3A) médecin de l'Université de Chicago confirma que le chromosome Philadelphie correspondait bien au chromosome 22 auquel il manquait du matériel génomique, mais aussi elle démontra que le chromosome Philadelphie n'était pas issu d'une simple délétion mais d'une translocation réciproque équilibrée entre le chromosome 9 et le chromosome 22 (figure 3B) [13].



**Figure 3 :** A. Portrait de J. Rowley. B. Translocation t(9;22).

En 1970, Herbert Abelson et Louise Rabstein identifient le gène transformant ABL, localisé sur le chromosome 9 en position 9q37 [15]. La protéine ABL1 humaine est une protéine ubiquitaire d'environ 145 kDa à activité kinase étroitement régulée [16].

En 1984, Groffen et *al.* observèrent que les points de cassure chez 17 patients atteints de LMC se regroupaient dans une région de 5,8 kb du chromosome 22 qu'ils nommèrent « breakpoint cluster region » ou BCR [17]. La fusion BCR-ABL1 est formée à la suite de la translocation réciproque équilibrée t(9;22).

L'activité tyrosine kinase constitutive de la protéine BCR-ABL1, est mise en évidence par Lugo et *al.* en 1990 qui démontrent le rôle essentiel du pouvoir transformant de BCR-ABL1 [18].

Une fois BCR-ABL1 identifié comme l'événement moléculaire pathogénique dans la LMC, les efforts ont été portés sur la compréhension du mécanisme d'action moléculaire de la kinase BCR-ABL1 dans les années 2000 [19].

### III. Épidémiologie

Les données importantes sur l'épidémiologie des cancers (c'est-à-dire l'incidence, la mortalité, la répartition par âge et par sexe, la survie globale) sont obtenues à partir de registres couvrant soit l'ensemble de la population d'une nation [20] soit une population cible d'une région donnée [21].

Aux États-Unis par exemple, le registre (SEER) pour « The Surveillance, Epidemiology, and End Results registry » collecte des données sur tous les cancers nouvellement diagnostiqués dans les hôpitaux américains [22].

L'incidence de la LMC dans la population adulte totale varie de 0,4 cas pour 100 000 habitants dans certains pays non-occidentaux à 1.75 cas pour 100 000 habitants aux USA [23].

Comme l'incidence de la LMC augmente avec l'âge, certaines de ces variations sont dues à des différences significatives dans la répartition par âge des populations étudiées (par exemple, les pays occidentaux par rapport à plusieurs pays non occidentaux). Cependant, les chiffres sur l'incidence ajustée selon l'âge varient également considérablement (0,7–1,8/100 000) entre les différentes études (tableau 1) [23].

Des facteurs méthodologiques peuvent, au moins en partie, expliquer ces écarts. En particulier, l'inclusion de patients présentant des troubles myéloprolifératifs BCR-ABL négatifs peut expliquer l'incidence plus élevée de la LMC dans certains registres.

L'incidence de la LMC augmente avec l'âge, au moins jusqu'à 75–80 ans. En Europe, l'âge médian au moment du diagnostic de la LMC, tel qu'estimé à partir des registres de population, est de 57–60 ans [24].

Chez les enfants, la LMC est une maladie très rare dont l'incidence est de 0,6–1,2 cas pour un million par an [25].

La LMC est plus fréquente chez les hommes que chez les femmes avec un sex-ratio homme–femme variant entre 1,2 et 1,7 dans différentes études [23]. La différence d'incidence entre les sexes est moins importante dans les groupes d'âge plus jeunes.

Les données fiables sur la prévalence exacte de la LMC sont encore rares. Dans une enquête épidémiologique dans le nord de la France, Corm et al. ont rapporté une prévalence pour les années 1998, 2003 et 2007, respectivement, de 5,8, 6,8 et 7,3 pour 100 000 habitants [26]. En raison de l'amélioration spectaculaire de la survie, à la suite de l'introduction de l'imatinib et d'autres inhibiteurs de la tyrosine kinase, ainsi que de l'augmentation de l'espérance de vie dans la population générale, on peut s'attendre à ce que la prévalence continue d'augmenter.

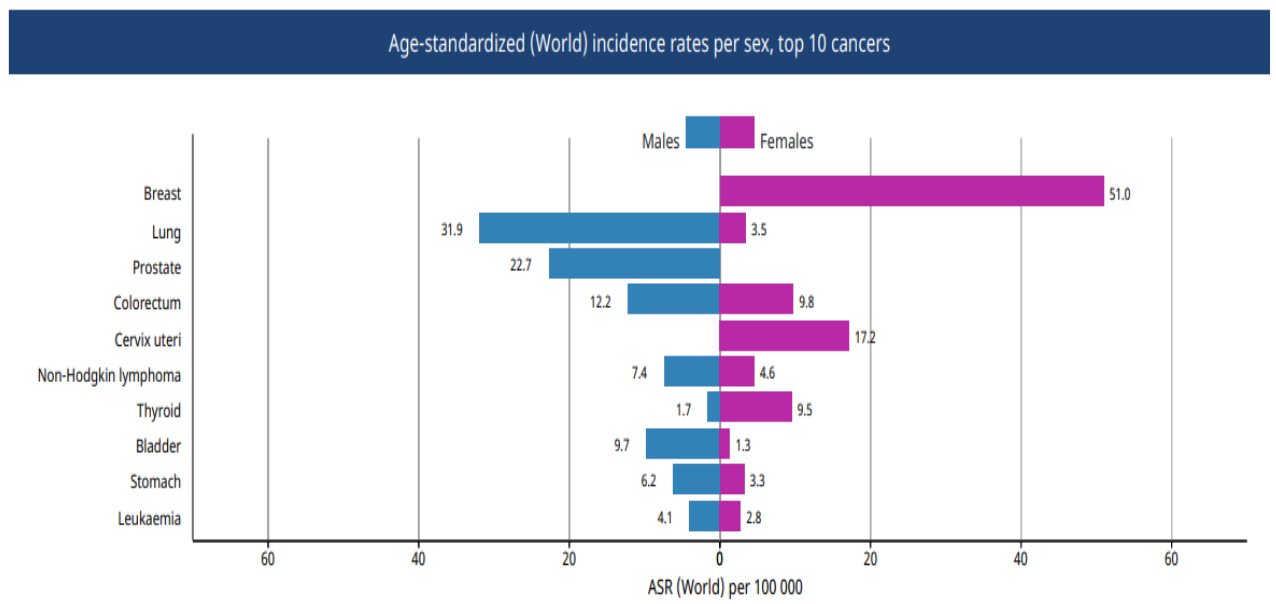
La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une maladie rare qui est peu étudiée au Maroc, pour cette raison les informations sur son incidence et sa prévalence sont assez rares.

Au Maroc, le registre de la région du grand Casablanca (2008–2012) et le registre de Rabat (2009–2012) ont attribué une incidence standardisée par âge de la LMC de l'ordre de 1,5.

Le registre du grand Casablanca a conféré une médiane d'âge de 67 ans, très proche de celle enregistrée par ceux des pays occidentaux dans le tableau 1. Par ailleurs, le registre de Rabat a concédé une médiane d'âge minime de 48 ans, due potentiellement à la taille d'échantillon réduite.



L'organisation mondiale de la santé (OMS) a classé la leucémie parmi les dix premiers cancers dont le taux d'incidence standardisé par âge est le plus élevé parmi trente-cinq autres cancers au Maroc (Figure 4).



**Figure 4 :** Taux d'incidence des dix premiers cancers au Maroc standardisé par âge et par sexe selon GLOBOCAN 2018<sup>1</sup>(Registry 2020).

Registre	Durée d'observation	Nombre de patients	Médiane d'âge	Incidence brute	Incidence standardisée par l'âge
USA (SEER)	1975–2009	13.869	66	–	1,75
USA (SEER)	2010–2017	–		–	1,9
NW France	1985–2006	906	56	–	0,8
Europe (Project RARECARE)	1995–2002	1047	–	1,2	–
Taiwan	1997–2007	2672	–	0,7	–
Sw. CML registre	2002–2010	779	60	0,9	–
<b>Maroc, Casablanca</b>	<b>2008–2012</b>	<b>326</b>	<b>67</b>	<b>1,6</b>	<b>1,5</b>
<b>Maroc, Rabat</b>	<b>2009–2012</b>	<b>52</b>	<b>48</b>	<b>1,89</b>	<b>1,5</b>
EUTOS	2008–2012	2887	59	0,99	0,96

**Tableau 1 :** Incidence de la LMC selon dix différents registres et/ou enquêtes de population.

## IV. Facteurs étiologiques

Des facteurs génétiques ou environnementaux spécifiques peuvent entraîner la fusion de points de cassure du chromosome 9 dans le gène ABL avec certains points de cassure du chromosome 22 dans le gène BCR [27].

Aucune preuve de prédisposition génétique chez des personnes individuelles n'a été prouvée [27], et les rapports de cas de LMC familiaux sont rares [28]. Un indice de masse corporelle élevé a été identifié comme un facteur de risque possible de la LMC [27].

Une association entre l'exposition chimique au benzène, aux solvants organiques, aux agents alkylants, aux inhibiteurs de la topoisomérase II ou à d'autres agents chimiothérapeutiques, et l'apparition de LMC a été démontrée à plusieurs reprises.

Une incidence accrue de LMC a été observée chez les travailleurs exposés au benzène ou à des solvants contenant du benzène [29]. Le benzène n'est pas considéré comme génotoxique, mais ses principaux métabolites hépatiques, notamment le phénol, l'hydroxyquinone et le 1,2,4-benzènetriol, ainsi que leurs produits métaboliques (par exemple, la 1,4-benzoquinone et la semiquinone) sont considérés comme induisant des dommages à l'ADN dans les cellules de la moelle osseuse, tout comme les agents alkylants et les inhibiteurs de la topoisomérase [30].

En addition aux expositions chimiques, les effets leucémogènes d'une exposition aiguë à de fortes doses de rayonnements ionisants ont été identifiés par l'Atomic Bomb Casualty Commission au Japon après la Seconde Guerre mondiale dans le cadre d'études épidémiologiques approfondies [31].

L'incidence de la LMC était plus élevée chez les survivants des bombes atomiques d'Hiroshima et de Nagasaki [32]. De même, l'incidence de la LMC chez les travailleurs du nettoyage de Tchernobyl a augmenté au cours des 20 dernières années après l'accident de la centrale nucléaire de Tchernobyl [33].

Aux États-Unis, la LMC représente environ 17 % des nouveaux cas de leucémie potentiellement radio-induites par an [27]. La plausibilité biologique a renforcé les preuves épidémiologiques convaincantes de la LMC radio-induite par des cultures de cellules hématopoïétiques : l'oncogène BCR-ABL pourrait résulter d'une irradiation par rayons X ou gamma à forte dose et de la transcription subséquente du message BCR-ABL dans ces cellules. L'exposition à de fortes doses de radiations peut générer directement des gènes de fusion spécifiques à la leucémie [34].

## V. Physiopathologie

### 1. Rappel sur l'hématopoïèse

L'hématopoïèse est le processus continu de formation et de renouvellement des cellules sanguines qui permet de répondre aux besoins quotidiens et aux besoins accrus, par exemple en cas de blessure ou d'infection. Un adulte moyen produit environ un trillion de cellules sanguines chaque jour, dont 200 milliards d'érythrocytes et 70 milliards de neutrophiles. Le maintien de l'hématopoïèse est régulé par des mécanismes à la fois stochastiques et instructifs [35].

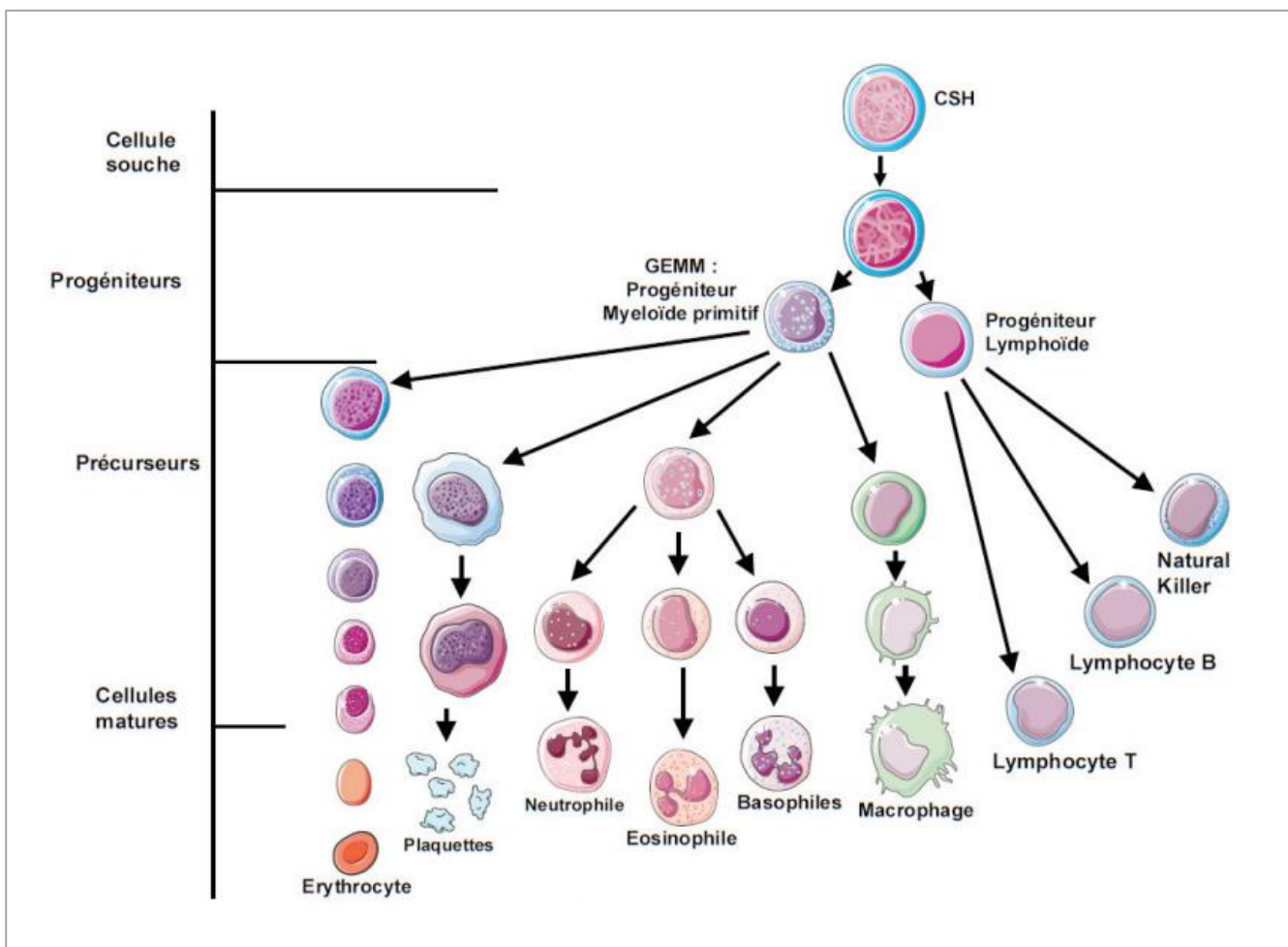


Figure 5 : Schéma simplifié de l'hématopoïèse.

La cellule souche hématopoïétique (CSH) se situe au sommet de l'hématopoïèse et se définit par deux caractéristiques fondamentales : la capacité d'auto-renouvellement, un événement de division qui donne naissance à deux CSH, et la capacité de différenciation multipotente en toutes les lignées sanguines matures, c'est-à-dire les érythrocytes, les plaquettes, les lymphocytes, les monocytes/macrophages et les granulocytes [35].

La LMC est le résultat d'une prolifération monoclonale issu d'une mutation sur une cellule souche hématopoïétique pluripotente. Toutes les lignées cellulaires peuvent donc être atteintes, avec une ampleur variable.

Cette hémopathie maligne est un des syndromes myéloprolifératifs qui est le plus typique car il porte un marqueur spécifique de cette maladie : le chromosome Philadelphie, qui sera donc identifié dans toutes les cellules d'origine monocyttaire, granuleuse, érythroblastique, mégacaryocytaire mais aussi lymphocytaire (B, T, NK). Il sera en revanche introuvable dans les fibroblastes et les cellules extra-hématopoïétiques [36].

## **2. Le chromosome Philadelphie**

Le chromosome Philadelphie (Ph) est la première altération génétique dont on a découvert qu'elle était associée à un cancer humain. En 1960, Nowell et Hungerford étudiaient les chromosomes de patients atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC) à l'Université de Pennsylvanie à Philadelphie (d'où le nom), et ils ont remarqué qu'un chromosome anormalement petit était invariablement présent dans les noyaux des cellules de LMC [37].

La LMC est caractérisée particulièrement par la présence de ce chromosome Philadelphie. Il résulte d'une rupture d'une partie du bras long du Chromosome 9, et une autre rupture du bras long du Chromosome 22. La cassure sur le chromosome 9 (région q34) entraîne une mutation d'Abelson le gène de la leucémie murine (ABL), tandis que la rupture sur le chromosome 22 (région q11) implique le gène de la région de regroupement des points de rupture ou Breakpoint Cluster Region (BCR).

Après cassures des Chromosomes, une translocation réciproque aura lieu entre la région du Chromosome 9 qui inclut le gène ABL et la région du chromosome 22 qui inclut le gène BCR. Cette translocation chromosomique est désignée comme  $t(9;22)(q34;q11)$ .

Par conséquent, le gène ABL se déplace vers le chromosome 22 et fusionne avec la partie restante du gène BCR, créant ainsi un chromosome 9 allongé, et un chromosome 22 qui est le chromosome Ph. La conséquence moléculaire de cette translocation est l'oncogène de fusion BCR-ABL, responsable de la leucémie, qui, à son tour se traduit en une oncoprotéine BCR-ABL [38].

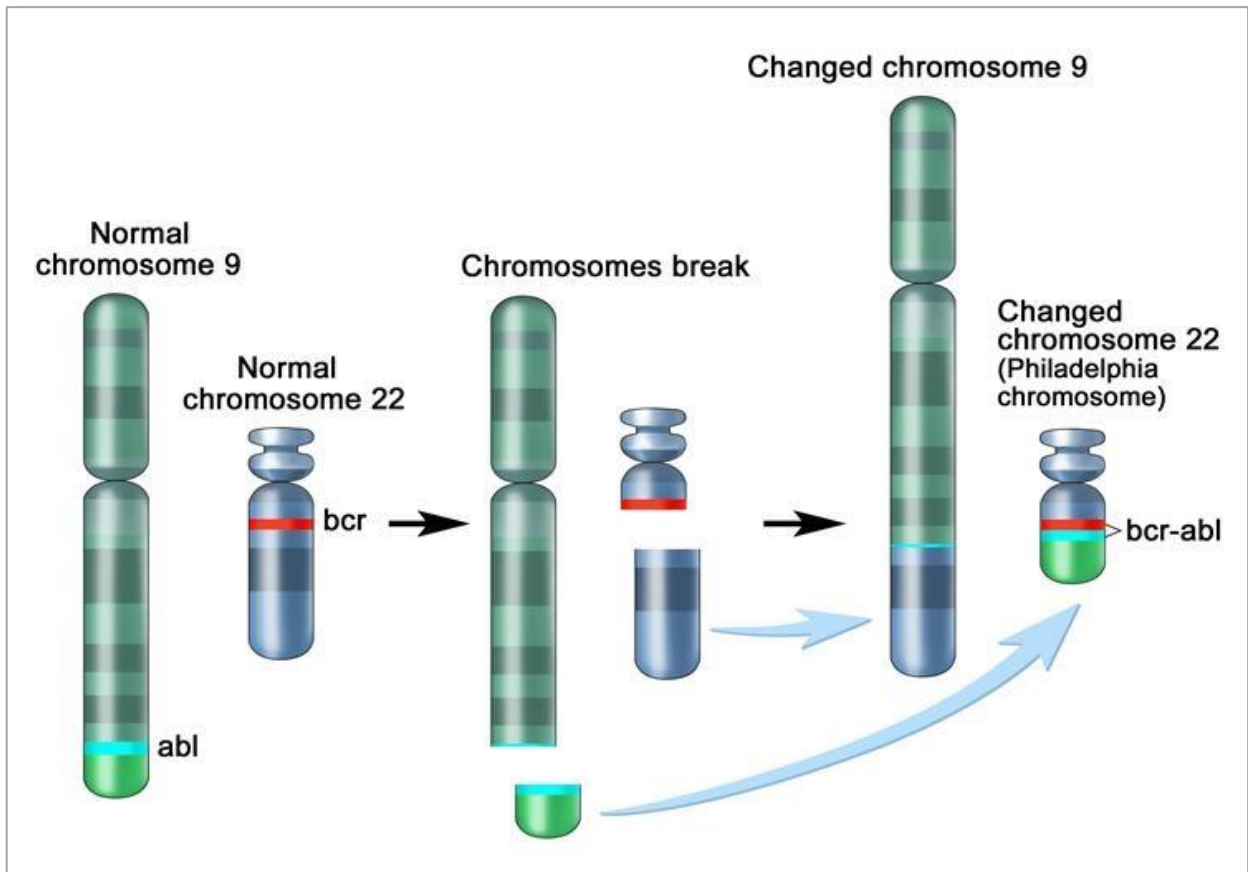


Figure 6 : Représentation schématique de la  $t(9;22)(q34;q11)$ .

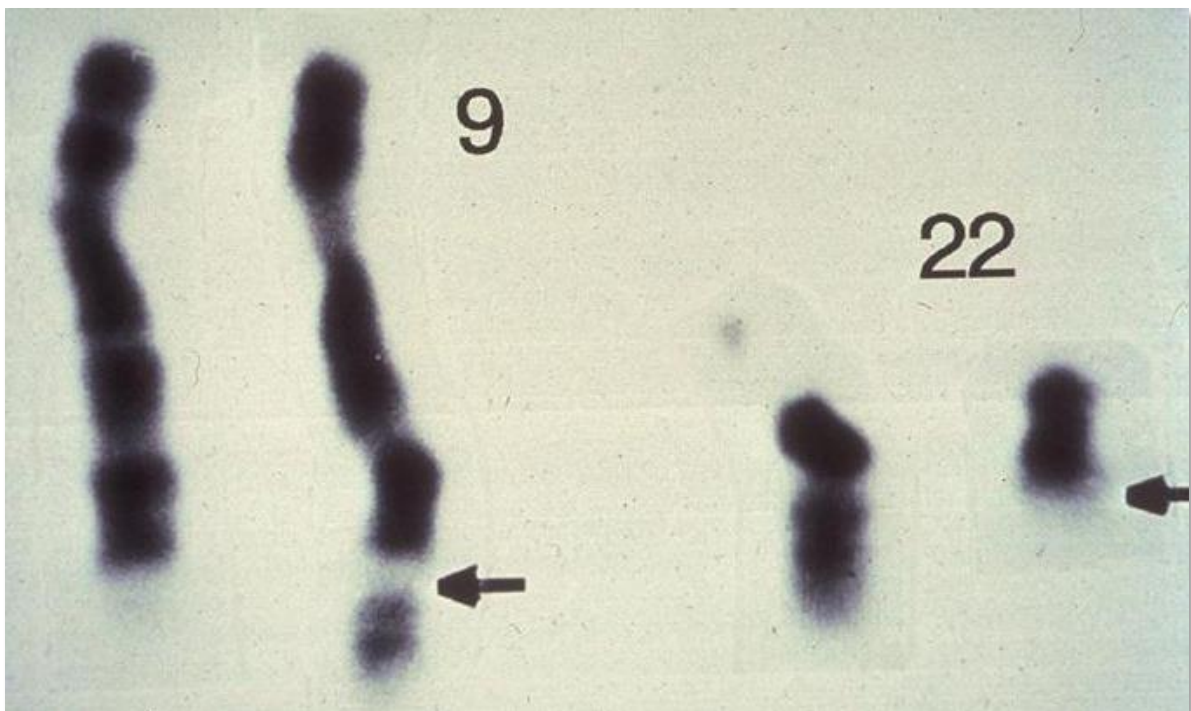


Figure 7 : Image de la translocation réciproque  $t(9;22)(q34;q11)$ .

### 3. Le gène ABL

L'oncogène d'Abelson (c-ABL) est situé sur le chromosome 9 en position 9q34. Son nom trouve son origine de son homologue viral, le gène Abelson (v-ABL), qui provoque des leucémies chez la souris.

Il existe deux variantes possibles pour le premier exon, 1a et 1b, et les ARN messagers qui en résultent ont une longueur de 6 et 7 kb, respectivement. Deux variétés de protéines d'environ 145 kDas sont synthétisées en fonction du premier exon, 1a ou 1b [39]. La protéine contenant l'exon 1b est « myristoylée » (c'est-à-dire modifiée par un groupement lipidique de type acide gras saturé sur un résidu glycine), ce qui entraîne sa localisation à la membrane plasmique. L'absence de ce résidu glycine dans la forme 1a (majoritaire) entraîne une localisation principalement nucléaire.

La structure de la protéine cellulaire Abl est hautement conservée. Comme la plupart des protéines de signalisation intracellulaire, Abl possède des domaines d'homologie SH (Src Homology) similaires à ceux de la protéine Src. Le domaine SH3 est un régulateur négatif du domaine SH2, qui à son tour est un régulateur positif du domaine SH1, qui soutient l'activité tyrosine kinase de la protéine Abl. Dans la partie C-terminale de la protéine, on trouve un signal de localisation nucléaire (NLS) et des domaines qui lui permettent de se lier aux filaments d'actine et à l'acide désoxyribonucléique (ADN) (Figure 8).



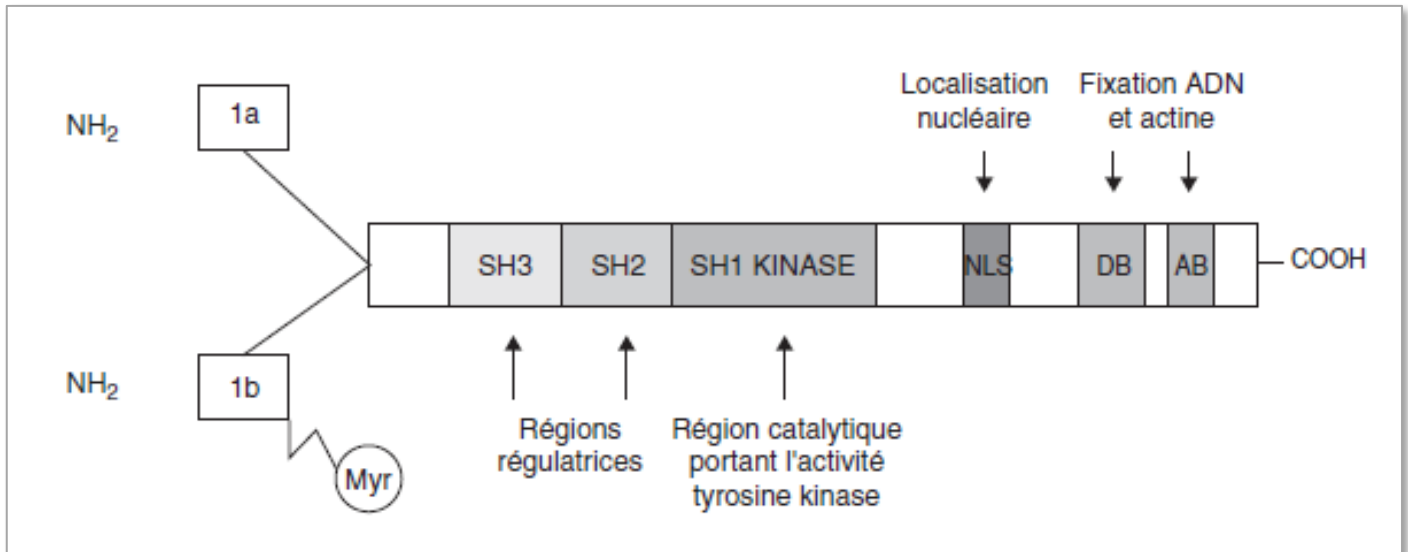


Figure 8 : Structure de la protéine Abl.

On peut noter que la protéine Abl présente une dualité structurale et fonctionnelle, avec des domaines régulateurs qui lui permettent de jouer un rôle à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme et de transiter entre les deux compartiments.

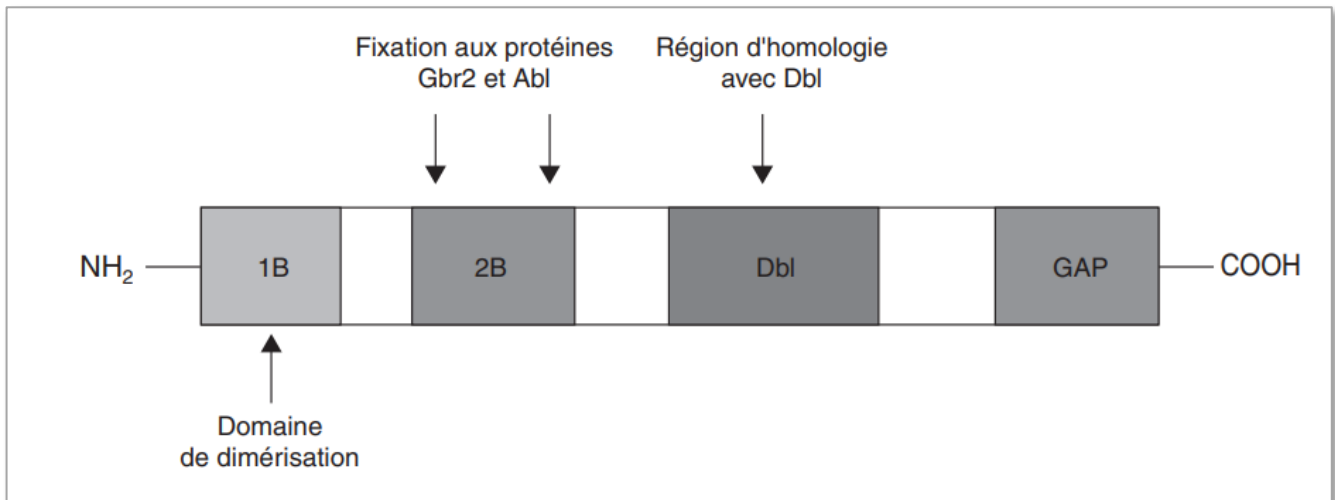
Son action dépend de sa localisation nucléaire ou cytoplasmique [40]. Dans le compartiment nucléaire, Abl agit comme un régulateur négatif du cycle cellulaire. Lorsqu'elle est localisée dans le cytoplasme, Abl joue un rôle important dans la croissance et la prolifération cellulaire, en participant à la transduction du signal initié par certains récepteurs de facteurs de croissance.

#### 4. Le gène BCR

Le gène BCR, situé sur le bras long du chromosome 22, a été découvert par clonage de la région du major-breakpoint cluster (M-BCR) où se produisent la majorité des points de cassure dans la LMC. Il s'étend sur 135 kb, comprend 23 exons et permet la transcription de deux types d'ARN messagers dont les poids moléculaires sont respectivement de 4,5 et 6,7 kb et qui codent pour une protéine de 160 kDas d'expression ubiquitaire.

Cette protéine, qui est cytoplasmique lorsque la cellule n'est pas en cycle, est exprimée de façon péri-chromosomique pendant la mitose, ce qui suggère qu'elle joue un rôle dans le cycle cellulaire [41].

La protéine Bcr est constituée de plusieurs domaines (Figure 9). Dans la partie N-terminale, le domaine 1B est une région importante puisqu'il permet la dimérisation de la protéine Bcr-Abl conduisant à l'ouverture de l'activité kinase, et le domaine 2B comprend deux sites de liaison du domaine SH2 tels que ceux portés par la protéine Abl et la protéine Grb2. La région centrale possède un domaine d'homologie avec les protéines Dbp (facteur d'échange guanosine triphosphate [GTP]/guanosine diphosphate [GDP]). La partie C-terminale de Bcr, absente dans la protéine de fusion Bcr-Abl, a une fonction GAP (GTPase activating protein) pour les protéines G de type Rac. Cette seconde partie, qui ne présente pas d'intérêt dans la protéine chimérique Bcr-Abl, joue en fait un rôle dans l'activité bactéricide des polynucléaires. Les véritables fonctions de la protéine Bcr sont cependant mal connues [2].



**Figure 9** : Structure de la protéine Bcr.

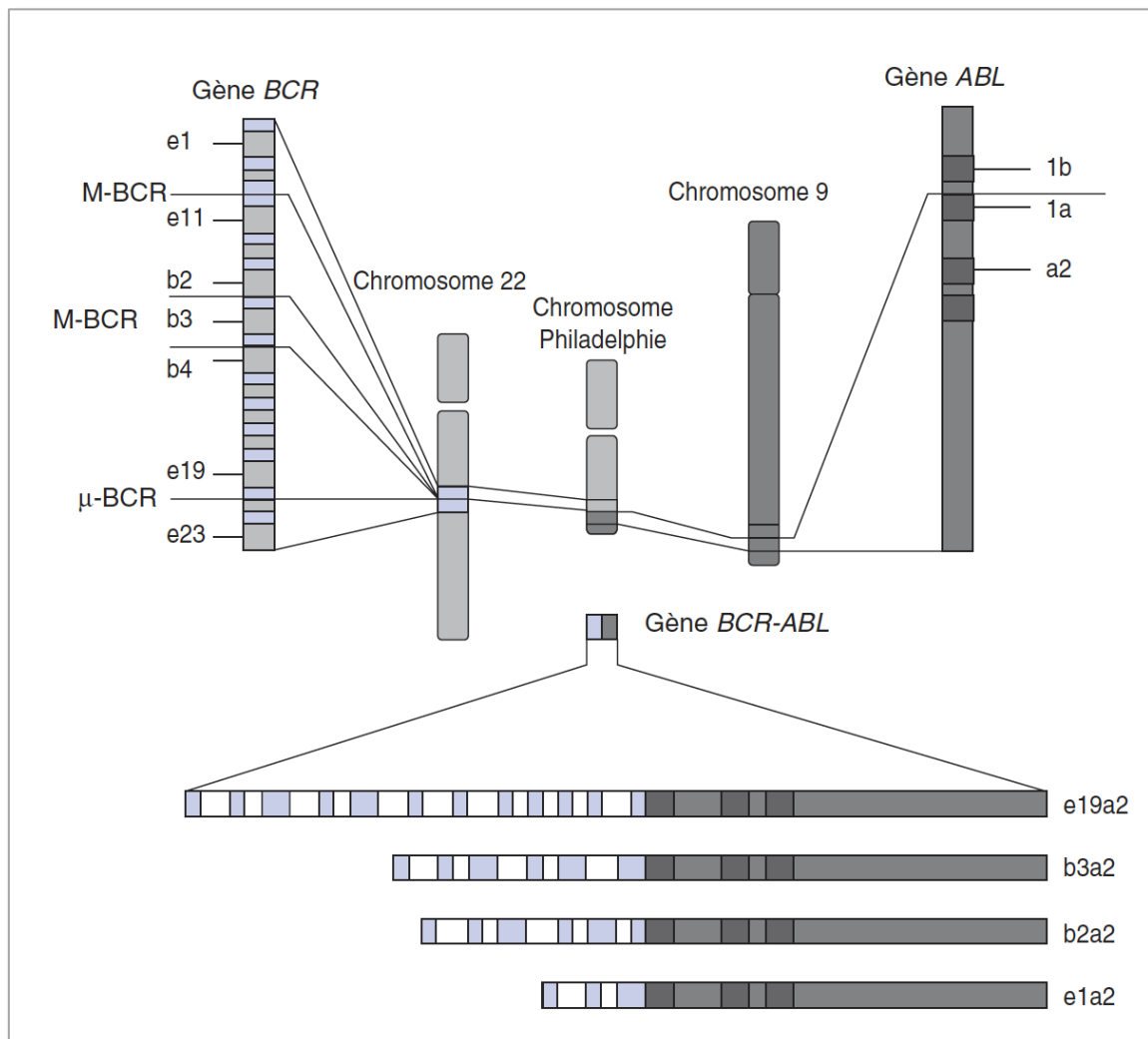
En fonction du site de cassure sur le gène BCR, la taille de la protéine de fusion qui en résulte peut varier entre 158 kb et 230 kb (figure 10). Chaque gène de fusion code pour la même portion du gène ABL mais diffère dans la longueur de la séquence du gène BCR qui reste à l'extrémité N.

Presque tous les patients atteints d'une LMC (95%) expriment une protéine de 210 kb.

En conclusion, la protéine BCR a une activité sérine/thréonine kinase localisée dans le cytoplasme, et comprend un domaine d'oligomérisation. Des mutations dans ce domaine entraînent une diminution de l'activité tyrosine kinase de la protéine BCR-ABL et permet de prévenir l'interaction entre les protéines BCR et BCR-ABL [42].

## 5. Le gène de fusion BCR-ABL et sa protéine

Les réarrangements les plus fréquemment rencontrés dans la LMC sont les produits de fusion du gène ABL cassé entre les exons 1 et 2 et du gène BCR cassé dans une région de points de cassure variables, appelée M-BCR (Major BCR). Cette région, qui correspond aux exons 12 à 16 du gène BCR, est subdivisée en cinq bandes, de b1 à b5, qui correspondent aux cinq exons impliqués (exon 12 = b1, exon 13 = b2..., exon 16 = b5). La coupure dans cette région se produit préférentiellement entre les exons b2 et b3 ou b3 et b4 (Figure 10). Ainsi, les produits de fusion b2a2 et b3a2 sont formés, respectivement [43].



**Figure 10** : Chromosomes 9 et 22, gènes BCR, ABL et BCR-ABL avec les différents sous-types d'acide ribonucléique (ARN) transcrits en fonction des points de cassure.

Les ARN messagers résultants codent tous deux pour une protéine chimérique de 210 kDas. Cependant, la protéine codée par le variant b3a2 est plus fréquente et comprend 25 acides aminés de plus que celle du variant b2a2.

Il existe d'autres variants de la translocation t(9;22) qui sont responsables de phénotypes leucémiques différents dans la majorité des cas. On peut citer la fusion e1a2, qui résulte d'une rupture dans la m-BCR (minor BCR), c'est-à-dire entre les exons 1 et 2 du BCR. Elle produit une protéine chimérique de 190 kDas dont l'activité tyrosine kinase est plus intense que celle de la protéine de 210 kDas. Ce variant moléculaire se retrouve principalement dans la leucémie lymphoblastique aiguë à chromosome Philadelphie. Un autre variant, dont le gène BCR est interrompu au niveau du  $\mu$ -BCR (micro-BCR), entre les exons 19 et 20, permet la synthèse d'une protéine chimérique de 230 kDas. Cette dernière forme moléculaire correspondrait à des hémopathies lentement progressives marquées par une hyperleucocytose neutrophile modérée, associée ou non à une thrombocytose [44].

La protéine Bcr-Abl de 210 kDas comprend les trois domaines SH1, SH2, SH3 et tous les autres domaines d'Abl. Du côté de Bcr, le motif de dimérisation est la partie la plus importante. Cette partie de Bcr conduit à la dimérisation de la protéine Bcr-Abl et à son auto-activation par transphosphorylation. De plus, la perte de la partie N-terminale d'Abl supprime son auto-inhibition. Ces deux modifications de la protéine expliquent l'activation tyrosine kinase permanente de Bcr-Abl. La protéine tyrosine kinase Abl physiologique est autorégulée de manière physique, c'est-à-dire par modification conformationnelle. Sa fusion avec Bcr modifie cette auto-inhibition et active la kinase de façon permanente [42].

## **6. Conséquences cellulaires**

### **Voies de signalisation intracellulaire conduisant à la leucémogénèse**

La phosphorylation d'un très grand nombre de substrats est responsable des propriétés de la cellule leucémique, ce qui la distingue d'une cellule normale. En effet, l'auto-activation et la perte de régulation de l'activité tyrosine kinase conduit à l'activation et au recrutement direct ou indirect de voies de signalisation impliquées dans les processus de prolifération, d'apoptose, de différenciation et d'adhésion cellulaire.

### **Altérations des propriétés d'adhésion induites par la protéine Bcr-Abl dérégulée**

Les cellules tumorales immatures présentent une adhésion réduite au stroma de la moelle et à la matrice extracellulaire [45]. L'adhésion cellulaire est médiée par différentes familles de molécules telles que les intégrines. L'expression de ces molécules d'adhésion n'est pas altérée mais leur fonction et le signal qu'elles induisent sont dérégulés. Ainsi, la phosphorylation par Bcr-Abl de protéines telles que Crkl, paxilline ou talline, jouerait un rôle important dans cette dérégulation (Figure 11) [46].

### **Activation de signaux mitotiques**

L'autophosphorylation du résidu tyrosine 177 de la protéine Bcr-Abl permet la fixation de la protéine Grb-2 qui, liée à Sos, stabilise la forme activée de Ras. Cependant, deux autres protéines, substrats de Bcr-Abl, peuvent aussi activer Ras : Shc se liant à SH2 et Crkl se liant à SH3. Ras activée peut, via les protéines Raf, Mek et Erf, activer à son tour d'autres gènes induisant un signal prolifératif [47].

Une autre voie, celle de Jak Kinase, joue aussi un rôle important. En effet, Bcr-Abl peut activer, via Grb-2, les protéines STAT sans passer par la phosphorylation des

Jak kinases. De même, la voie des PI3 kinases peut, aussi, être activée via Grb2, induisant un signal prolifératif et antiapoptotique via Akt (Figure 11) [48].

**Inhibition de l'apoptose**

Bcr-Abl bloque la libération de cytochrome C par les mitochondries, ce qui induit l'inactivation de la voie des caspases. Cet effet est dû en partie à la phosphorylation de la protéine proapoptotique Bad ou à l'hyperexpression de la protéine antiapoptotique Bcl-2 via des voies de signalisation de Ras ou de PI3 kinase-dépendantes (Figure 11). D'autres partenaires moléculaires, tels que les protéines STAT ou la voie NFkB, sont impliqués dans l'inhibition de l'apoptose induite par BCR-ABL [49].

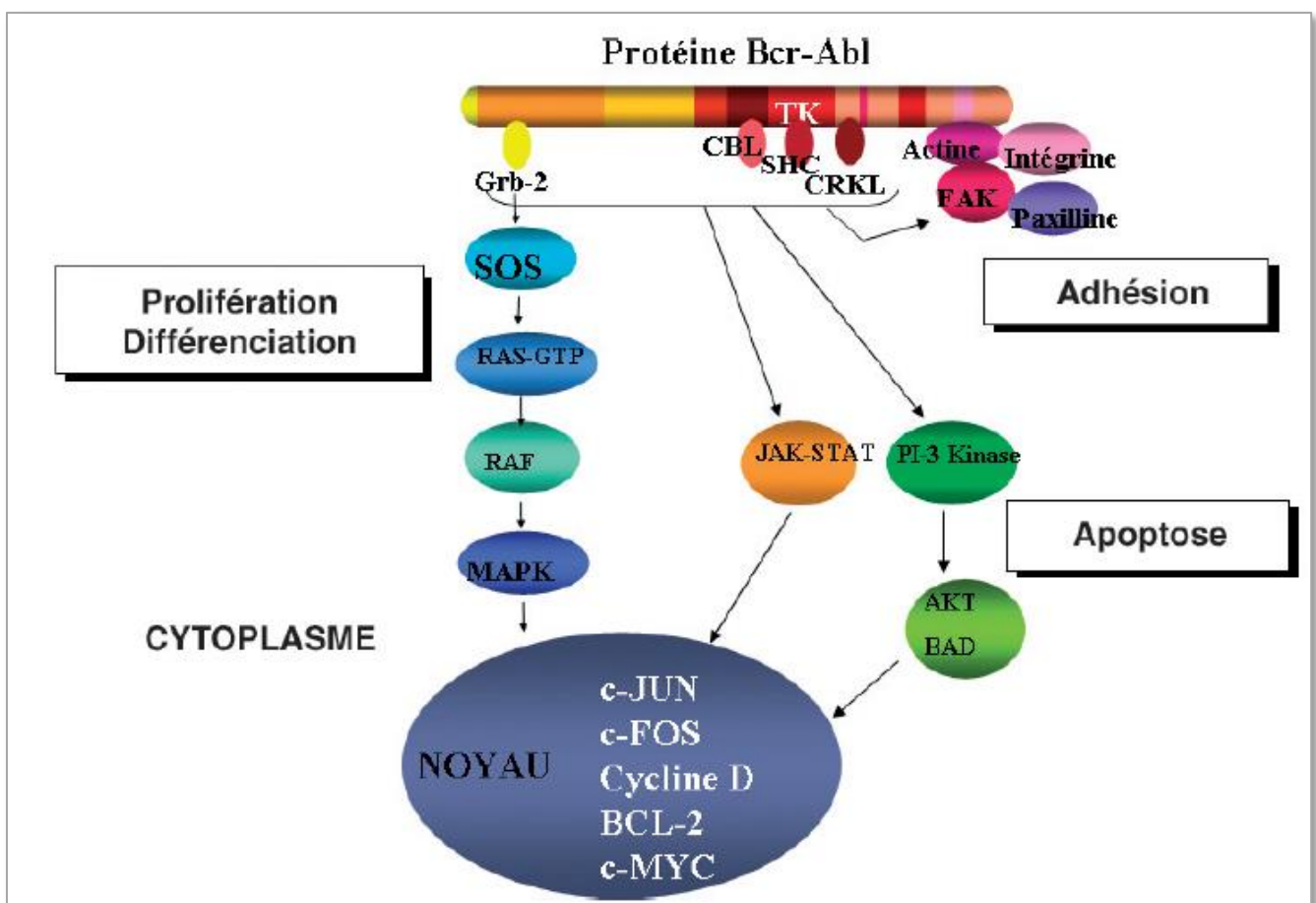


Figure 11 : Activation de différentes voies de signalisation par la protéine Bcr-Abl.

### Dégradation de protéines par le protéasome

La protéine Bcr-Abl, comme la protéine Abl, induit la dégradation par le protéasome des protéines Abi-1 et Abi-2, inhibiteurs physiologiques de l'activité kinase d'Abl, et induit également la dégradation de protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, ce qui pourrait expliquer en partie l'instabilité génétique des cellules leucémiques BCR-ABL positives [50].

### Instabilité génomique ou génétique

Cette instabilité génétique est illustrée par l'évolution de la maladie vers la crise blastique. Elle peut être démontrée par les expériences suivantes : la méthode des microsatellites et l'étude de la perte d'hétérozygotie. Les microsatellites sont des séquences d'ADN contenant un nombre variable de répétitions de bases nucléiques en tandem (VNTR). Comme ces séquences sont non codantes, elles sont affectées en permanence par les mutations induites par l'instabilité génétique et en sont donc le miroir direct [51]. La perte d'hétérozygotie reflète également cette instabilité. En effet, tout gène muté sur un seul de ses allèles peut être désactivé, de sorte qu'il n'est plus transcrit. Dans ce cas, toute la transcription et donc toute la traduction des protéines provient d'un seul allèle, ce qui définit la perte d'hétérozygotie. Dans la LMC, cette instabilité génétique est détectée et devient plus apparente lors du passage de la phase chronique vers les phases accélérée et blastique de la maladie [52].

La responsabilité directe de Bcr-Abl n'a pas été entièrement démontrée. Cependant, une activité mutationnelle plus intense a été récemment démontrée lors d'apparition de résistances à l'imatinib mésylate due à des mutations dans le domaine tyrosine kinase. Enfin, de nombreuses protéines oncogènes peuvent coopérer avec Bcr-Abl et participer à la progression de la maladie, par exemple les kinases Src, qui semblent jouer un rôle important dans la transformation lymphoblastique. Autre



exemple, le gène Evi-1 a été trouvé dans des crises blastiques avec dysmégacaryopoïèse. De même, des mutations rares du gène Ras ont été rapportées, corrélées à une crise blastique et à l'apparition d'une atteinte extramédullaire. L'amplification du gène c-myc ou du gène BCR-ABL lui-même est aussi parfois retrouvée dans les stades avancés de la maladie [53].

Les gènes suppresseurs de tumeurs, tels que p16 et Rb (gène du rétinoblastome), sont parfois inactivés lors des crises lymphoblastiques ou mégacaryocytaires respectivement. Des anomalies du gène p53 ont été détectées à des stades avancés de la maladie [54].

La translocation t(9;22) conduit à la synthèse d'une protéine à activité tyrosine kinase accrue, induit une augmentation de la survie cellulaire par inhibition de l'apoptose et de la prolifération cellulaire avec maintien de la différenciation. Cependant, l'instabilité génomique observée, probablement responsable de l'apparition d'anomalies cytogénétiques supplémentaires et de l'activation de divers gènes dont la coopération avec Bcr-Abl est essentielle, explique le passage de la maladie à une phase plus avancée.

## **VI. Phases de la LMC**

L'histoire naturelle de la LMC comprend trois phases évolutives : une première phase dite « chronique », paucisymptomatique, suivie d'une deuxième phase dite « accélérée », caractérisée par une accélération de la maladie, et enfin une troisième phase, dite « blastique » prenant la forme d'une leucémie aiguë secondaire, résistante ou réfractaire au traitement, conduisant au décès du patient.

On passe donc progressivement d'une hyperproduction chronique de divers éléments matures à une prolifération rapide de cellules immatures (arrêt de la différenciation et développement fulgurant d'un ou plusieurs sous-clones). Cette évolution s'explique en partie par la physiopathologie de la maladie décrite précédemment. La phase chronique peut parfois passer inaperçue et les patients se présentent directement en phase accélérée ou blastique [2].

Le diagnostic de la maladie s'effectue dans la majorité des cas au moment de la phase chronique. En l'absence de traitement, la LMC est mortelle, avec une évolution en 3 à 5 ans. Dans de rares cas, la maladie sera diagnostiquée en phase accélérée voire blastique, où les manifestations cliniques et biologiques de la pathologie seront plus marquées et dont le délai de prise en charge devra être plus rapide.

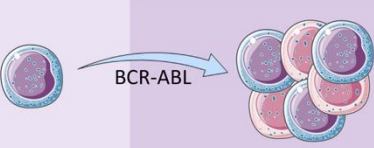
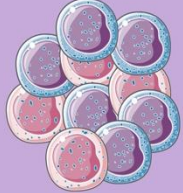

	Chronic Phase	Accelerated Phase	Blast Crisis
Median duration without treatment	5 – 6 years	6 – 9 months	3 – 6 months
	 <p>Expansion of myeloid compartment</p>	 <p>New cytogenetic abnormalities</p>	 <p>Increased genomic instability</p>
Blasts	10 – 15%	>15% <30%	>30%
Symptoms	Asymptomatic	Increased tiredness Weight loss Enlarged spleen	Increased blast cells in bone marrow & blood Extramedullary disease

Figure 12 : Progression de la LMC.

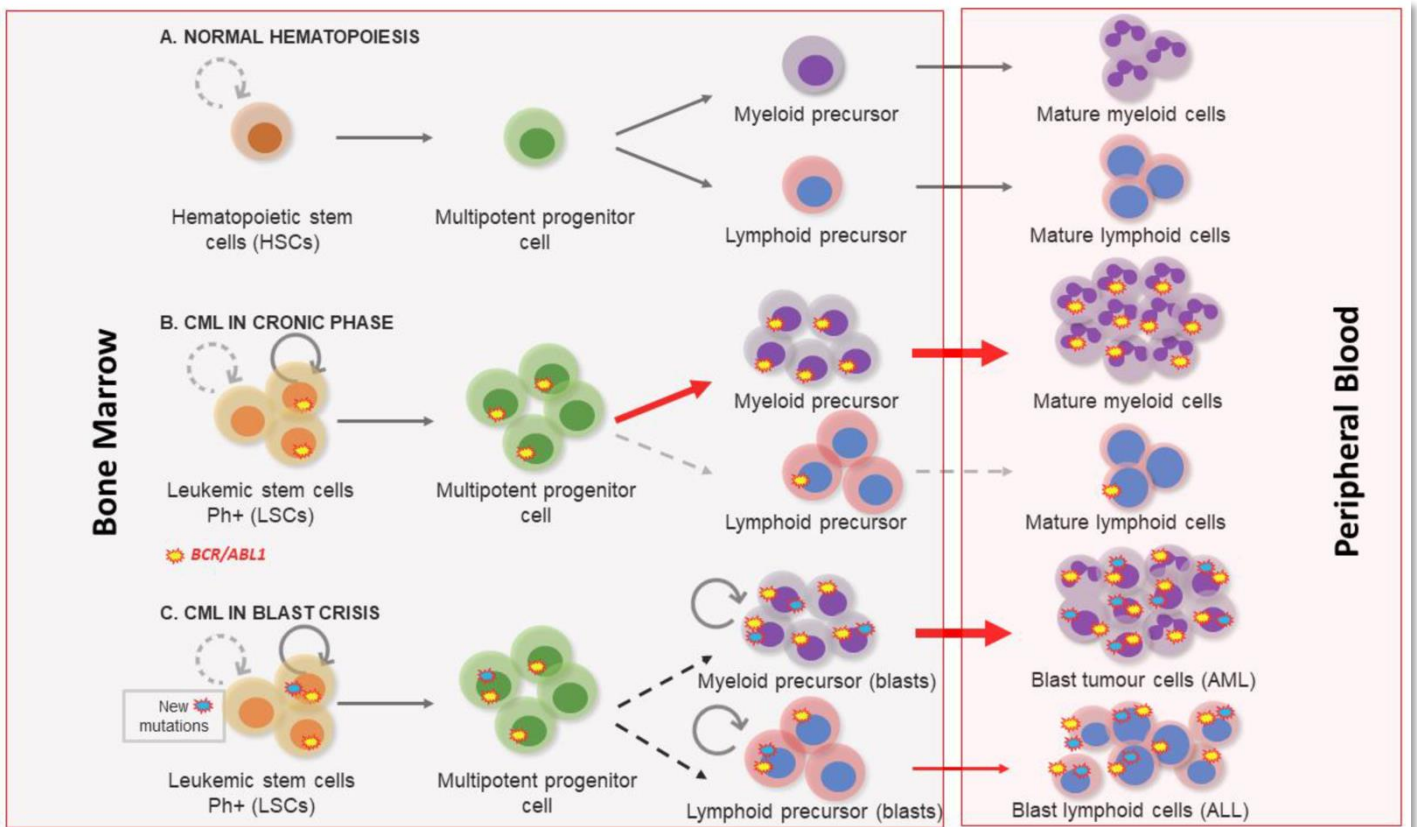


Figure 13 : Phases de la LMC.

## **1. Phase chronique**

Cette phase initiale est progressive et dure en moyenne 4 à 5 ans. Les signes cliniques sont souvent insidieux et de nombreux patients sont asymptomatiques au moment du diagnostic, qui est suspecté sur la base d'un hémogramme de routine (40% des cas).

Cependant, trois principaux syndromes peuvent être rencontrés :

- Une altération de l'état général, liée à un hypermétabolisme, associant asthénie, amaigrissement et plus rarement fièvre et sueurs.
- Un syndrome tumoral, largement caractérisé par une splénomégalie (50%), parfois responsable d'une symptomatologie digestive.
- Des signes de leucostase, avec notamment un priapisme, sont aujourd'hui tout à fait exceptionnel.

## **2. Phase accélérée**

La plupart des patients évoluent en phase accélérée avant la phase blastique. Dans la phase accélérée, les patients peuvent présenter une aggravation de l'anémie, une splénomégalie et une augmentation du nombre de globules blancs. Le nombre de blastes dans le sang et la moelle osseuse commence généralement à augmenter (10 à 19 % des blastes dans le sang ou la moelle osseuse).

Dans cette phase, il y a généralement une accumulation d'aberrations chromosomiques, en plus du chromosome Ph. Le traitement médicamenteux devient généralement moins efficace à ce stade.

### **3. Phase blastique**

C'est la phase finale de l'évolution de la LMC, avec une progression rapide et courte survie. La phase blastique se présente comme une leucémie aiguë, le nombre de blastes montre une augmentation spectaculaire de la moelle et du sang avec une perte de la capacité de différenciation, qui se traduit par le nombre très faible de globules rouges, de plaquettes et de neutrophiles. Les patients peuvent connaître des épisodes d'hémorragie et d'infection.

Elle survient avec un délai médian de 4 ans et est définie par la présence de plus de 20% de blastes dans la moelle osseuse ou de plus de 30% de blastes et de promyélocytes dans le sang ou la moelle. Elle s'accompagne généralement d'une augmentation des signes cliniques d'accélération (détérioration de l'état général, splénomégalie, anémie, thrombocytopénie, fibrose médullaire) et parfois d'une symptomatologie propre : fièvre, hépatomégalie, adénopathie et douleurs osseuses.

Comme toute leucémie aiguë, elle peut s'accompagner d'un syndrome tumoral et de signes d'insuffisance médullaire. Des localisations blastiques extramédullaires peuvent également être observées, notamment [2].

<b>Phase chronique</b>	Blastes sanguins et médullaires < 15 %, blastes + promyélocytes sanguins et médullaires < 30 %, basophiles sanguins < 20 %. Plaquettes $\geq$ 100 000/m <sup>3</sup> .
<b>Phase accélérée</b>	Blastes sanguins ou médullaires entre 15 % et 29 %, ou blastes + promyélocytes sanguins ou médullaires > 30 % et Blastes < 30 %, basophiles sanguin $\geq$ 20 %. Taux de plaquettes < 100 000/m <sup>3</sup> (sans relation avec un traitement).
<b>Phase blastique</b>	Blastes sanguins ou médullaires $\geq$ 20 %. Atteinte blastique extrahématopoïétique.

Tableau 2 : Définition des phases de la LMC selon l'European LeukemiaNet, 2013.

## VII. Classification

La classification des leucémies remonte à la fin des années 1970 avec la publication de la classification franco-américaine et britannique (FAB) qui décrit 3 formes développées à partir du tissu lymphoïde et 7 puis 8 formes à partir du tissu myéloïde. Cette classification a été très largement utilisée dans le monde jusqu'en 2000.

Depuis lors, le développement rapide des techniques de cytométrie en flux, de culture cellulaire, de cytogénétique et de biologie moléculaire ont conduit à l'affinement de cette classification par la consolidation de certaines entités et l'individualisation de nouvelles entités. L'OMS a ainsi publié une nouvelle classification internationale en 2000, modifiée en 2008 puis en 2016.

L'édition 2016 de la classification de l'organisation mondiale de la santé (OMS) des tumeurs des tissus hématopoïétiques et lymphoïdes, représente la dernière mise à jour de la classification des hémopathies malignes [55].

Depuis lors, les progrès sont nombreux dans l'identification de biomarqueurs uniques associés à quelques néoplasmes myéloïdes des leucémies, qui sont largement dérivées de l'analyse de l'expression des gènes et du séquençage haut débit ce qui peut améliorer considérablement les critères de diagnostic ainsi que la pertinence du pronostic. Les nouvelles données cliniques, morphologiques, immunophénotypiques, et génétiques sont des entités actuellement incluses dans la classification de l'OMS de 2016 et reflètent un consensus de l'avis des hématopathologistes, des hématologues, des oncologues et des généticiens.

<b>Néoplasmes myéloprolifératifs (NMP)</b>
Leucémie myéloïde chronique (LMC), BCR-ABL1 +
Leucémie neutrophile chronique (LCN)
Polycythemiavera (PV)
Myélofibrose primaire (MFP), stade précoce/préfibrotique
MFP, stade fibrotique déclaré
Thrombocytémie essentielle (ET)
Leucémie éosinophile chronique (LEC), NSA
Néoplasme myéloprolifératif (MPN), inclassable
<u>MPNs : Néoplasmes myéloprolifératifs,</u> <u>BCR-ABL : break-point cluster region-Abelson,</u> <u>NSA : non spécifié ailleurs</u>

**Tableau 3** : Classification OMS des Néoplasmes myéloprolifératifs.



## **VIII. Diagnostic positif**

L'évolution clinique naturelle de la LMC non traitée comprend deux ou trois phases : la phase chronique (PC) et la phase blastique (PB ; également appelée crise blastique) qui sont généralement, mais pas toujours, séparées par une phase accélérée (PA ; parfois également appelée phase aiguë en raison de sa ressemblance avec la leucémie aiguë). La plupart des patients sont diagnostiqués en PC qui a généralement un début insidieux. Près de 50 % des cas de LMC-PC nouvellement diagnostiqués sont asymptomatiques et sont découverts de manière fortuite par une numération anormalement élevée de globules blancs lors d'une analyse sanguine de routine et/ou par une splénomégalie lors d'un examen physique.

### **1. Diagnostic clinique**

Les symptômes les plus courants sont une asthénie non spécifique, des malaises, des sueurs nocturnes et une perte de poids, qui peuvent survenir longtemps après le début de la maladie. Une diminution de la tolérance à l'effort peut apparaître au cours de la PC après plusieurs mois.

De nombreux patients présentent des symptômes liés à l'hypertrophie de la rate, la moitié des patients environ présentent une splénomégalie palpable. L'hypertrophie de la rate peut empiéter sur l'estomac et provoquer une satiété précoce et une diminution de la prise alimentaire, entraînant une perte de poids. L'infarctus de la rate peut se manifester par une douleur " saisissante " dans le quadrant supérieur gauche de l'abdomen. La splénomégalie peut également être associée à un état hypermétabolique se manifestant par des fébricules, une transpiration excessive et une fatigue chronique.

Une hépatomégalie, généralement asymptomatique, peut également se produire, mais elle est moins fréquente. Elle résulte généralement de l'hématopoïèse extramédullaire qui se produit dans la rate.

Des anomalies de la vision, des crises d'épilepsie, des infarctus cérébraux ou myocardiques et un priapisme peuvent survenir chez les patients présentant un taux de globules blancs extrêmement élevé (plus de 300 000 cellules/mL), en tant que manifestations de la leucostase (agglutination anormale des globules blancs) et de l'hyperviscosité. La rétine peut présenter un œdème papillaire, une obstruction veineuse et des hémorragies à l'examen du fond de l'œil.

En l'absence de traitement, la LMC en phase chronique évolue inévitablement vers une crise blastique (via la PA ou sans celle-ci) dans les 3 à 5 ans. Environ 5 % des patients sont diagnostiqués en PA ou PB (sans PC reconnue).

Les saignements, les pétéchies et les ecchymoses sont souvent des symptômes importants de la LMC en PA. La fièvre est généralement associée à des infections. Des douleurs osseuses, une rate très volumineuse et/ou une fibrose accrue de la moelle osseuse sont des signes avant-coureurs courants de la phase blastique.

Les symptômes typiques de la crise blastique sont dus à une anémie croissante, à une thrombocytopénie, à une basophilie, à une hypertrophie rapide de la rate et à l'échec des médicaments habituels pour contrôler la leucocytose et la splénomégalie [56].

## **2. Diagnostic hématologique et biologique**

### **2.1 Hémogramme**

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

Le principal résultat initial de l'analyse sanguine est une leucocytose neutrophile, avec une numération leucocytaire dépassant couramment 30 000 cellules/ml au moment du diagnostic.

Une éosinophilie et une basophilie légères sont souvent déjà présentes dans la PC et augmentent avec la progression de la maladie vers les phases avancées. La myélémie est constante et harmonieuse, sans hiatus de différenciation, et la blastose est faible lors de la phase chronique (< 5 %).

Une augmentation des taux de plaquettes (thrombocytose) est fréquente au moment du diagnostic, les numérations pouvant dépasser 1 000 000 de cellules/ml. La thrombocytopénie est peu fréquente dans la PC. L'anémie (normocytaire et normochrome) est peu courante et modérée [56].

### **2.2 Myélogramme**

Il montre une moelle d'une richesse cellulaire accrue, avec une hyperplasie granulaire marquée et une blastose médullaire de moins de 10% en phase chronique. On peut retrouver une basophilie, voire une éosinophilie, comme dans le sang. Les mégacaryocytes sont souvent augmentés en nombre et de petite taille. Le myélogramme n'est pas nécessaire pour le diagnostic de la LMC, mais il peut être utilisé pour confirmer la phase de la maladie et pour réaliser le caryotype initial [2].

### 2.3 Biopsie ostéomédullaire

Elle n'est pas nécessaire au diagnostic de LMC, mais elle affirme le diagnostic de syndrome myéloprolifératif, caractérisé par une hyperplasie du tissu hématopoïétique et de la lignée myéloïde en particulier, remplissant tous les espaces de la moelle, avec disparition des adipocytes. Une discrète fibrose de la réticuline peut être observée, mais rarement au moment du diagnostic. L'apparition de la fibrose est un des signes d'accélération de la maladie [2].

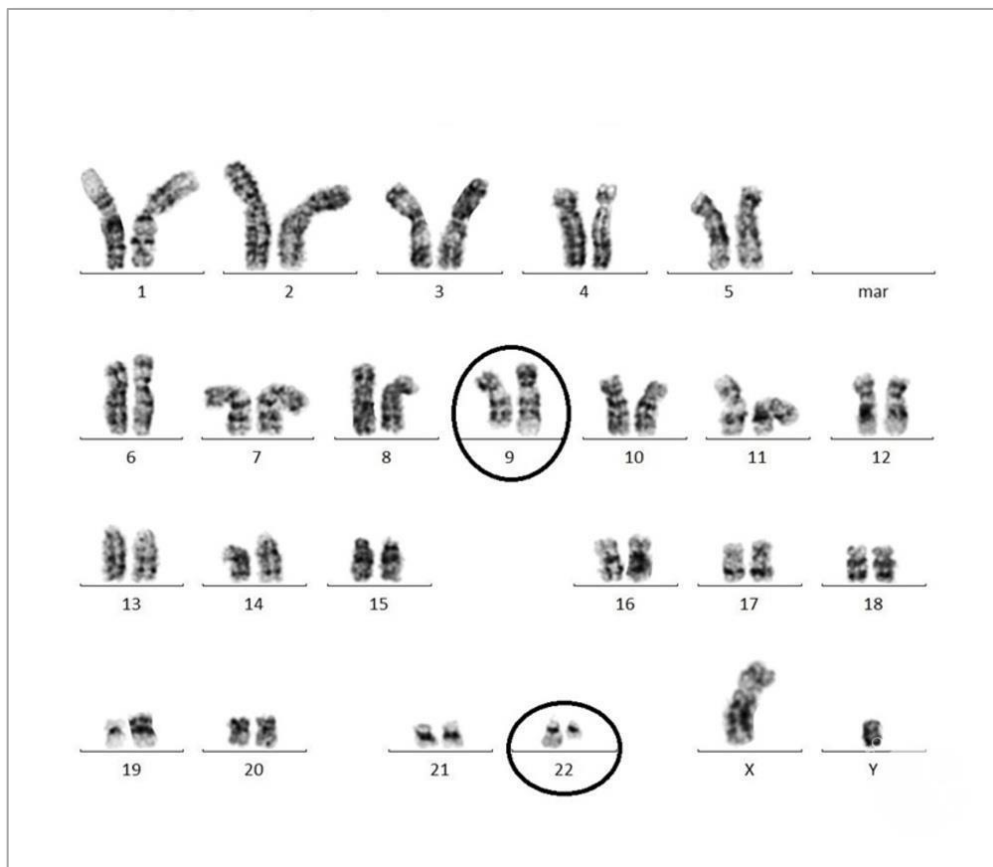
### 2.4 Autres examens biologiques

Parmi les autres anomalies biologiques, citons l'hyperuricémie qui reflète un renouvellement élevé des cellules de la moelle osseuse, ainsi qu'une protéine sérique de liaison à la vitamine B-12 nettement élevée, corrélée au degré de leucocytose (cette protéine est synthétisée par les granulocytes) [56].

### 3. Diagnostic cytogénétique et moléculaire

#### 3.1 Caryotype

Le caryotype reste l'examen de référence et est indispensable pour le diagnostic et le suivi des patients. Il est réalisé à partir d'un échantillon de moelle osseuse (généralement le même échantillon que pour le myélogramme). Les cellules sont ensuite mises en culture et bloquées à un stade précis de la division cellulaire (métaphase), ce qui permet de visualiser les chromosomes (figure 14). Le test standard nécessite l'analyse d'au moins 30 cellules en division (mitose). Il déclare la présence du chromosome Ph (présent chez plus de 95% des patients), il permet aussi de détecter des anomalies cytogénétiques surajoutées et donc de préciser la phase de la maladie. Le résultat de cet examen est obtenu après 2 ou 3 semaines.



**Figure 14 :** Caryotype d'un patient atteint de la LMC avec présence du chromosome Philadelphie.

### 3.2 FISH

L'hybridation in situ ou FISH visualise directement le gène de fusion BCR-ABL sur les noyaux, qu'il y ait ou non une translocation visible en cytogénétique. L'avantage de cette technique est qu'elle détecte les altérations BCR-ABL sans chromosome Philadelphie et qu'elle est plus sensible que le caryotype. Elle ne permet cependant pas de détecter d'autres anomalies cytogénétiques. Cependant, il peut être utile pour rechercher une délétion du chromosome 9, reconnue comme un facteur de pronostic négatif [57].

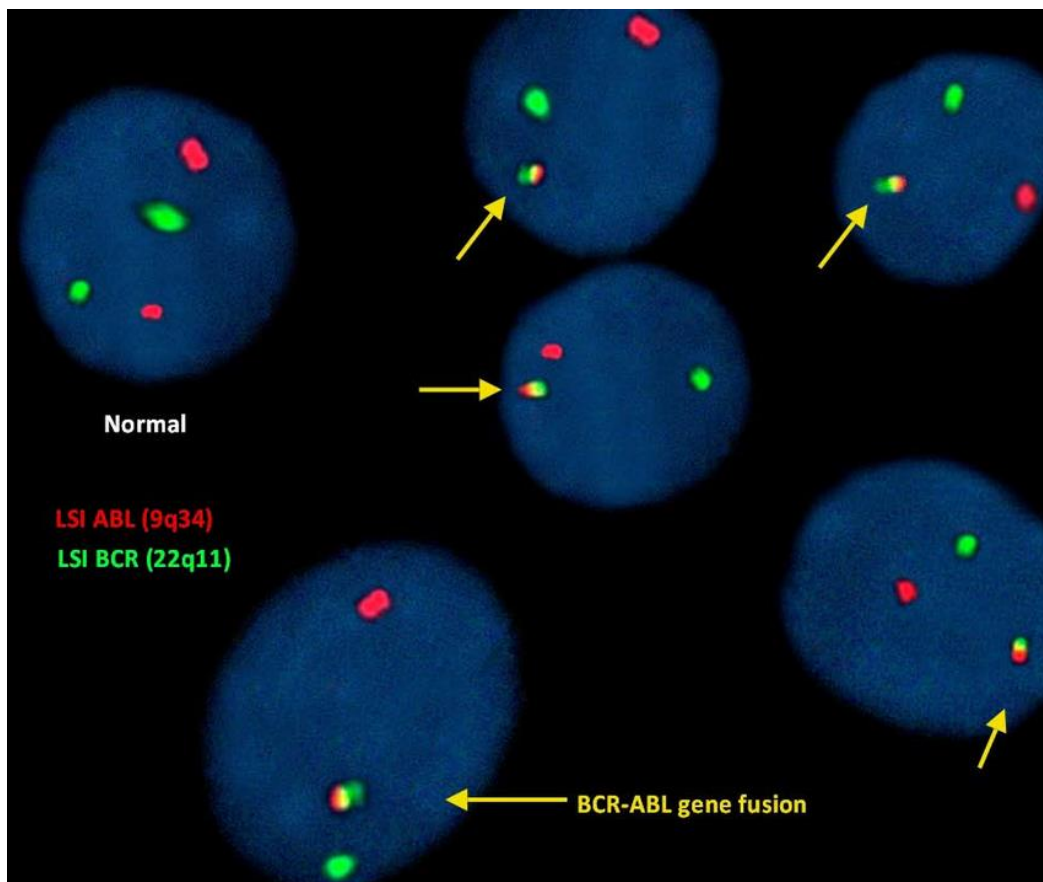


Figure 15 : Fluorescence in situ hybridation (FISH) pour la détection de (9; 22)(q34; q11).

### 3.3 La RT-PCR

La reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) permet de détecter le transcrit de la fusion Bcr-Abl dans les cellules de la moelle osseuse ou, plus facilement, à partir d'un prélèvement sanguin. Elle permet de définir le sous-type moléculaire produit. Ce test est désormais indispensable pour le diagnostic de la LMC. Le test peut être réalisé sur un simple tube d'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA), même après 36 heures à température ambiante [2].

La RT-PCR qualitative notamment de type multiplex est nécessaire à la caractérisation non seulement des types de transcrit classiques b3a2 et b2a2 au cours du diagnostic mais aussi pour les deux variants e1a2, e19a2, ainsi que pour les variantes rares tels que e1a3, e2a1, e6a2, e8a2, e13a3 (ou b2a3) et e14a3 (ou b3a3).

Phase chronique	Phase accélérée	Phase blastique
Critères hématologiques/cytogénétiques établis		
<b>Présence du chromosome de Philadelphie et/ou de la protéine ou du transcrite de fusion BCR/ABL1 confirmée par des techniques cytogénétiques et moléculaires.</b>		
<10% de blastes dans la moelle osseuse ou dans le sang périphérique.	<p>10% &lt; blastes &lt;20% dans la moelle osseuse ou dans le sang périphérique.</p> <p>Thrombocytopénie persistante (plaquettes &lt;100 x 10<sup>9</sup>/L) ou thrombocytose (plaquettes &gt;1000 x10<sup>9</sup>/L) ne répondant pas au traitement.</p> <p>Preuve cytogénétique de l'évolution clonale (présence d'aberrations chromosomiques supplémentaires dans les cellules Ph+).</p> <p>20 % ou plus de basophiles dans le sang périphérique.</p>	<p>Au moins 20 % de blastes dans la moelle osseuse ou dans le sang périphérique.</p> <p>Prolifération blastique extramédullaire (par exemple, lésions osseuses ostéolytiques ou lymphadénopathie).</p> <p>Lésions osseuses ostéolytiques ou lymphadénopathie) Grands foyers ou grappes de blastes dans la biopsie de la moelle osseuse.</p>

**Tableau 4** : Critères de diagnostic des différentes phases de la leucémie myélogène chronique (LMC) tels que définis par l'Organisation mondiale de la santé (OMS).



## **IX. Diagnostic différentiel**

### **1. Dans la phase chronique**

Avant que la translocation t(9;22) ne soit détectée par une analyse cytogénétique (caryotype) ou que le transcrit de fusion Bcr-Abl ne soit détecté par biologie moléculaire, les diagnostics différentiels sont ceux d'une hyperleucocytose associée à une myélémie.

#### **Myélémies réactionnelles**

Elles sont secondaires à une infection, souvent sévère, à une corticothérapie ou à des métastases médullaires. Elles sont caractérisées par l'absence de blastes circulants et le faible nombre de promyélocytes. En outre, un chromosome Philadelphie n'est jamais observé.

#### **Splénomégalie myéloïde ou myélofibrose primaire**

Elle se développe le plus souvent chez des sujets de plus de 60 ans. Elle est caractérisée par une hyperleucocytose avec myélémie et surtout une érythroblastose dans le sang aboutissant à l'érythromyélemie très caractéristique. La moelle est le siège d'une fibrose plus ou moins importante, rendant difficile la réalisation d'un myélogramme, et le chromosome de Philadelphie n'est jamais retrouvé à l'analyse cytogénétique.

### La thrombocytémie essentielle

Elle est caractérisée par une thrombocytose importante avec une hyperleucocytose modérée. C'est un diagnostic d'élimination et les autres syndromes myéloprolifératifs doivent d'abord être écartés (absence de chromosome Philadelphie en faveur d'une LMC, absence de myélofibrose en faveur d'une splénomégalie myéloïde primaire, absence d'augmentation de la masse sanguine en faveur d'une polyglobulie vraie).

### Leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC)

C'est probablement l'un des diagnostics différentiels les plus difficiles : il s'agit d'une entité à la frontière entre le syndrome myéloprolifératif et le syndrome myélodysplasique. Il existe une hyperleucocytose avec myélémie, dont la caractéristique est une monocytose ( $> 1000/mm^3$ ). Des signes cytologiques de myélodysplasie sont également présents. Le diagnostic de LMC peut être exclu par l'absence du chromosome Philadelphie et surtout par l'absence du transcrite de fusion BCR-ABL en biologie moléculaire [2].

## 2. En phase aiguë

Le problème diagnostique est celui de la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) avec chromosome Philadelphie. La LAL à chromosome Ph est le diagnostic différentiel possible de la LMC à transformation aiguë de phénotype lymphoïde. Si la présence d'une splénomégalie et d'une myélémie associée à une basophilie oriente vers un diagnostic de LMC acutisée, seul le caryotype réalisé au cours de la rémission après chimiothérapie d'induction permettra de trancher, montrant dans le cas de la LMC acutisée la persistance du chromosome Ph dans toutes les métaphases analysées [2].

## **X. Traitement de la LMC**

### **1. Critères de réponse**

Le traitement de la LMC a évolué au fil des années, au fur et à mesure des améliorations apportées à la prise en charge des patients et des découvertes thérapeutiques. Il faut d'abord définir les critères de réponse hématologique, cytogénétique et moléculaire.

#### **1.1 Réponse hématologique**

Une réponse hématologique complète (RHC) est obtenue lorsque les valeurs de la NFS reviennent à la normale, avec un nombre de globules blancs  $<10\ 000/\text{mm}^3$ , un nombre de plaquettes  $<450\ 000/\text{mm}^3$ , la présence de  $<5\%$  de myélocytes et métamyélocytes, la présence de  $<20\%$  de basophiles, l'absence de blastes et de promyélocytes dans le sang périphérique, l'absence d'atteinte extramédullaire [58] avec une disparition de tous les symptômes et signes cliniques de la maladie, en particulier de la splénomégalie [2]. Les recommandations de l'European LeukemiaNet indiquent que l'obtention d'une RHC dans les 3 mois suivant le début du traitement constitue une réponse optimale [59]. Presque tous les patients atteints de LMC en phase chronique obtiennent une RHC avec un traitement par ITK.

#### **1.2 Réponse cytogénétique**

L'analyse cytogénétique reste la norme pour le suivi du traitement de la LMC [59]. La cytogénétique classique nécessite un échantillon de moelle osseuse et l'évaluation de  $>20$  métaphases pour le chromosome Philadelphie.

Les catégories de réponse cytogénétique comprennent la réponse cytogénétique minimale, avec  $66\%$  à  $95\%$  de métaphases Ph<sup>+</sup> ; la réponse cytogénétique mineur

(mCyR), avec 36% à 65% de métaphases Ph<sup>+</sup> ; la réponse cytogénétique partielle (PCyR), avec 1% à 35% de métaphases Ph<sup>+</sup> la réponse cytogénétique majeure (MCyR)(qui inclue la réponse cytogénétique partielle et complète), avec 0% à 35% de métaphases Ph<sup>+</sup> ; la réponse cytogénétique complète (CCyR), avec 0% de métaphases Ph<sup>+</sup> ; ainsi qu'aucune réponse avec plus 95% de métaphases Ph<sup>+</sup>.

Bien que les études cytogénétiques soient associées à un large intervalle de confiance en raison du nombre limité de métaphases évaluées, l'association entre la réponse cytogénétique et les résultats positifs a été bien établie [60].

L'hybridation in situ en fluorescence (FISH) est une méthode alternative pour évaluer la réponse cytogénétique dans laquelle environ 200 cellules en interphase sont analysées à partir d'un échantillon de sang périphérique. Bien que les nouvelles techniques de FISH utilisent 3 ou 4 sondes ("double-FISH", D-FISH) et réduisent le nombre de résultats faussement positifs (la sensibilité est de 1 % à 5 %), l'obtention d'une réponse cytogénétique complète (CCyR) ne peut être confirmée par la FISH ; par conséquent, les cliniciens doivent être prudents avant de déclarer l'échec du traitement sur la base d'une faible positivité de la FISH [61].

### 1.3 Réponse moléculaire

La majorité (83 %) des patients atteints de LMC traités par des inhibiteurs de la tyrosine kinase obtiennent une CCyR (élimination du chromosome Ph dans les métaphases de la moelle osseuse), et des mesures plus sensibles sont donc nécessaires pour détecter la maladie résiduelle minimale [62].

La surveillance moléculaire permet de détecter la présence de l'ARNm du gène BCR-ABL1 à l'aide d'une réaction en chaîne par polymérase quantitative en temps réel

(RQ-PCR). Le suivi moléculaire est capable de détecter de faibles niveaux de maladie et est  $>3$  logs plus sensible que la cytogénétique conventionnelle [63].

De plus, l'analyse peut être effectuée sur des échantillons de sang périphérique, ce qui la rend plus pratique que le prélèvement de moelle osseuse. Les réponses moléculaires sont quantifiées en mesurant la réduction des transcrits BCR-ABL1 par rapport à une ligne de base standardisée [64]. Le processus de "normalisation internationale" a conduit à l'élaboration d'un facteur de conversion qui permet aux différents laboratoires d'exprimer les niveaux de transcrits BCR-ABL1 selon une échelle internationale (IS) convenue, ce qui permet de comparer la réponse moléculaire entre les laboratoires [65].

Dans l'essai « IRIS », les patients du groupe imatinib qui présentaient une réduction du niveau de transcrits BCR-ABL1 de  $>3$  logs par rapport à la ligne de base normalisée avaient un risque négligeable de progression de la maladie au cours des 12 mois suivants [66].

Par conséquent, une réponse moléculaire majeure (MMR ou MR3) a été définie comme une réduction de 3 logs ou un BCR-ABL1 (IS) = 0,1 % et une réponse moléculaire complète (CMR ou MR4) a été définie comme une réduction de 4 logs ou un BCR-ABL1 (IS) = 0.01% [66].

Il existe une bonne corrélation entre la cytogénétique de la moelle osseuse et les niveaux de transcription dans le sang périphérique, un BCR-ABL1 (IS)  $\leq 10$  % équivalant à une MCyR et un BCR-ABL1 (IS)  $\leq 1$  % équivalant à une CCyR. Cependant, contrairement à la cytogénétique, l'analyse moléculaire ne fournit pas d'informations sur la morphologie de la moelle osseuse ou sur des anomalies chromosomiques supplémentaires [67].

Type de réponse		Définition
<b>CHR</b>	Complete Hematologic Response	NFS normale
<b>MCyR</b>	Major Cytogenetic Response	0–35% Ph+marrow metaphases
<b>CCyR</b>	Complete Cytogenetic Response	0% Ph+marrow metaphases
<b>MMR</b>	Major Molecular Response	BCR–ABL/ABL $\leq$ 0.1% (International Scale)
<b>MR<sup>4.0</sup></b>		BCR–ABL/ABL $\leq$ 0.001% (IS) “4–log reduction”
<b>MR<sup>4.5</sup></b>		BCR–ABL/ABL $\leq$ 0.003% (IS) “4.5–log reduction”
<b>CMR</b>	Complete Molecular Response	Undetectable BCR–ABL (test of sensitivity $\geq$ 4.5 logs)

**Tableau 5 :** La définition des réponses hématologiques, cytogénétiques et moléculaires dans la LMC.

## **2. Traitement**

### **2.1 Historique des traitements**

#### **2.1.1 L'arsenic et la radiothérapie**

L'arsenic est connu pour ses propriétés thérapeutiques contre le cancer depuis plus de 2500 ans. La première tentative de traitement de la LMC par l'arsenic a été faite par l'Allemand Heinrich Lissauer en 1865, qui a observé une régression splénique et une diminution de la leucocytose chez un patient [68]. Les préparations à base d'arsenic ont été utilisées pour le traitement de la LMC malgré leur toxicité jusqu'à l'introduction de la radiothérapie.

Entre 1903 et 1904, Nicholas Senn et William Allen Pusey ont vu les ganglions tumoraux de patients atteints de lymphome hodgkinien " fondre " sous l'effet des rayons X. La radiothérapie est rapidement devenue la nouvelle norme de soins pour le traitement de la LMC et d'autres cancers, avec des réponses cliniques encourageantes. L'efficacité chez les patients atteints de LMC a conduit à l'introduction d'un nouveau concept thérapeutique, le concept de rémission.

#### **2.1.2 L'Hydroxyurée et le busulfan**

La première molécule utilisée pour le traitement était le busulfan à la dose de 0,1 mg/kg/jour. Le busulfan a entraîné des réponses hématologiques complètes dans 23 à 54 % des cas [69], mais de très rares réponses cytogénétiques majeures ont été rapportées (1 à 2,5 %). Cette thérapie est connue pour ses propriétés myélosuppressives tardives. Ce médicament peut également provoquer une insuffisance médullaire, une fibrose pulmonaire, un taux élevé d'infertilité, une pigmentation de la peau et des cataractes.

Le busulfan a été rapidement abandonné lorsque l'hydroxyurée a été découverte dans les années 1970. Prescrite à la dose de 40 mg/kg/jour, l'hydroxyurée permet d'obtenir une rémission hématologique complète dans 39 à 53 % des cas. C'est un inhibiteur de la ribonucléotide réductase, qui diminue la synthèse de l'ADN. Les effets indésirables sont moins graves et se caractérisent par une macrocytose, une atrophie cutanée entraînant des ulcères, une aphtose et une photosensibilisation. Parallèlement, selon les dernières recommandations du ELN, en attendant jusqu'à ce qu'un diagnostic soit établi, l'hydroxyurée peut être utilisée provisoirement.

### **2.1.3 L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques et l'interféron- $\alpha$**

La greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (CSH) ou transplantation allogénique de CSH était, le seul traitement curatif de la LMC reconnu chez les patients jeunes dans les années quatre-vingt, puis dans les années quatre-vingt-dix ce dernier est devenu le traitement de première ligne pour tous les patients éligibles en phase chronique et en phase d'accélération précoce [70].

Pourtant, dès l'introduction des ITK et en raison d'une morbidité accrue liée à la maladie du greffon contre l'hôte (GVH), la transplantation n'est prévue qu'en cas d'échec d'une prise en charge en seconde ligne par ITK [71].

Dans les années quatre-vingt-dix l'induction d'une réponse cytogénétique complète par l'INF alpha chez les patients ne pouvant pas bénéficier d'une allogreffe lui a permis de devenir un traitement de première ligne [72]. Actuellement, il fournit une alternative thérapeutique pour des patients intolérants aux ITK.



## 2.2 La thérapie ciblée

### 2.2.1 L'imatinib

Le rôle essentiel de BCR-ABL1 dans la transformation cellulaire maligne est à l'origine des travaux se basant sur un blocage thérapeutique spécifique de cette protéine.

L'inhibition de la protéine kinase ABL1 a été obtenue tout d'abord avec des molécules de la classe des benzopyranones et benzothiopyranones [73]. Cependant, ces composés montraient des sélectivités limitées en inhibant d'autres kinases non visées.

En 1995, l'équipe d'Elisabeth Buchdunger mit au point une nouvelle famille de composés : les dérivés de 2- phénylaminopyrimidine. L'optimisation de cette classe de composés pour l'inhibition de la kinase ABL1 a conduit à l'identification de CGP 57148, cette molécule montra une capacité inhibitrice importante des protéines kinases ABL1 et BCR-ABL1 avec une très grande sélectivité [74]. Le CGP 57148, renommé par la suite STI 571 (Signal Transduction Inhibitor 571) puis imatinib est un analogue de l'ATP qui agit par inhibition compétitive de l'ATP au niveau du site catalytique de la protéine kinase [75].

Cette nouvelle thérapie a été approuvée en 2001 par l'agence Américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) [76]. Les ITK représentent une avancée majeure dans la prise en charge des patients atteints de la LMC en permettant pour la première fois une thérapie ciblée.

Il existe deux types d'ITK : les ITK de type I, qui ciblent la conformation active et inactive de la BCR-ABL et se lient au site de liaison de l'ATP sur le domaine tyrosine kinase de la protéine ; et les inhibiteurs de type II qui ciblent la conformation inactive

de la protéine et se lie à un site adjacent au site de liaison de l'ATP disponible lorsque la boucle d'activation n'est pas phosphorylée [77].

L'imatinib est une ITK de type II. Son action empêche donc la liaison de l'ATP, et bloque la protéine sous sa forme inactive, empêchant son autophosphorylation, et donc empêchant la phosphorylation de ses substrats [78].

L'imatinib est le traitement de première ligne de la LMC avec une prise orale quotidienne. Selon l'IRIS (International Randomized Study of Interferon and STI 571), parmi 1106 nouveaux patients atteints de LMC, 76,2% des patients traités par l'imatinib ont perdu le chromosome de Philadelphie, ce qui signifie une réponse cytogénétique complète.

Ce traitement de type ITK a ainsi permis de stabiliser la pathologie dans la phase chronique, permettant aux patients de vivre normalement. Cependant, ce traitement a de nombreux effets secondaires, dont la fatigue, des céphalées, une anémie et des myalgies, qui sont plus courants, et parfois même entraînant une toxicité des organes du foie ou du cœur, qui peut entraîner un allongement de l'intervalle QT associé à un risque élevé de troubles du rythme et de graves troubles ventriculaires qui restent peu fréquents et surviennent chez moins de 1 % des patients traités par l'imatinib [79].

Pour cela les patients traités par l'imatinib doivent être suivis de près, afin d'évaluer leur réponse au traitement. Il existe trois types de réponses : les réponses hématologiques, cytogénétiques et moléculaires. Une réponse hématologique complète correspond à la normalisation de la NFS et de la taille de la rate. Un examen est effectué toutes les deux semaines jusqu'à l'obtention d'une réponse hématologique complète, suivie d'un contrôle tous les trois mois.

Ensuite, un examen est effectué tous les 6 mois jusqu'à ce qu'une réponse cytogénétique soit obtenue, puis tous les 12 à 18 mois. Enfin, une réponse moléculaire complète correspond à la disparition totale de la transcription BCR-ABL, qui est mesurée par la transcription inverse suivie d'une amplification par PCR en temps réel. Ce test est effectué tous les 3 mois selon les recommandations du réseau européen de lutte contre la leucémie [80].

### **2.2.2 Dasatinib, nilotinib, bosutinib, ponatinib**

En réponse aux résistances et aux échecs de l'imatinib, d'autres ITK plus puissants ou ayant un spectre kinase plus large ont été développés.

Le dasatinib et le nilotinib ont montré une supériorité par rapport à l'imatinib en termes de CCyR à 12 mois et sont maintenant commercialisés dans la plupart des pays comme traitement de première ligne et au-delà [81].

Le bosutinib a récemment été approuvé comme une nouvelle alternative pour le traitement de deuxième ligne et au-delà.

Le ponatinib, un inhibiteur de troisième génération, est actuellement commercialisé aux États-Unis pour les patients qui en échec à l'imatinib ou à d'autres inhibiteurs, et pour les patients présentant une mutation T315I de la poche kinase ABL1, qui a été responsable de l'inactivité totale de tous les TKI à ce jour. Ce dernier médicament est en cours de développement en première ligne.

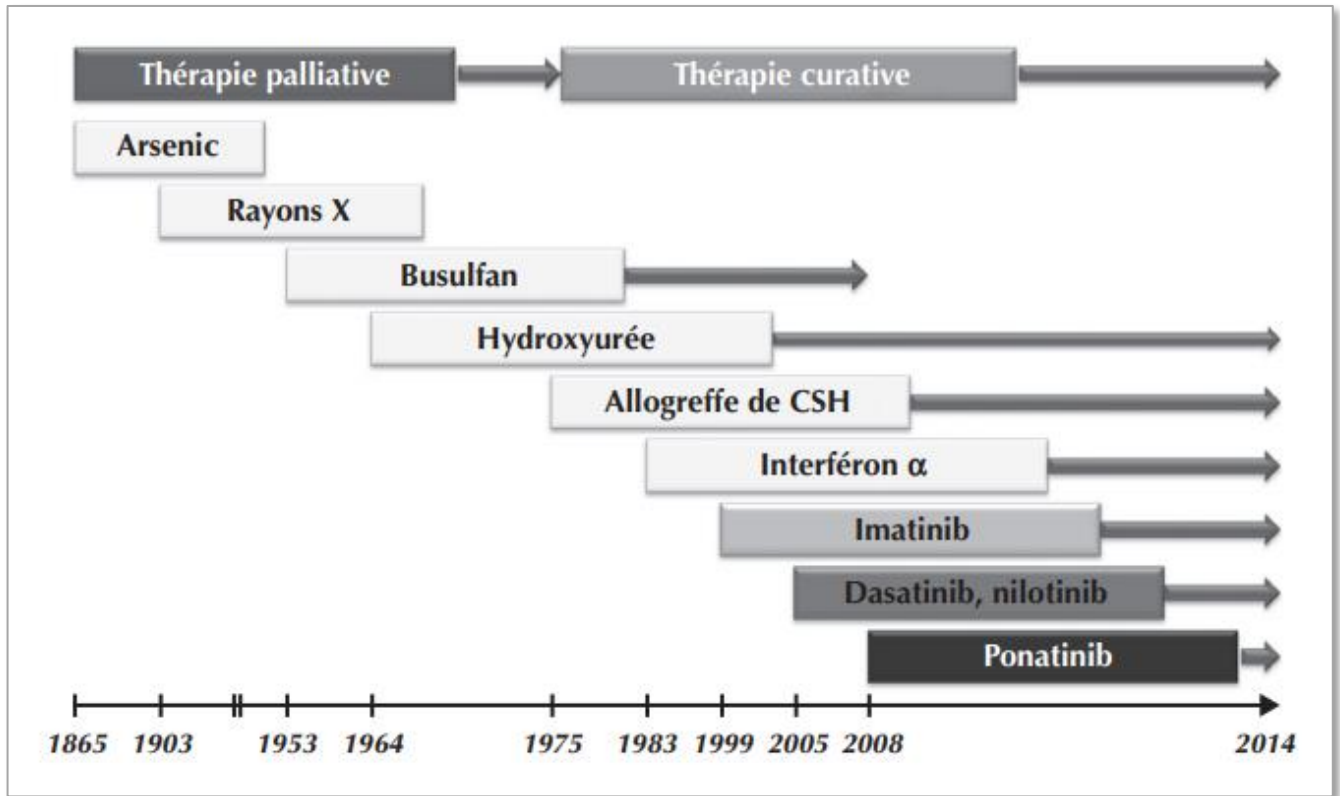


Figure 16 : Résumé de l’historique des traitements de la LMC.

### 3. Résistance au traitement

Bien que l'imatinib soit la référence pour le traitement de la LMC, 35 à 40 % des patients développent des résistances à ce médicament [82].

Les critères de résistance à l'Imatinib sont définis comme suit :

- Absence de réponse hématologique à 3 mois.
- Absence de réponse cytogénétique majeure à 12 mois.
- Absence de réponse cytogénétique complète à 18 mois, ou
- Rechute moléculaire (augmentation du taux de transcrit BCR-ABL).

Ces données proviennent des résultats de l'étude IRIS [83].

Il est possible de distinguer les résistances primaires, définies comme une absence totale de réponse hématologique après 3 mois, une réponse cytogénétique après 6 mois ou une réponse cytogénétique majeure après un an de traitement ; et résistances secondaires, également appelée résistance acquise, lorsque la réponse hématologique ou cytologique précédente est perdue. Les résistances peuvent également être classés selon qu'ils dépendent ou non de BCR-ABL (Figure 17) [84].

Les résistances dépendantes (violette) et indépendantes (bleue) du BCR-ABL peuvent être expliquées par les mécanismes de duplication et de mutation du BCR-ABL, la co-médication, la variété interindividuelle, la diminution des protéines d'importation, l'augmentation des protéines d'exportation, la liaison de l'imatinib aux protéines plasmatiques et la présence de cellules souches leucémiques (CSL) insensibles à l'imatinib.

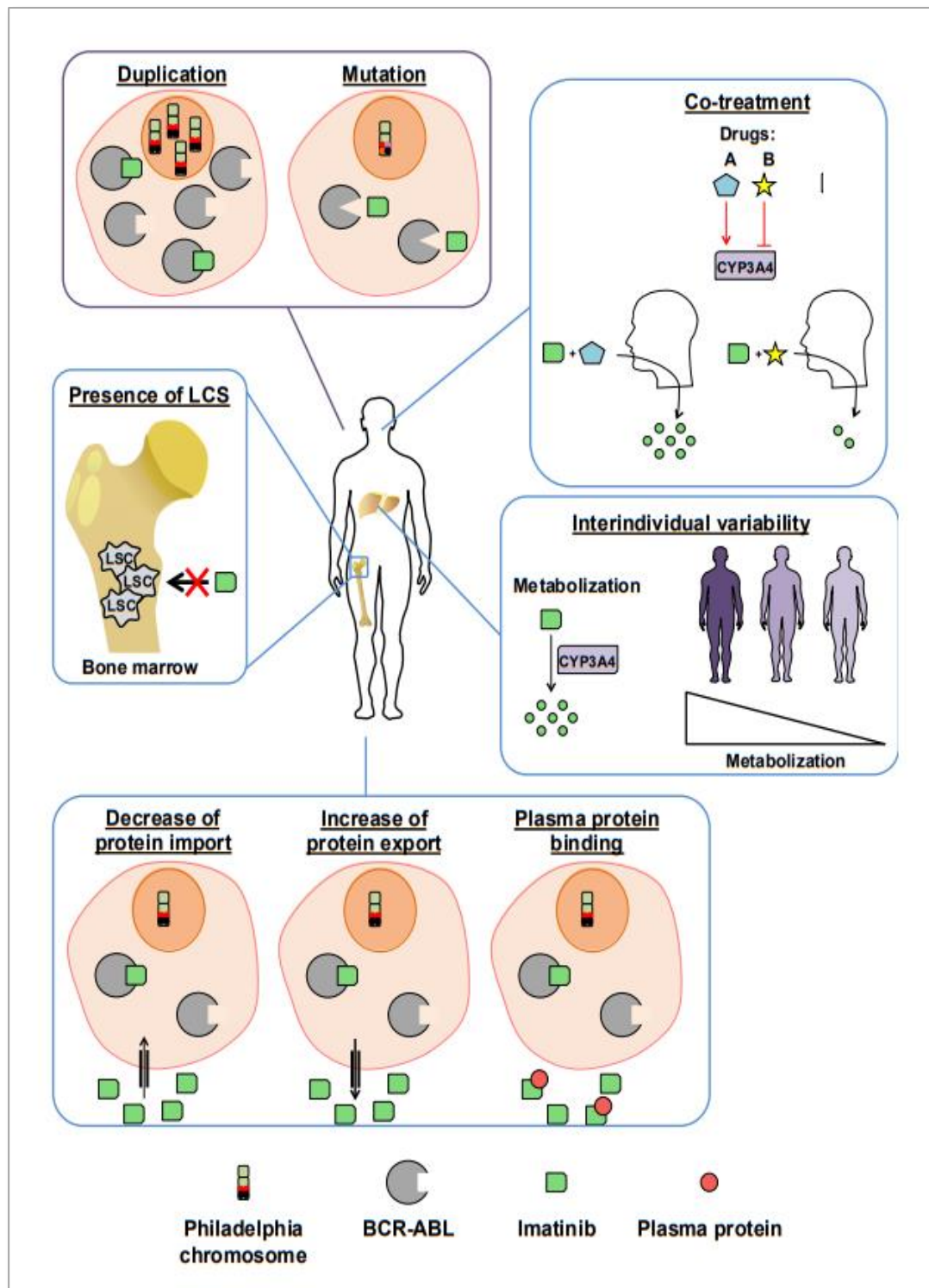
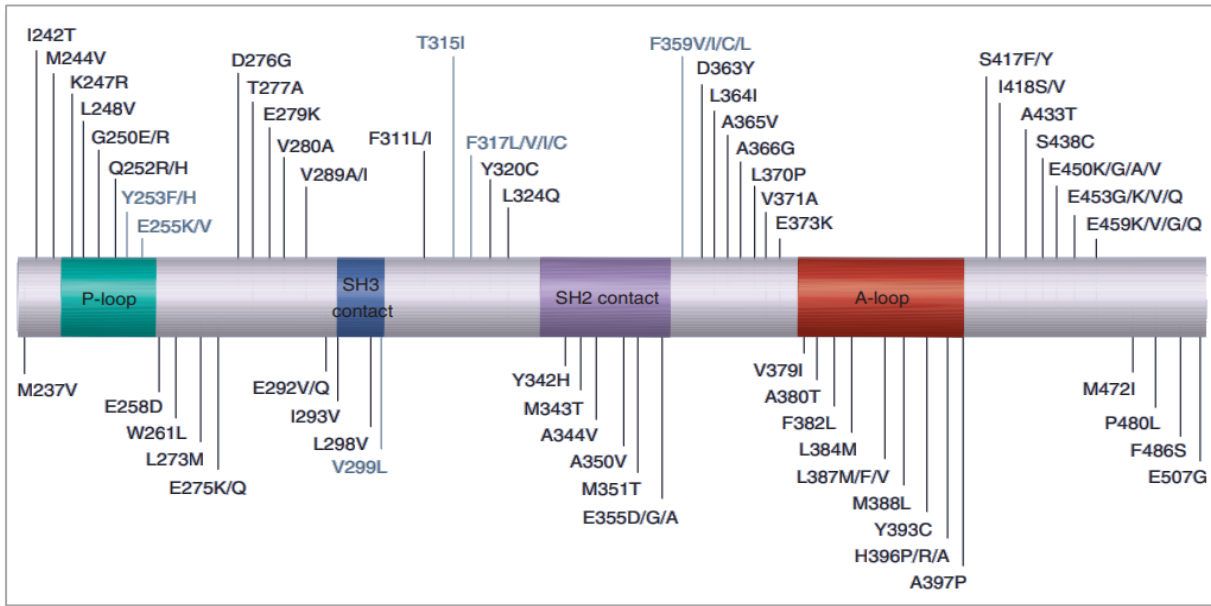


Figure 17 : Résistances dépendantes et indépendantes du BCR-ABL à l'imatinib  
 - CYP3A4 : cytochrome 3A4.

Le séquençage de Sanger est la méthode que nous recommandons pour l'analyse des mutations du domaine kinase du gène de fusion BCR-ABL (Figure 18). Le séquençage direct permet de détecter les mutations présentes dans 20% des cellules Ph+ [85].

Des études rétrospectives sur des patients au moment du diagnostic ou dans le cadre de la réponse cytogénétique complète qui ont essayé de tirer parti de méthodes très sensibles, telles que la PCR spécifique des allèles fluorescents, ont suggéré que les mutations trouvées dans de rares cellules Ph+ ne sont pas nécessairement sélectionnées ; par conséquent, leur détection n'est pas toujours en corrélation avec un échec thérapeutique ultérieur car il est impossible de prédire si ces cellules représentent un clone capable de soutenir une hématopoïèse à long terme et de concurrencer efficacement le ou les clones non mutés [86].



**Figure 18** : Substitutions d'acides aminés dans le domaine kinase BCR-ABL identifiées dans des échantillons cliniques provenant de patients déclarés résistants à l'imatinib.

Les principaux motifs structuraux dans le domaine des kinases sont indiqués : Boucle P, domaine SH2 et domaine SH3 et boucle A. La numérotation des résidus est conforme à l'isoforme ABL 1a. Les mutations conservant une insensibilité au dasatinib et au nilotinib sont mises en évidence en gris. Données recueillies à partir de 28 études publiées entre 2001 et 2010. Boucle A : Boucle d'activation ; boucle P : Boucle de liaison au phosphate ; contact SH2 et contact SH3 : Régions de contact avec SH2 et SH3 des protéines contenant des domaines. Reproduit avec la permission de la Société américaine d'hématologie.



# PARTIE PRATIQUE

# **I. Matériel et méthodes**

## **1. Objectifs de l'étude**

### **Objectif principal**

- Déterminer le profil génétique des patients atteints de la LMC par la recherche des biomarqueurs habituelles et rares, en vue de confirmer le diagnostic et proposer une thérapie ciblée.

### **Objectifs secondaires**

- Rechercher une éventuelle corrélation entre le type du transcrit BCR-ABL et les données cliniques et hématologiques des patients étudiés.
- Suivre l'évolution de la réponse au traitement de la maladie résiduelle via la quantification des marqueurs moléculaires du gène de fusion.
- Déterminer les facteurs génétiques responsables de la résistance au traitement en vue de personnaliser la thérapie.

## **2. Population étudiée et méthodes**

L'étude a porté sur 123 patients recrutés rétrospectivement entre janvier 2016 et janvier 2020, au niveau du service de médecine interne du CHU Hassan II de Fès.

Critères d'inclusion : Patients suivis pour LMC, et dont le diagnostic est retenu par les moyens disponibles notamment les données cliniques, hématologiques et cytogénétiques, et quel que soit la phase de la maladie.

Sont exclus de l'étude, les patients dont le dossier médical est inexploitable ou incomplet.

Chaque patient répondant aux critères d'inclusion cités ci-dessus, a bénéficié d'une consultation génétique, dans laquelle un dossier médical complet a été réalisé contenant les données personnelles.

Les données cliniques et hématologiques ont été récupérées de la base de données médicale (HOSIX) de l'hôpital.

Les différents échantillons sanguins (2 à 4 ml) ont été collectés dans des tubes EDTA, et utilisés immédiatement pour l'extraction d'ARN.

### **3. Caractérisation moléculaire**

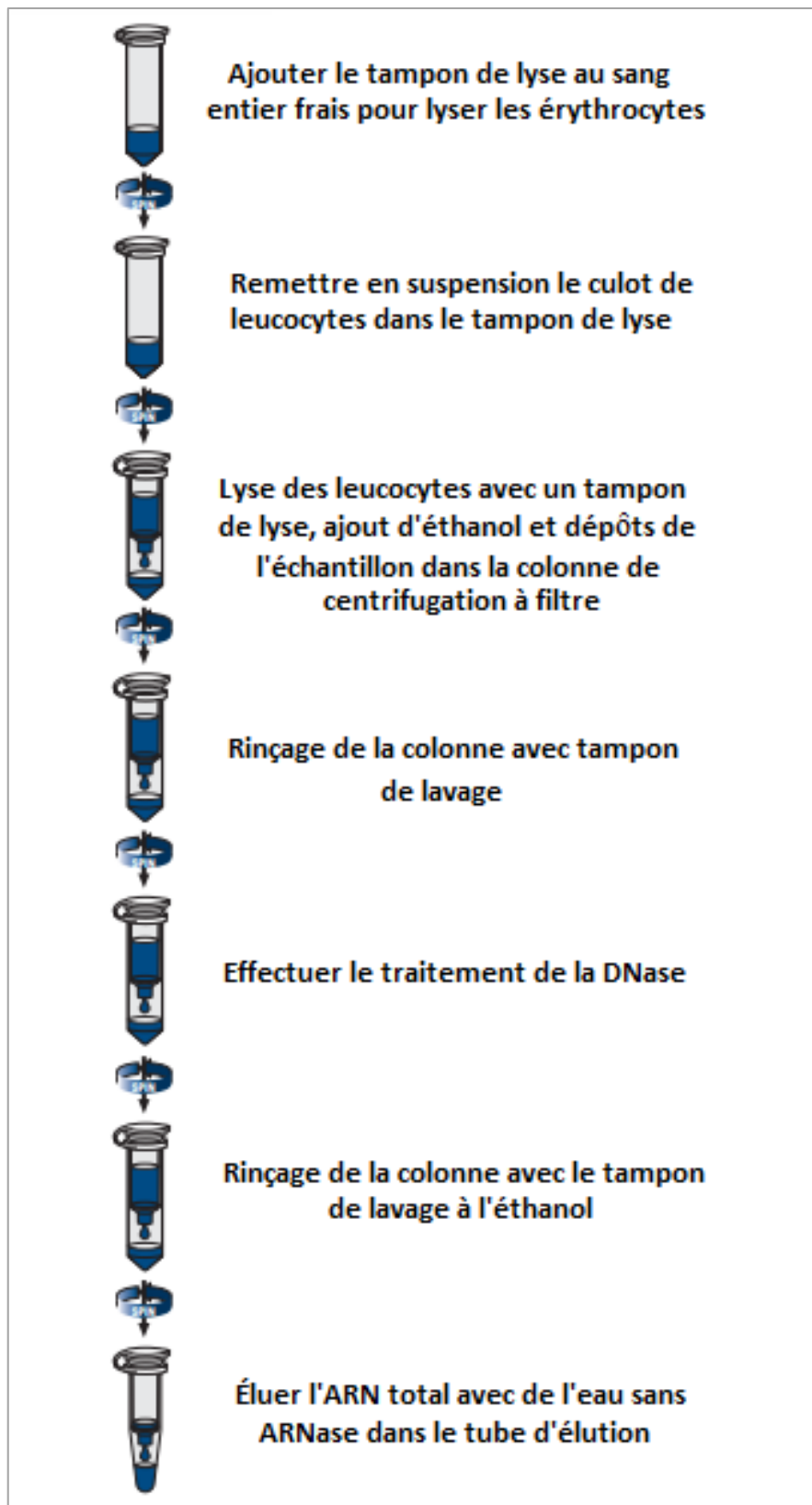
L'analyse moléculaire assure la détection des réarrangements de BCR-ABL. Multiples analyses existent et présentent des approches différentes les unes des autres. La PCR multiplexe permet de déterminer les points exacts de cassure des gènes de fusion BCR et ABL.

La réponse moléculaire définit le niveau des transcrits du gène BCR-ABL par rapport à un niveau de base établi, déterminé en mesurant les niveaux de transcrits BCR-ABL et ABL dans le sang des patients atteints de LMC avant qu'ils ne commencent le traitement.

#### **3.1 Extraction d'ARN et contrôle qualité**

L'ARN est une molécule intermédiaire qui permet de réguler l'expression des gènes qui portent l'information génétique gouvernant l'essentiel des aspects de fonctionnement d'une cellule. Leur extraction peut être réalisé par un kit de purification qualifié.

Dans notre étude l'extraction d'ARN total a été effectuée selon le protocole schématisé sur la figure 19 en utilisant "PurLink™ Total RNA Blood Purification Kit" et conservé à -80 °C jusqu'à la transcription inverse. La figure 19 illustre le Protocole suivi en vue d'extraire l'ARN à partir des échantillons sanguins.



**Figure 19** : Protocole d'extraction des ARN à partir de sang prélevé dans les tubes

"PurLink TM Total RNA Blood Purification Kit"

Le kit de purification d'ARN total du sang PureLink™ permet d'isoler l'ARN total à partir de 200 µl de sang humain, tout en aboutissant à un produit d'ARN final raisonnablement exempt de protéines qui peuvent soit interférer avec les applications en aval ou avoir un effet négatif sur la stabilité de l'ARN stocké, aussi la quantité d'ARN total purifié est facilement quantifiable en utilisant l'absorbance UV à une DO260/280 entre 1,6 et 2,2 (résultat toujours >1,6),

La concentration et la pureté de l'ARN a été évalué par Qubit®3.0 Fluorometer, qui permet la quantification spécifique d'ARN, en outre, chaque composant du kit est exempt de ribonucléase et est très éligible pour une performance optimale.

### **3.2 Reverse transcription**

#### **3.2.1 L'ADN complémentaire**

L'ADN complémentaire (ADNc) est un ADN artificiellement synthétisé à partir d'un ARN messager (ARNm), représentant ainsi la partie codante de la région du génome ayant été transcrit en ARNm. L'ADNc est obtenu après une réaction de transcription inverse d'un ARNm.

#### **3.2.2 Synthèse de l'ADNc**

L'ADNc est synthétisé à l'aide du "SuperScript® VILO cDNA Synthesis Kit", à partir de l'ARN total (2µg). Le volume de la réaction peut être ajusté selon les besoins jusqu'à 100 µL. La synthèse a été réalisée conformément aux instructions du fabricant. L'ADNc résultant a été dilué à 10ng/µl et a été stocké à -20°C.

1. Pour une réaction unique, nous avons combiné les composants suivants (Tableau 6).

Composante	Quantité
5X VILO™ Reaction Mix	4 µL
10X SuperScript™ Enzyme Mix	2 µL
ARN (up to 2.5 µg)	X µL
DEPC-treated water	To 20 µL

**Tableau 1:** Les composants du kit de synthèse d'ADNc "SuperScript® VILO cDNA Synthesis Kit", et la quantité nécessaire pour une réaction

2. Le contenu du tube a été mélangé et incubé à 25°C pendant 10 minutes.
3. Le tube a été incubé ensuite à 42°C pendant 60 minutes.
4. Enfin, la réaction a été mise à 85°C pendant 5 minutes.
5. L'ADNc a été conservé à -20°C jusqu'à son utilisation pour la PCR Multiplexe ainsi que la RTq-PCR.

### **3.2.3 Contrôle qualité de l'ADNc synthétisé**

La concentration et la pureté de l'ADNc ont été évaluées à l'aide du fluoromètre Qubit® 3.0.

### **3.3 Amplification par PCR multiplex**

La PCR multiplex est une PCR où sont utilisés plusieurs couples d'amorces pour amplifier simultanément plusieurs cibles d'ADN en une seule réaction, plutôt qu'un seul couple d'amorces pour amplifier une cible unique d'ADN.

### 3.3.1 Conception des amorces

Pour amplifier les régions codantes du gène BCR-ABL, nous avons utilisé des paires d'amorces conçues par Tong et son équipe (Tong et al. 2018) (Tableau 7),

Séquences des amorces	Transcrit attendu	Taille du transcrit (bp)
FP: TCCGCTGACCATCAATAAGG RP: CGTGATGTAGTTGCTTGGGA	-e14a2 -e14a3 -e13a2 -e13a3	370 196 295 121
FP: CGCAAGACCGGGCAGAT RP: CGTGATGTAGTTGCTTGGGA	-e1a2 -e1a3	330 156
FP: AGTCAAGATTGCTGTGGTCA RP: CGTGATGTAGTTGCTTGGGA	-e18a2 -e18a3 -e19a2 -e19a3	296 122 436 262
FP: ATCCAACGACCAAGAACTCTC RP: CGTGATGTAGTTGCTTGGGA	-e6a2 -e6a3 -e8a2 -e8a3	299 125 352 178
FP: TGAAAGAGATCAAACACCCTAACC RP: CAGCAAGATCTCTGTGGATGAAG	-ABL1	228

**Tableau 2:** Séquences d'amorces utilisées dans la PCR multiplex pour l'amplification des différents transcrits de fusion BCR-ABL



### **3.3.2 Technique de la PCR multiplex :**

Après la conception des amorces, une PCR multiplex est réalisée pour mettre en évidence le gène de fusion BCR-ABL avec ses différents variants à partir de l'échantillon d'ADNc.

La réaction PCR a été réalisée dans un volume final de 20 µl contenant 10 µl de Phusion U Multiplex PCR Master Mix (Thermo Scientific™), 50 ng d'ADNc et 20 pmol de chaque amorce dans le système de PCR à 3x32 puits ProFlex™ (AppliedBiosystems). Le programme du thermocycleur était de : 98 °C pendant 30 s, 35 cycles de 94 °C pendant 10 s 60 °C pendant 10 s 72 °C pendant 25 et 72 °C pendant 8 minutes.

## **3.4 Quantification par PCR quantitative en temps réel**

### **3.4.1 RT-PCR quantitative**

La RT-PCR quantitative est une technique de biologie moléculaire basée sur la détection et la quantification d'un agent fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR d'une région cible du génome. Étant donné qu'elle utilise généralement des systèmes en tubes fermés et que la quantification ne requiert aucune manipulation postamplification, les problèmes de contamination post-PCR par les amplicons sont significativement réduits.

### **3.4.2 Protocole expérimental de la RTq-PCR**

Nous avons utilisé le kit TaqMan Gene Expression Assay (Tableau 8).

Ce kit est concentré, et tous les réactifs nécessaires sont pré-mélangés, ce qui réduit le temps de manipulation pour la dilution, le mélange et le pipetage.

<b>BCR–ABL TaqMan Gene Expression Assays</b>	
<b>Assay ID</b>	<b>Transcript</b>
Hs03024541_ft	b3a2
Hs03024646_ft	b2a2
<b>Control endogen: ABL TaqMan Gene Expression Assays</b>	
<b>Gene</b>	<b>Assay ID</b>
<b>ABL</b>	Hs 99999002_mH

**Tableau 8:** TaqMan Gene Expression Assays du gène BCR–ABL et de l'endogène ABL.

Protocole expérimental :

- Déterminer le nombre total de réactions PCR, y compris un contrôle hautement positif, un contrôle négatif ainsi que l'étalon IS–MMR. Ces témoins permettent de surveiller les étapes de transcription inverse et d'amplification des gènes ABL et BCR–ABL lors de la quantification des transcrits. L'étalon IS–MMR permet également de convertir le nombre de copies normalisé selon l'Échelle internationale.
- Décongelez le TaqMan® Fast Advanced Master Mix sur de la glace, puis mélangez soigneusement et doucement.
- Décongeler les tests TaqMan® sur de la glace, puis passer au vortex et à la centrifugeuse pour les remettre en suspension.
- Décongeler les échantillons sur de la glace, puis les passer à la centrifugeuse et au vortex pour les remettre en suspension.
- Combinez les éléments suivants pour le nombre de réactions requises, plus 10 % de dépassement.

Composants	Volume par réaction	Concentration finale
	Plaques de 48 puits	
TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2X)	10 µL	1X
TaqMan® Assay (20X)	1 µL	1X
Nuclease-Free Water	7 µL	-
Volume total par réaction	18 µL	-

**Tableau 9** : Conditions expérimentales nécessaires pour la préparation de la réaction RTq-PCR pour la quantification du gène BCR-ABL en temps réel

- Vortexer brièvement pour mélanger.
- Centrifuger brièvement pour amener le mélange réactionnel au fond du tube et éliminer les bulles d'air.
- Transférer le volume approprié du mélange réactionnel dans chaque puits de la plaque de réaction.
- Ajouter un échantillon d'ADNc (1 pg à 100 ng dans de l'eau pure), à chaque puits : 2 µL pour la plaque à 48 puits (ajuster le volume d'eau pure dans la réaction PCR pour un plus grand volume d'ADNc).
- Sceller la plaque de réaction avec un film adhésif optique, puis centrifuger brièvement pour amener le mélange réactionnel PCR au fond du puits et éliminer les bulles d'air.
- Sur l'appareil StepOne™ System (48 puits-Fast), on constitue un document d'expérience en respectant les conditions suivantes et on lance la technique.

Système PCR en temps réel	Paramètres	Incubation	Activation de la polymérisation	PCR (40cycles)	
StepOne™ System (48 puits-Fast)	Température (°C)	50	95	95	60
	Temps (mm:ss)	02:00	00:20	00:03	00:30

**Tableau 10** : Le programme du StepOne™ System nécessaires pour le protocole d'amplification par RTq-PCR pour la quantification du gène BCR-ABL en temps réel

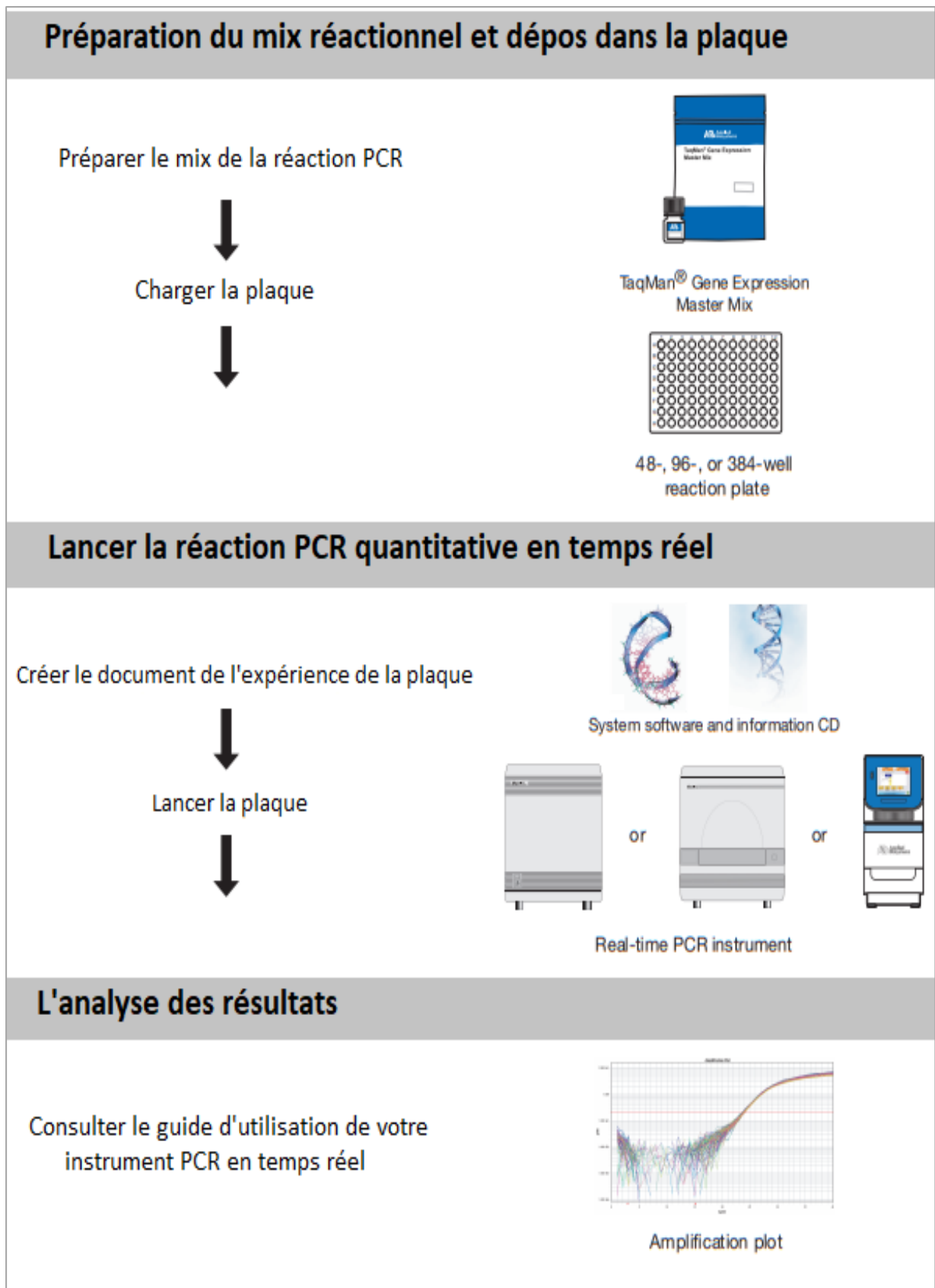


Figure 20 : les différentes étapes de la RTq-PCR

### **3.5 PCR simplex et Séquençage**

#### **3.5.1 PCR simplex**

Afin de n'amplifier que l'allèle réarrangé d'ABL, il est nécessaire de procéder à une première amplification par RT-PCR des transcrits oncogéniques BCR-ABL, suivie d'une deuxième amplification par PCR nichée du domaine d'ABL d'intérêt.

- **PCR 1** : amplification des transcrits de fusion BCR-ABL entre b13 de BCR et a9 de ABL. Utiliser les amorces BCR F et ABL R (Tableau 7).
- **PCR 2** : amplification du domaine tyrosine kinase de ABL entre les exons a2 et a9. Utiliser les amorces ABL F et ABL R (Tableau 7).

#### **3.5.2 Séquençage**

Cette technique se base initialement sur l'idée de Frédérick Sanger, et a connu depuis un énorme progrès consistant en l'utilisation de kits spécifiques, de marquage par quatre types de fluorochromes, l'automatisation du processus...etc.

Le principe de la technique réalisée consiste à effectuer une réaction de PCR spécifique (réaction de séquence) contenant, en plus des réactifs habituels, quatre types de didésoxyribonucléotide (ddATP, ddCTP, ddGTP et ddTTP) marqués par des fluorochromes différents. Durant cette réaction, les ddNTPs incorporés au cours de l'élongation bloquent le processus de polymérisation, et entraînent ainsi la libération de fragments de différentes tailles qui contiennent tous l'un des ddNTPs marqués à la fin de leurs séquences respectives. Les différents fragments de chaque échantillon sont par la suite séparés selon leurs poids moléculaires via une électrophorèse sur gel de polyacrylamide. La fluorescence émise par les différents ddNTP sera captée et transformée en pic de couleurs différentes correspondant à la succession des bases relative à chaque patient.

Deux étapes de purification dont le rôle principal est d'éliminer l'excès des réactifs qui peuvent gêner les étapes suivantes, accompagnent ce processus. Les paragraphes suivants résument les différentes étapes du séquençage avec les réactifs correspondants.

Le processus du séquençage est constitué de trois étapes : Purification du produit PCR initial, amplification de l'ADN en présence des ddNTP marqués, repurification des produits de la réaction de séquence pour éliminer l'excès des réactifs capables de créer un problème lors de la migration au niveau du séquenceur.

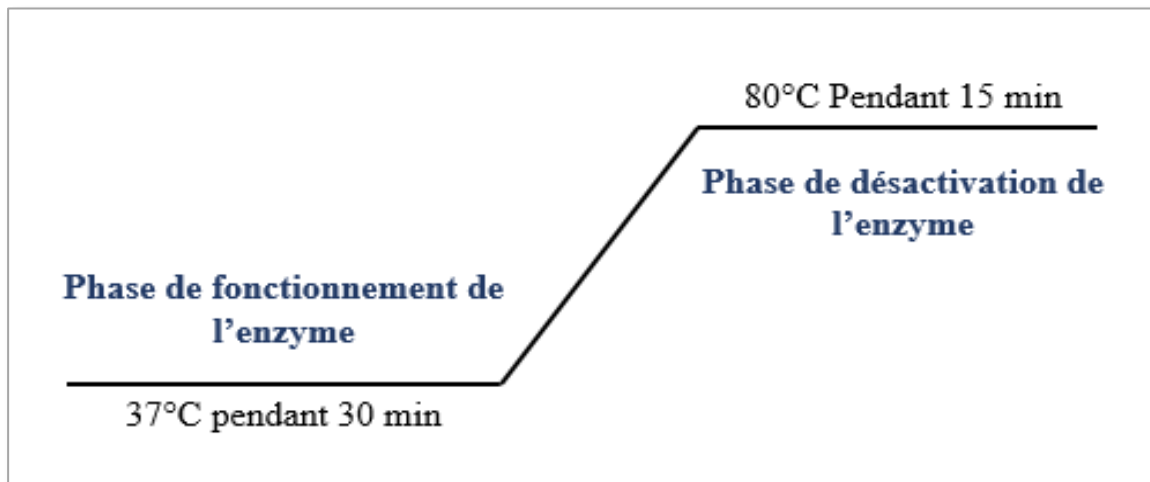
➤ **Purification des produits PCR**

Les produits PCR sont purifiés grâce à deux enzymes hydrolytiques ; l'exonucléase I et la phosphatase alcaline. Le mélange réactionnel est présenté dans le tableau 11.

Réactif	Volume en $\mu$ l
Produits PCR	4
ExoSap	1

**Tableau 3** : Le mélange réactionnel de la purification par ExoSap

Le programme usuel utilisé est présenté dans la figure suivante :



**Figure 21** : Le programme des cycles de la purification par ExoSap

➤ **Réaction de séquence**

Les produits PCR purifiés sont amplifiés linéairement au cours de la réaction de séquence. Le mélange réactionnel est présenté dans le tableau 12.

Réactif	Volume en $\mu$ l
Tampon	2
Eau pure	1
Amorce (F ou R)	1
BigDye	2
Produits PCR purifiés	4

**Tableau 4** : Le mélange réactionnel de la réaction de séquence



Le programme usuel utilisé est présenté dans la figure suivante :

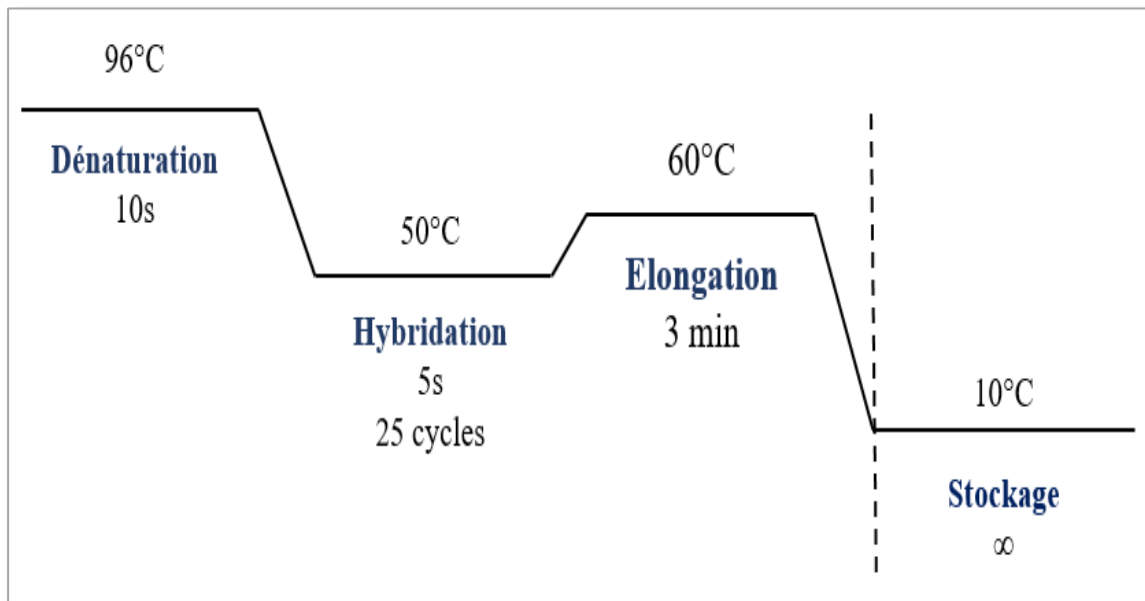


Figure 22 : Le programme des cycles de la réaction de séquence

➤ Purification du produit de la réaction de séquence

Les produits de séquence sont purifiés en utilisant le kit BigDye® XTerminator™.

Le tableau 13 représente les différents réactifs utilisés pour la purification.

Réactif	Volume en µl
X-terminator	10
Sam (Tampon)	45
Produit de réaction de séquence	10

Tableau 5 : Le mélange réactionnel de la purification du produit de réaction de séquence

Les produits de séquence peuvent être conservés avant et après purification à -20°C. Le séquençage (électrophorèse capillaire et capture de la fluorescence des fragments par caméra CCD) est réalisé sur l'analyseur de séquences 3500Dx Geneticanalyzer (AppliedBiosystems, Life Technologies). Les séquences obtenues ont été visualisées en utilisant le logiciel Sequencinganalysis v3.4 qui permet d'évaluer la qualité des séquences.

#### 4. Caractérisation bio-informatique

Les résultats de la biologie moléculaire sont toujours mis en valeur par la bio-informatique qui est en train de devenir de plus en plus un outil indispensable pour le traitement des données dans les laboratoires de biologie moléculaire.

Ainsi, les séquences des différents patients ont été analysées par la suite en utilisant différents outils de Bio-informatique, notamment, l'outil d'alignement des séquences BLAST, les outils d'identification des variants détectés ainsi que les outils de prédiction de l'impact pathogénique.

##### ✓ **Alignement des séquences avec BLAST**

Les séquences générées par le séquenceur apparaissent sous forme d'une succession bien définie des lettres A, T, C et G, référant respectivement aux nucléotides Adénine, Thymines, Cytosine et Guanine.

Nous avons aligné nos séquences à celles présentes dans la base de données de NCBI via l'outil « Nucleotide BLAST » (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). BLAST affiche l'alignement détaillé des séquences similaires à la séquence obtenue. En cas d'absence de mutations, la succession des nucléotides de la séquence requête doit être complètement identique à celle de la séquence de référence d'une personne saine,

alors qu'en présence de variants, le pourcentage d'identité diminuera en fonction du nombre des différences détectées.

#### ✓ **Positionnement et nomenclature des variants**

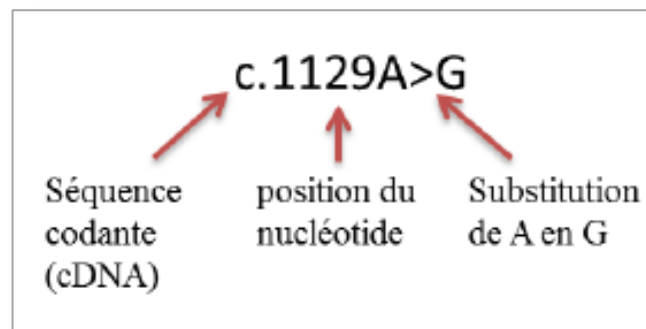
Bien que il s'avère efficace dans la révélation des variants, le programme BLAST ne donne pas une idée sur la position exacte de la mutation ni sur sa nomenclature. Pour obtenir ces informations, nous avons utilisé d'autres outils plus adaptés, il s'agit de l'option CCDS de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcidsBrowse.cgi>), en plus du site (<http://varnomen.hgvs.org>) qui présente les recommandations récentes de nomenclature des variants selon HumanGenome Variation Society (HGVS).

L'option CCDS affiche la séquence codante consensus du gène recherché, commençant par le codon initiateur ATG, et finissant par le codon stop. Ainsi, nous nous sommes servis de cet outil pour préciser la position du nucléotide exonique muté par rapport au premier nucléotide de l'ATG initiateur de la séquence codante CCDS (Consensus CodingSequence).

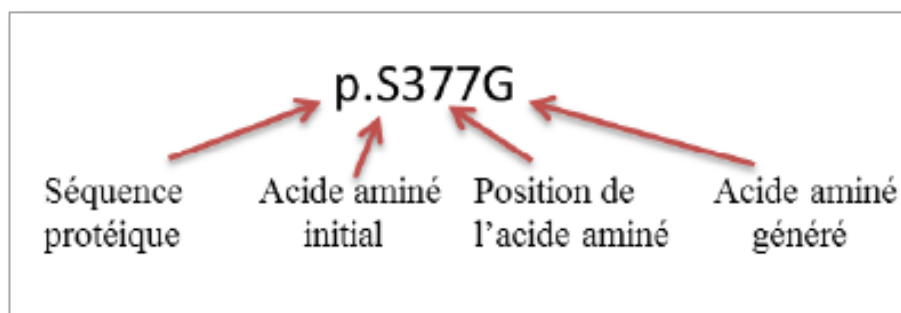
L'option CCDS affiche également la séquence protéique du gène recherché, ce qui permet également l'identification de la position de l'acide aminé affecté par rapport au codon Méthionine initiateur. De plus, cet outil dispose de la possibilité d'identifier le trinuécléotide renfermant le variant nucléotidique (selon le cadre ouvert de lecture correspondant), ce qui permet de déterminer le nouvel acide aminé généré après mutation, en se référant au code génétique.

Après réunion de ces informations (la position nucléotidique, la position protéique, le trinuécléotide sauvage et muté et l'acide aminé généré), nous nous sommes basés sur les dernières recommandations de l'HGVS pour générer les nomenclatures

des différents variants détectés. Le variant exonique est alors présenté comme le montrent les figures 23 et 24.

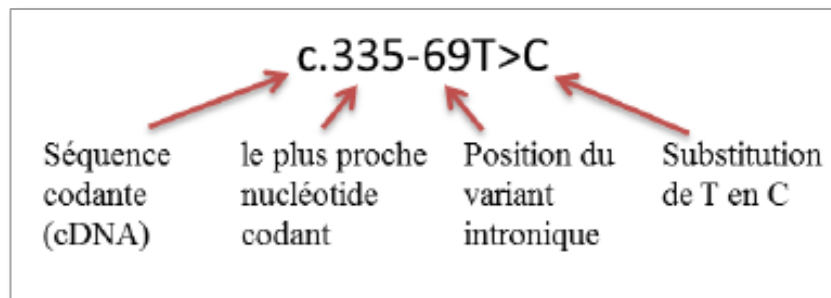


**Figure 23 :** Nomenclature HGVS d'un variant exonique par rapport au premier nucléotide de la séquence codante



**Figure 24 :** Nomenclature HGVS d'un variant protéique par rapport à l'acide aminé initiateur

Dans le cas de variants introniques, le positionnement selon la nomenclature HGVS est réalisé différemment (Figure 25). La position du variant est rapportée au plus proche nucléotide codant. Pour cela il faut se référer à la séquence qui présente l'ensemble des régions introniques et exoniques du gène. Le variant est alors présenté sous la forme illustrée dans la figure 25.



**Figure 25 :** Nomenclature HGVS d'un variant intronique par rapport au plus proche nucléotide de la séquence codante

Le site (<http://varnomen.hgvs.org>) présente également les recommandations de nomenclature des différentes formes d'insertion, délétion et duplication. Il faut noter que certains logiciels payants permettent de détecter les variants de la séquence requête et générer les nomenclatures simultanément au cours de l'alignement.

#### ✓ Recherche des variants dans les bases de données

Après génération de la nomenclature universelle des différents variants, nous avons procédé à la vérification de leur existence préalable dans les bases de données des variants, qui rapportent tous les variants identifiés jusqu'à présent dans un gène donné, avec les différentes informations correspondantes.

Nous avons utilisé les bases de données les plus connues et les plus complètes.

En particulier :

- NCBI SNP database (dbSNP) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>;
- NCBI Variation Viewer <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/view>;
- 1000 genomes <http://browser.1000genomes.org>;
- Human genome mutation database (HGMD) <http://www.hgmd.cf.ac.uk>;
- Exome Aggregation Consortium (ExAC) <http://exac.broadinstitute.org>;
- NHLBI exome sequencing project (ESP) <http://evs.gs.washington.edu/EVS>.

En cas d'absence du variant détecté dans les bases de données ainsi que dans les articles qui rapportent le résultat d'exploration du gène étudié, ce variant pourrait alors s'avérer un nouveau variant, non décrit dans la littérature.

#### ✓ **Alignement multiple des séquences**

Dans le but d'évaluer le degré de conservation des acides aminés affectés chez différentes espèces partageant un locus similaire, nous avons utilisé l'outil « HomoloGene » (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/>). Cet outil permet d'effectuer un alignement multiple entre la séquence requête (de l'espèce *Homo sapiens*) et les séquences homologues appartenant à différentes espèces, notamment, *Bostaurus*, *Mus musculus*, *Rattusnorvegicus*, *Xenopus tropicalis*. Plus l'acide aminé affecté est conservé entre les différentes espèces, plus il pourrait jouer un rôle primordial dans la fonction de la protéine.

#### ✓ **Prédiction in-silico de l'impact pathogénique**

Dans le but d'évaluer l'impact pathogénique des variants non-synonymes sur la fonction de la protéine, nous nous sommes servis des outils de prédiction *in-silico*. Il s'agit de logiciels bio-informatiques qui prédisent l'impact clinique le plus probable d'un variant en se basant sur l'évaluation de différentes caractéristiques. Il existe deux groupes majeurs d'outils de prédiction : les outils de prédiction qui se basent sur l'évaluation du degré d'homologie de la séquence protéique avec ses homologues ; et les outils dits « hybrides » qui se basent sur l'évaluation des caractéristiques structurelles de la protéine (la conformation tridimensionnelle, l'emplacement du variant par rapport à un domaine fonctionnel...), en plus des caractéristiques de l'homologie. Ainsi, nous avons opté pour l'utilisation de deux outils de prédiction appartenant respectivement à ces deux groupes, et qui sont largement utilisés pour

leurs performances. Il s'agit de PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/>), et PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>).

### ✓ Prédiction de l'impact pathogénique sur l'épissage

En cas de mutation silencieuse ou de variant intronique, la possibilité d'une altération directe de la fonction protéique est écartée. Cependant une altération indirecte de l'activité post-transcriptionnelle est toujours possible, telle que l'altération de l'épissage qui est une étape essentielle, avant la traduction, chez les eucaryotes.

Pour vérifier l'impact de ce type de variants sur le mécanisme de l'épissage, nous avons utilisé l'outil « HumanSplicing Finder » (HSF 3.0) (<http://www.umd.be/HSF3/HSF.html>) [196]. Cet outil est constitué de 12 algorithmes qui évaluent l'effet du variant sur les séquences consensus de l'épissage, à savoir, les sites donneur et accepteur, les points de branchement, ainsi que les séquences auxiliaires de régulation. Ces algorithmes se basent soit sur la méthode de comparaison des motifs, soit sur la méthode de "l'entropie maximale", ou sur la méthode « Position Weight Matrices » (Matrices Poids-Position).

Dans le cas des algorithmes basés sur la méthode de « la comparaison des motifs », le programme recherche, au niveau de la séquence requête, les motifs consensus de l'épissage, avant et après introduction du variant. Si le programme détecte l'apparition de l'un des motifs consensus de l'épissage, il indique alors « la création d'un nouveau site consensus d'épissage ». Par contre si, après introduction du variant, le programme détecte la disparition de l'un des motifs de l'épissage, il indique « l'altération d'un site consensus d'épissage » (Desmet et al. 2009).

Dans le cas des algorithmes basés sur la méthode des Matrices Poids-Position ou la méthode de l'entropie maximale, le programme procède de la façon suivante : il considère initialement le motif consensus recherché comme étant une séquence constituée de  $n$  nucléotides. Il procède ensuite au calcul du score total de chacune des séquences à  $n$  nucléotides. Ce score total correspond à la somme des scores individuels des  $n$  nucléotides. Le score individuel dépend notamment de la nature du nucléotide correspondant et de l'importance de sa position dans le motif présumé. Lorsque le score total un motif donné s'avère supérieur au score seuil, la séquence est alors considérée comme un « motif consensus d'épissage ». Les scores seuils fixés varient selon l'algorithme et le type du motif d'épissage en question. Ainsi, si le programme détecte une chute du score total au-dessous du score seuil, il indique l'altération d'un motif consensus d'épissage. Alors que s'il détecte une augmentation du score total au-dessus du score seuil il indique la création d'un nouveau motif consensus d'épissage.

Par ailleurs, la nature (pathogénique ou bénin) de l'effet détecté pour chaque variant dépendra principalement du rôle du motif affecté dans le processus de l'épissage. Ainsi, si le programme détecte une altération d'un motif impliqué dans l'induction de l'épissage, le variant s'avère alors à effet pathogénique. Cependant, si le programme détecte l'altération d'un motif impliqué dans la répression de l'épissage, le variant sera alors sans effet pathogénique.

## **5. Analyse Statistique**

Pour comparer les différents résultats obtenus dans ce chapitre, nous avons utilisé les tests statistiques de comparaison des fréquences et des pourcentages, à savoir, le test Khi carré et le test exact de Fisher. Ces tests ont été traités par le logiciel informatique SPSS.



## **II. Résultats**

La leucémie myéloïde chronique est une hémopathie maligne bien connue qui se caractérise par une prolifération et un développement incontrôlé des cellules hématopoïétiques, et chez la plupart des patients cette leucémie se définit par la translocation t (9 ; 22) (q34 ; q11), entraînant la formation du chromosome Philadelphie.

Cette étude vise à déterminer le profil clinique et génétique des patients atteints de la LMC tout en essayant d'étudier une probable association entre le type du transcrite BCR-ABL d'une part, et les données cliniques et hématologiques des patients d'autre part.

Dans la suite du manuscrit nous allons traiter dans un premier temps les caractéristiques épidémiologique, cliniques et hématologique des patients étudiés, alors que dans un deuxième temps, nous allons aborder le profil génétique des patients atteints de la LMC.

### **1. Caractérisation épidémiologique**

Nous avons recruté un total de 123 patients atteints de LMC, sur une période allant du mois de janvier 2016 jusqu'au mois de janvier 2020.

L'intégralité de nos patients touchés par la LMC proviennent de la région de Fès-Meknès.

### 1.1 Répartition selon le sexe

Sur les 123 patients recrutés dans notre étude, 59 étaient des femmes soit 48% et 64 étaient des hommes soit 52%, avec un sexe ratio Homme-Femme de 1,08 soit une légère prédominance masculine.

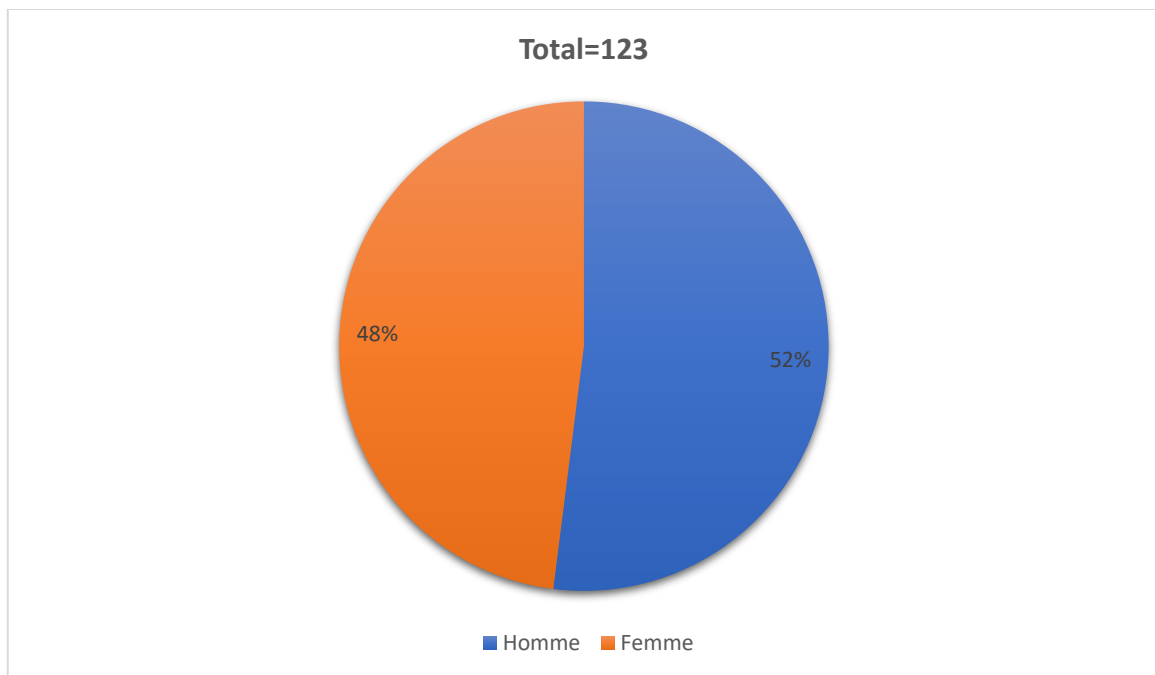


Figure 26 : La répartition des deux sexes dans la population étudiée

## 1.2 Répartition selon l'âge

L'âge de nos patients se situait entre 18 et 86 ans, avec une moyenne de 50,11 ans. Sur l'ensemble de la population étudiée 32 % avaient moins de 45 ans et 68 % étaient âgés de 45 ans ou plus. La moyenne d'âge chez les hommes était de 53 ans alors qu'elle était de 47,5 ans chez les femmes (Figure 27), en générale la médiane d'âge est de 50 ans.

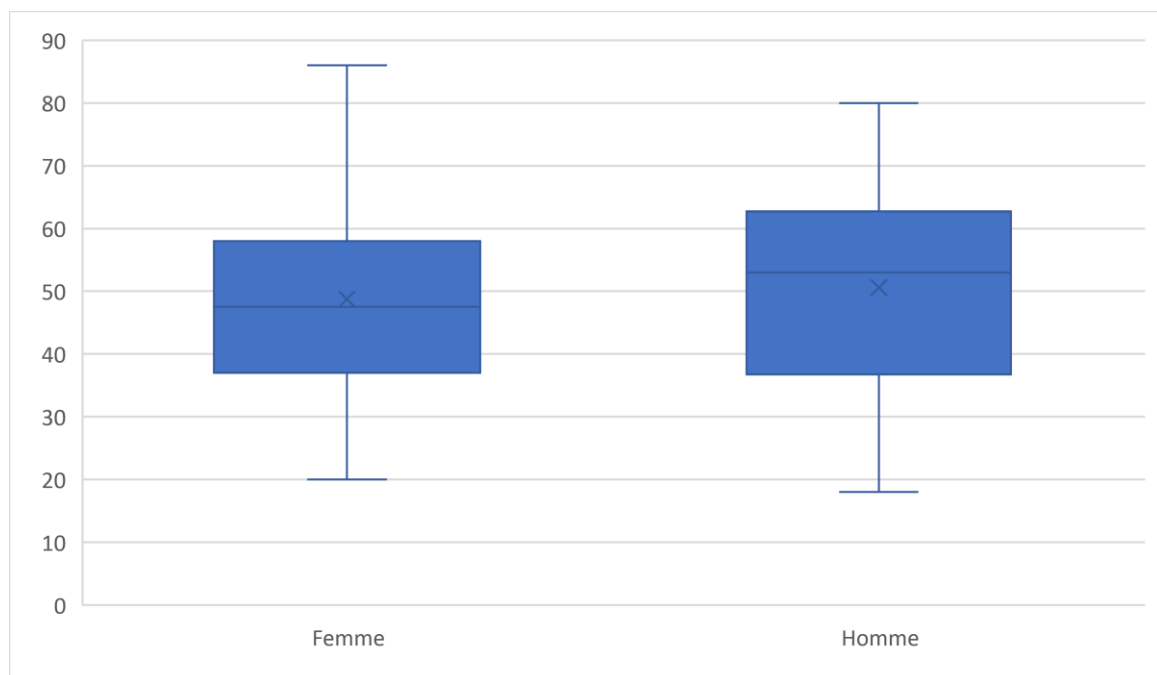
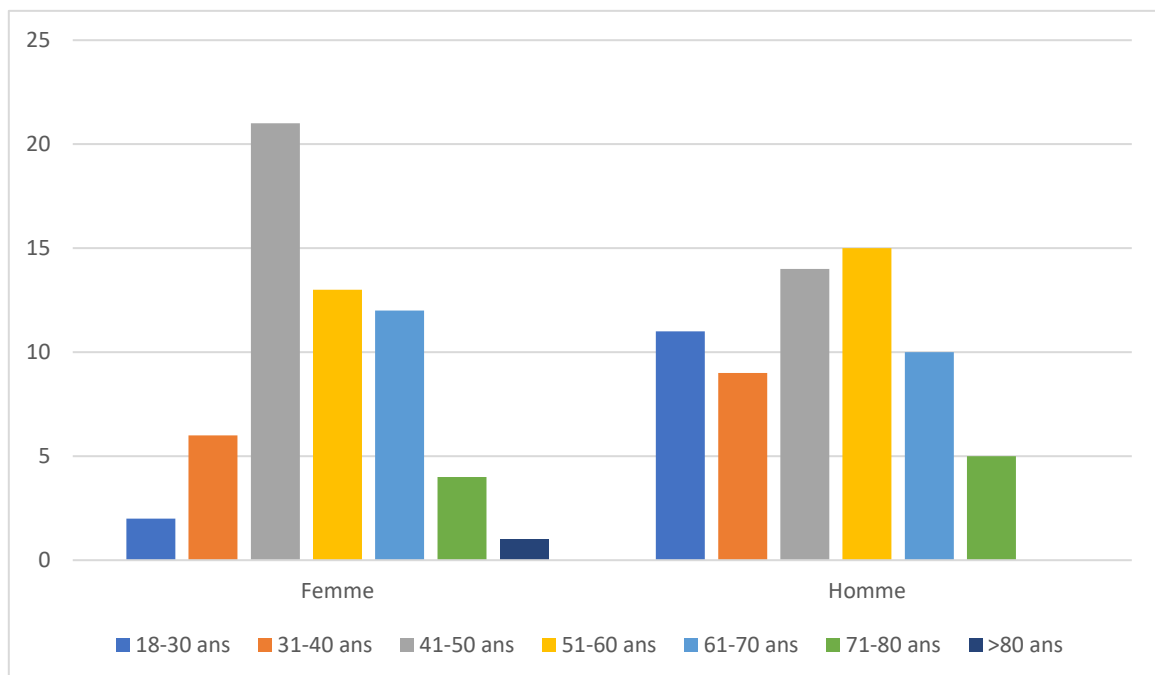


Figure 27 : Diagramme des moyennes d'âge chez les deux sexes.

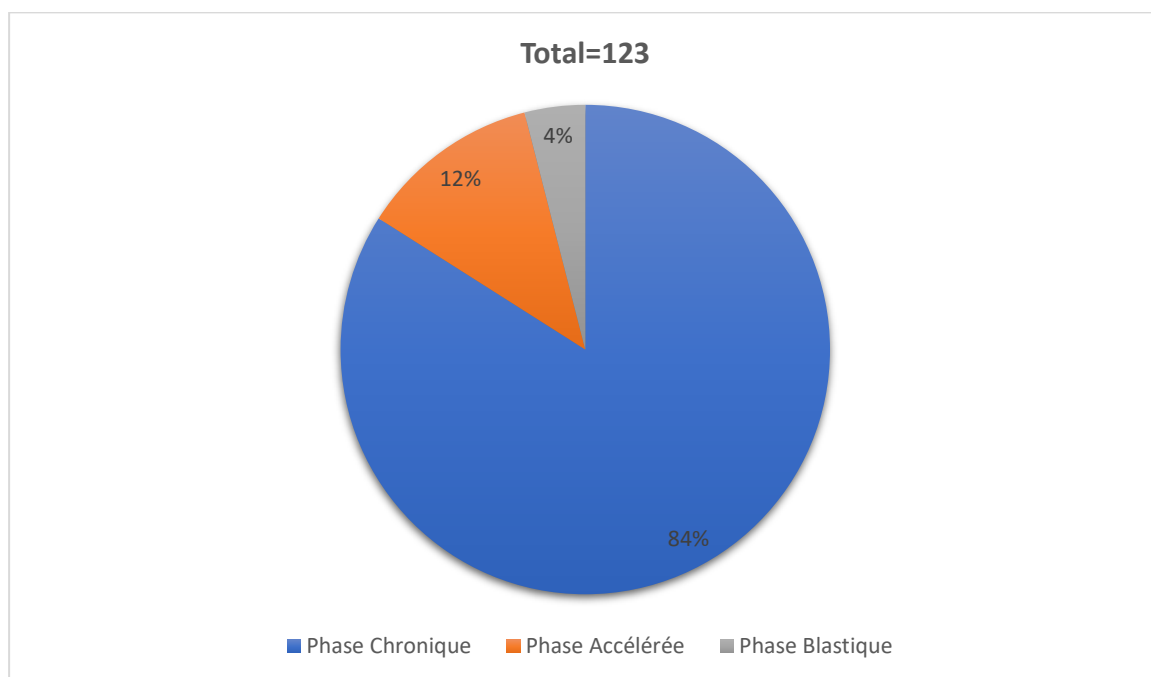
Dans notre population, les tranches d'âge de 18 ans à 30ans, 31 ans à 40 ans, 51 ans à 60 ans, et de 71 ans à 80 ans sont des groupes d'âge plus dominantes chez les hommes que chez les femmes, alors que la classe d'âge de 41 ans à 50 ans s'avère considérablement prédominante chez les femmes par rapport à son analogue chez les hommes. Les tranches d'âge de 61 ans à 70 ans sont très proches chez les deux sexes alors que la classe supérieure à 80 ans est absente chez les hommes (Figure 28).



**Figure 28** : Diagramme de comparaison des moyennes d'âge selon le sexe.

## 2. Caractérisation clinique

La leucémie myéloïde chronique évolue en trois phases différentes qui se succèdent les unes après les autres, dans notre étude la phase chronique est le stade dominant dans la plupart des cas, 103 patients parmi les 123 soit 84% sont dans cette phase, suivi par une phase accélérée chez 15 patients soit 12% et une phase blastique chez 5 patients soit 4% des patients.



**Figure 29** : La répartition des phases de la LMC.

Dans notre cohorte 49,76% des individus explorés avaient une splénomégalie, 17,88% une hépatosplénomégalie, tandis que 25,20% souffraient d'une plénitude abdominale, qui dans la moitié des cas était représenté par des douleurs abdominales. L'asthénie et l'amaigrissement sont des symptômes fréquents de la LMC, dans notre population 20,08% des patients présentaient une asthénie et 18,73% des patients présentaient un amaigrissement.

Variable	NTP(n=123)	PC (n=103)	PC (%)	PA (n=15)	PA (%)	PB (n=5)	PB (%)
Age (Ans)	<45	33	32,04	5	33,33	1	20
	>45	70	67,96	10	66,67	4	80
Sexe	Homme	54	52,48	6	40	4	80
	Femme	49	47,52	9	60	1	20
Asthénie	Non	70	67,96	11	73,33	5	100
	Oui	33	32,04	4	26,67	0	0
Splénomégalie	Non	54	52,43	3	20	5	100
	Oui	49	47,57	12	80	0	0
Hépatosplénomégalie	Non	90	87,38	12	80	0	0
	Oui	13	12,62	3	20	5	100
Amaigrissement	Non	82	79,61	13	86,67	5	100
	Oui	21	20,39	2	13,33	0	0
AEG	Non	88	85,44	9	60	0	0
	Oui	15	14,56	6	40	5	100
Fièvre	Non	88	85,44	15	100	5	100
	Oui	15	14,56	0	0	0	0
Épistaxis	Non	100	97,09	15	100	5	100
	Oui	3	2,91	0	0	0	0
Plénitude abdominal	Non	80	77,67	7	46,67	5	100
	Oui	23	22,33	8	53,33	0	0
Douleurs abdominales	Non	88	85,44	7	46,67	5	100
	Oui	15	14,56	8	53,33	0	0
Anémie	Non	90	87,38	11	73,33	5	100
	Oui	13	12,62	4	26,67	0	0
Dyspnée	Non	100	97,09	15	100	5	100
	Oui	3	2,91	0	0	0	0
Diarrhée	Non	100	97,09	15	100	5	100
	Oui	3	2,91	0	0	0	0
Apyrexie	Non	102	99,03	11	73,33	5	100
	Oui	1	0,97	4	26,67	0	0
Toux	Non	100	97,09	15	100	5	100
	Oui	3	2,91	0	0	0	0
Nausée	Non	98	95,15	15	100	5	100
	Oui	5	4,85	0	0	0	0
Anorexie	Non	96	93,20	15	100	5	100
	Oui	7	6,80	0	0	0	0
Pâleur cutanée	Non	96	93,20	15	100	5	100
	Oui	7	6,80	0	0	0	0
Ichthyoses/ Ecchymose	Non	94	91,26	15	100	5	100
	Oui	9	8,74	0	0	0	0
Hépatite C	Non	100	97,09	15	100	5	100
	Oui	3	2,91	0	0	0	0
Tachycardie	Non	100	97,09	15	100	5	100
	Oui	3	2,91	0	0	0	0

Tableau 14 : Présentation de l'âge, le sexe, et les symptômes en nombres, et en pourcentage selon la phase de la maladie dans notre population (NTP: nombre total des patients, PC: phase chronique, PA: phase accélérée, PB: phase blastique)

### 3. Caractérisation hématologique

Le plus souvent, la découverte de la maladie est fortuite, liée à une forte augmentation des leucocytes. Les phases de la LMC sont déterminées surtout en termes de nombre de cellules souches immatures, qu'on appelle les blastes, dans la moelle et dans le sang. Plus on retrouve de cellules immatures dans ces tissus, et plus la maladie sera à un stade avancé. L'examen de référence pour évoquer le diagnostic de LMC est l'hémogramme ou NFS (Numération Formule Sanguine). C'est le premier examen qui sera effectué.

	Moyenne $\pm$ écart-type	Minima-Maxima	Valeurs normales
Leucocytes ( $10^9/L$ )	319,1 $\pm$ 172,5	2,9-756	4 - 10
Les plaquettes ( $10^9/L$ )	387,0 $\pm$ 208,1	39-1400	150 - 400
Blastes (%)	6,951 $\pm$ 11,55	1-93	0 - 0,26

**Tableau 15** : Résultats hématologiques de notre étude avec les intervalles des valeurs normales

En règle générale, notre étude montre tout d'abord une forte hyperleucocytose avec un taux moyen de globules blancs de l'ordre de  $319,1 \times 10^9$  éléments/litre plus ou moins  $172,5 \times 10^9$  éléments/litre (une valeur normale doit être entre  $4 \times 10^9$  éléments/litre et  $10 \times 10^9$  éléments/litre) (Tableau 15). Cette hyperleucocytose est spécialement constituée de polynucléaires neutrophiles, mais dont le taux ne sera que de l'ordre de 30 à 50%, car elle est souvent associée à une forte myélémie.

La myélémie est la transition anormale d'éléments immatures de la granulopoïèse (comme les promyélocytes, les myélocytes, les métamyélocytes et à moindre degré les myéloblastes) dans la circulation sanguine. Au niveau de la présente étude nous avons décelé un pourcentage de blastes de l'ordre de 6,951% avec un écart-type allant jusqu'à 11,55%.

Un syndrome anémique léger est aussi souvent présent dans notre cohorte.

Par ailleurs, le taux des plaquettes est souvent légèrement augmenté entre  $178,9 \times 10^9$ /litre et  $595,1 \times 10^9$ /litre (les valeurs normales sont comprises entre  $150 \times 10^9$ /litre et  $400 \times 10^9$ /litre). Ce paramètre peut parfois être supérieur à  $1 \times 10^{12}$ /litre, parfois normal, ou même exceptionnellement abaissé.

Myélogramme : Tous nos patients ont bénéficié d'un myélogramme, qui a confirmé le diagnostic de leucémie myéloïde chronique.

#### **4. Caractérisation du profil génétique**

##### **4.1 Caractérisation du profil génétique des patients atteints de la LMC et corrélation entre le type du transcrit BCR-ABL et les données cliniques et hématologiques**

Dans le but de déterminer le type de transcrit BCR-ABL chez les patients LMC porteurs du chromosome de Philadelphie, nous avons procédé à l'extraction d'ARN des échantillons sanguins frais, ensuite nous avons converti l'ARN extrait en ADNc qui a servi de matrice pour amplifier 14 types de transcrits BCR-ABL en employant la PCR-Multiplex.

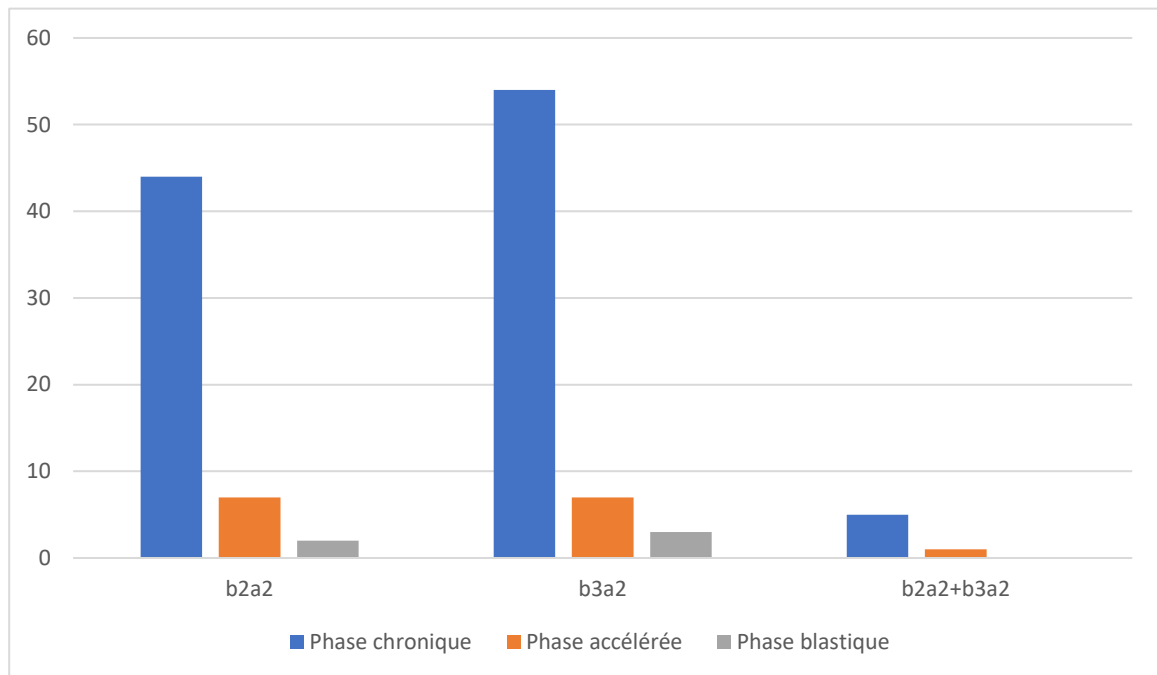
Dans le but de déterminer une association probable entre le type de transcrit BCR-ABL et les données hématologiques et cliniques des patients, nous avons réalisé une étude statistique de corrélation qui vise à comparer les variables entre les deux groupes b3a2 et b2a2. Les patients ayant montré une co-expression des deux variants ont été fusionné avec le groupe des patients b3a2, en raison du faible effectif de ce groupe (Tableau 16).



Variable	Transcrit BCR-ABL		
	b2a2 n=53	b3a2 n=70	<i>p</i> value
<b>Age</b>			
Moyenne ± ET	48.45±15.23	51.37±15.36	0.297
Minima-Maxima	18-79	18-86	
<b>Sexe (%)</b>			
Masculin	30.30	69.7	0.143
Féminin	56.52	43.48	
<b>Leucocytes (10<sup>9</sup>/L)</b>			
Moyenne ± ET	335.8±181.6	306.5±165.5	0.535
Minima-Maxima	2.9-754	11-765	
<b>Plaquettes (10<sup>9</sup>/L)</b>			
Moyenne ± ET	393.8±235.1	381.9±186.7	0.755
Minima-Maxima	49-1400	39-946	
<b>Blastes (%)</b>			
Moyenne ± ET	5.34±6.445	8.17±14.17	0.179
Minima-Maxima	1-35	1-93	

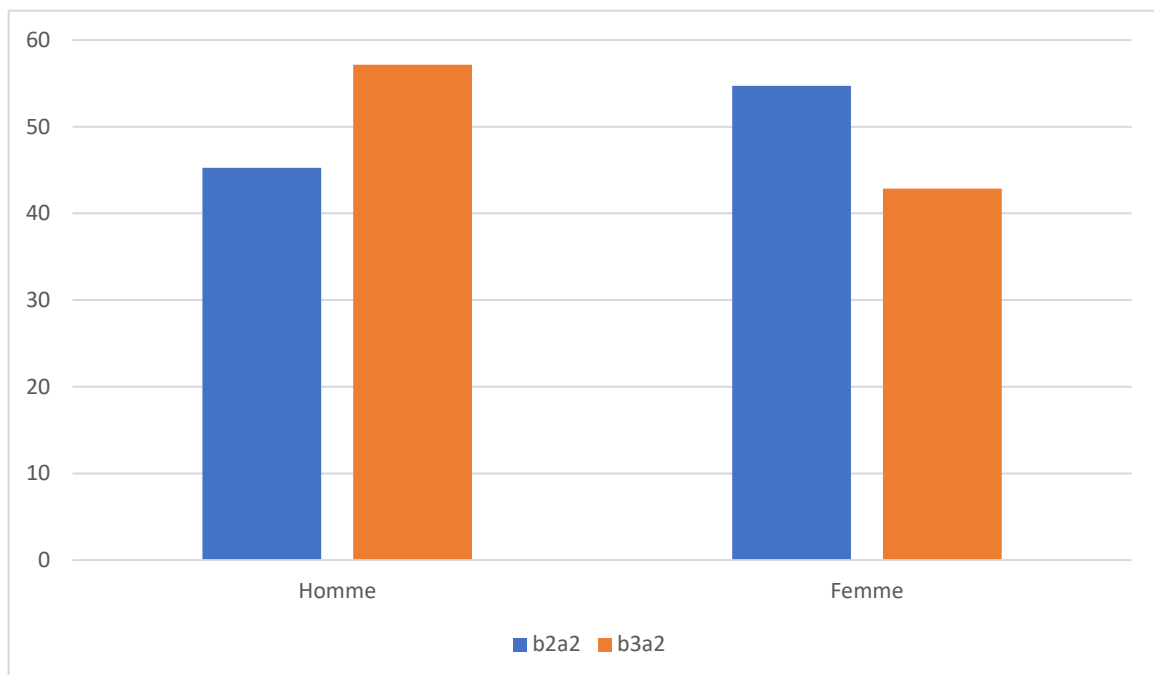
**Tableau 6:** Données cliniques et hématologiques fondées sur le type de transcrit BCR-ABL

Les résultats obtenus montrent une dominance du transcrit b3a2 par rapport au b2a2. En effet, 53 patients (43%) étaient positifs pour le variant b2a2, tandis que 64 patients (52%) étaient positifs pour le variant b3a2. Une co-expression des deux transcrits a été également notée chez 6 patients (5%). Dans chaque groupe, la majorité des patients étaient en phase chronique (Figure 30).



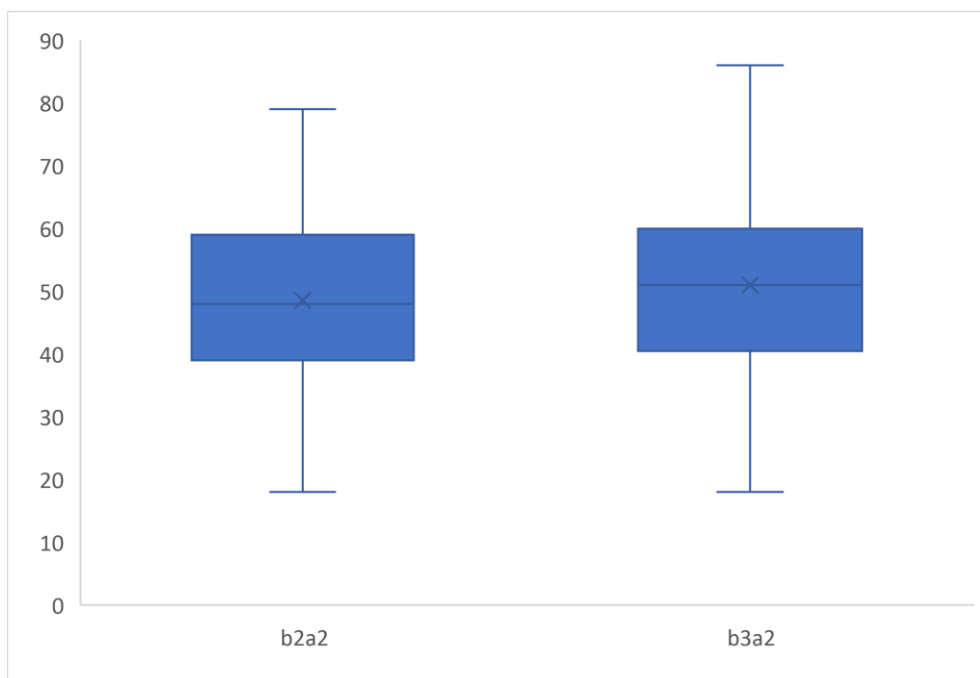
**Figure 30 :** Répartition des phases de la maladie en fonction du type du transcrit BCR-ABL.

D'après les résultats obtenus, les Hommes exprimaient plus le variant b3a2 (57,14 %) par rapport aux femmes (42,86 %). Cependant, les femmes (54,72 %) exprimaient le transcrite b2a2 plus que les Hommes (45,28 %) (Figure 31). La comparaison de la différence de sexe observé entre les groupes des patients b2a2 et b3a2 en employant le test de khi-carré était statistiquement non significative ( $p=0.143$ ) (Tableau 16).



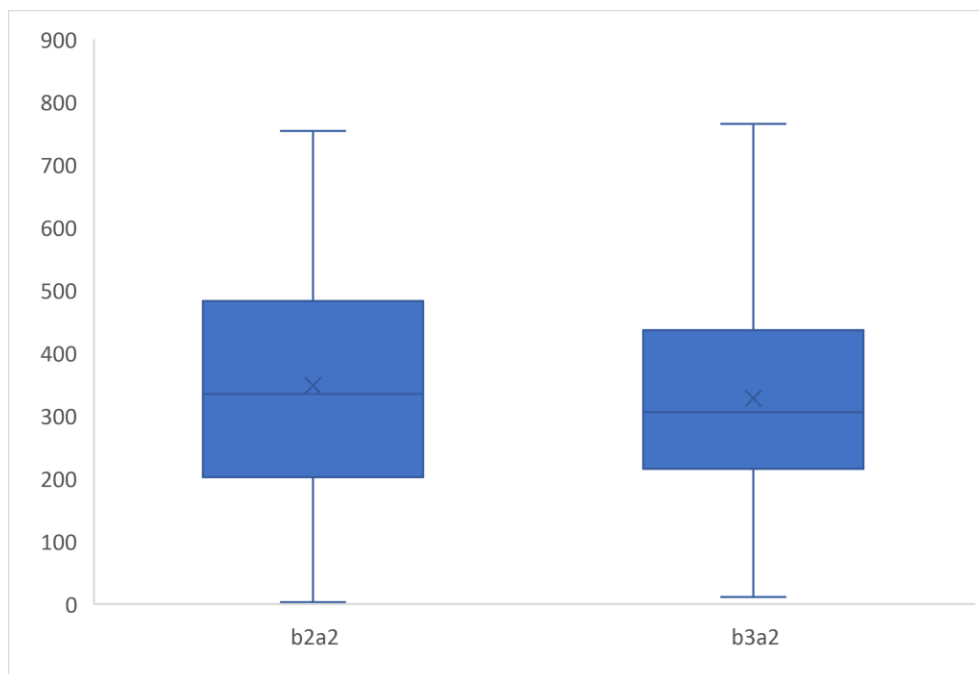
**Figure 31** : Répartition du sexe en fonction du type de transcrite BCR-ABL

La comparaison des moyennes d'âge entre les deux groupes a montré que les sujets porteurs du transcrit b2a2 ( $48,45 \pm 15,23$  ans) étaient plus jeunes que les sujets porteurs du transcrit b3a2 ( $51,37 \pm 15,36$  ans) (Figure 32). Cependant, le test t de Student a montré que cette différence est statistiquement non significative ( $p=0,297$ ) (Tableau 16).



**Figure 32 :** Comparaison de la moyenne d'âge en fonction du type de transcrit BCR-ABL.

Concernant le taux des cellules sanguines, les résultats montrent un taux plus élevé de globules blancs (leucocytose) dans le groupe de patients exprimant le transcrite b2a2. En effet, la moyenne du taux des leucocytes dans ce groupe a atteint  $335,8 \pm 181,6 \times 10^9/l$ , alors que les patients porteurs du transcrite b3a2 présentaient des valeurs plus faibles (moyenne  $306,5 \pm 165,5 \times 10^9/l$ ). La comparaison des moyennes par test de t de Student a conclu que la différence observée est statistiquement non significative ( $p=0.535$ ).



**Figure 33 :** Comparaison du taux moyen des leucocytes en fonction de type de transcrite BCR-ABL.

Pour ce qui concerne le taux des plaquettes, les résultats révèlent un taux de plaquettes plus élevé dans la section de patients exprimant le transcrite b2a2. D'ailleurs, la moyenne du taux des plaquettes dans ce groupe a atteint  $393,8 \pm 235,1 \times 10^9/L$ , tandis que les patients porteurs du transcrite b3a2 présentaient des valeurs réduites, avec une moyenne de  $381,9 \pm 186,7 \times 10^9/L$ . La comparaison des moyennes par test de Student a conclu que la différence remarquée est statistiquement non significative ( $p=0.755$ ).

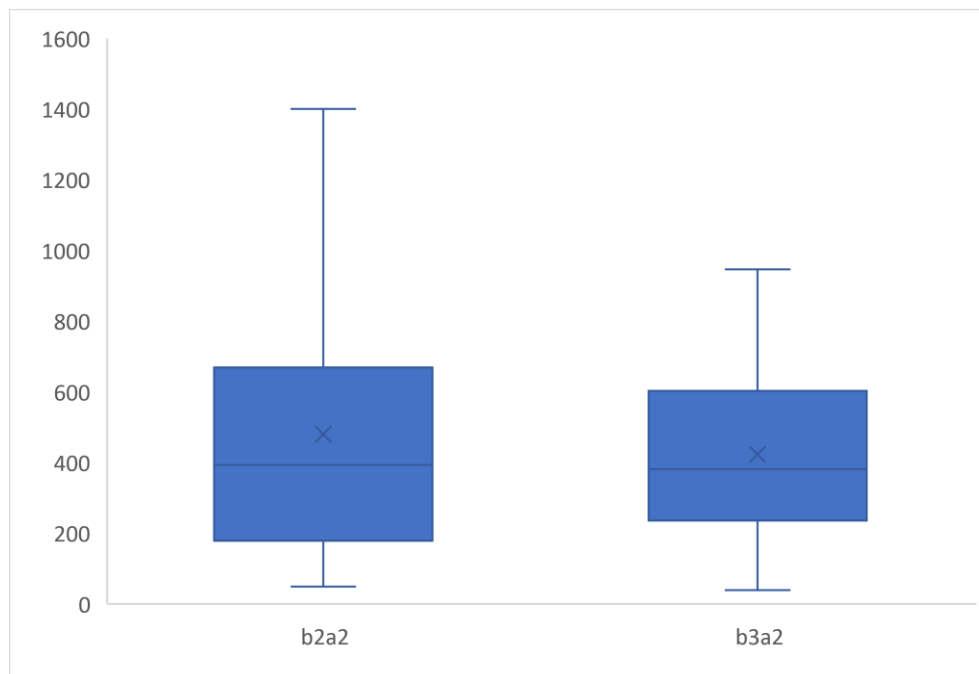


Figure 35 : Moyenne du taux des plaquettes selon le type de transcrite BCR-ABL

Au sujet du pourcentage des blastes circulants, les résultats montrent une expression dominante des blastes dans la tranche des patients exprimant le transcrite b3a2. Par ailleurs, la moyenne du taux des blastes dans ce groupe était de 8,17%, cependant les patients porteurs du transcrite b2a2 présentait des valeurs plus faibles de l'ordre de 5,34%. La comparaison des moyennes par test de Student a démontré que la différence observée est statistiquement non significative ( $p=0.179$ ).

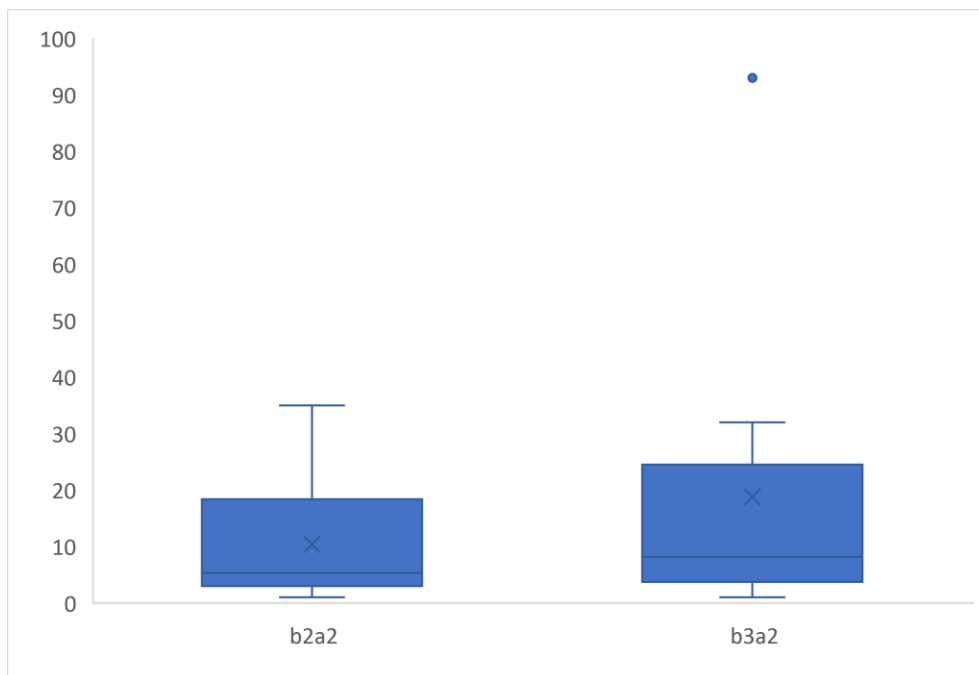


Figure 36 : Moyenne du pourcentage des blastes selon le type de transcrite BCR-ABL

#### **4.2 Suivi de l'évolution de la maladie résiduelle par quantification des marqueurs moléculaires du gène de fusion**

L'objectif initial du traitement des personnes atteintes de LMC est de ramener la numération globulaire aux valeurs normales, suivi d'une réduction prononcée ou de l'élimination de l'ensemble des cellules leucémiques tout en conservant pour le patient une qualité de vie acceptable. Les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) sont des médicaments qui ciblent la protéine BCR-ABL anormale qui entraîne la croissance incontrôlée des cellules leucémiques. Une fois le traitement mis en place, les patients doivent être suivis pour évaluer leur réponse au traitement. Cela s'avère crucial pour déterminer si l'on obtient une réponse appropriée, si la posologie doit être augmentée ou si un autre traitement doit être instauré.

L'objectif principal de ce chapitre, est d'évaluer la réponse au traitement chez 90 patients LMC en phase chronique ayant reçu l'Imatinib durant une année. Une réponse moléculaire majeure signifie qu'une faible proportion de cellules de sang exprime le gène de fusion Bcr-Abl. Afin d'achever cet objectif, nous avons employé la transcription inverse quantitative en temps réel (qRT-PCR). Il s'agit d'une méthode hautement sensible pour détecter les faibles nombres de copies des produits de fusion BCR-ABL. La qRT-PCR par sa sensibilité et sa standardisation, apporte un puissant outil pour évaluer l'efficacité du traitement et déceler précocement les patients résistants apportant au clinicien un critère biologique décisionnel lui permettant de mieux adapter la thérapeutique.

La population étudiée a inclus 90 patients atteints de LMC en phase chronique ayant reçu un diagnostic moléculaire de la maladie au préalable. Ces patients ont reçu un traitement par Imatinib durant une année. L'âge moyen de la population était de 51.18 ans avec un légère prédominance du sexe masculin (52.2%).



La réponse moléculaire majeure a été obtenue chez 68 patients (75.5%), tandis que 24.5% des cas ont montré un taux de Bcr-Abl supérieur à 0.1%, ce qui est traduit comme absence de rémission moléculaire. Le transcrite b3a2 est le variant majoritaire (62%) chez les patients ayant montré une réponse au traitement (Figure 37). L'étude de corrélation entre le type de transcrite et la réponse au traitement a montré que la différence observée est statistiquement non significative ( $p=0.99$ ) (Tableau 17).

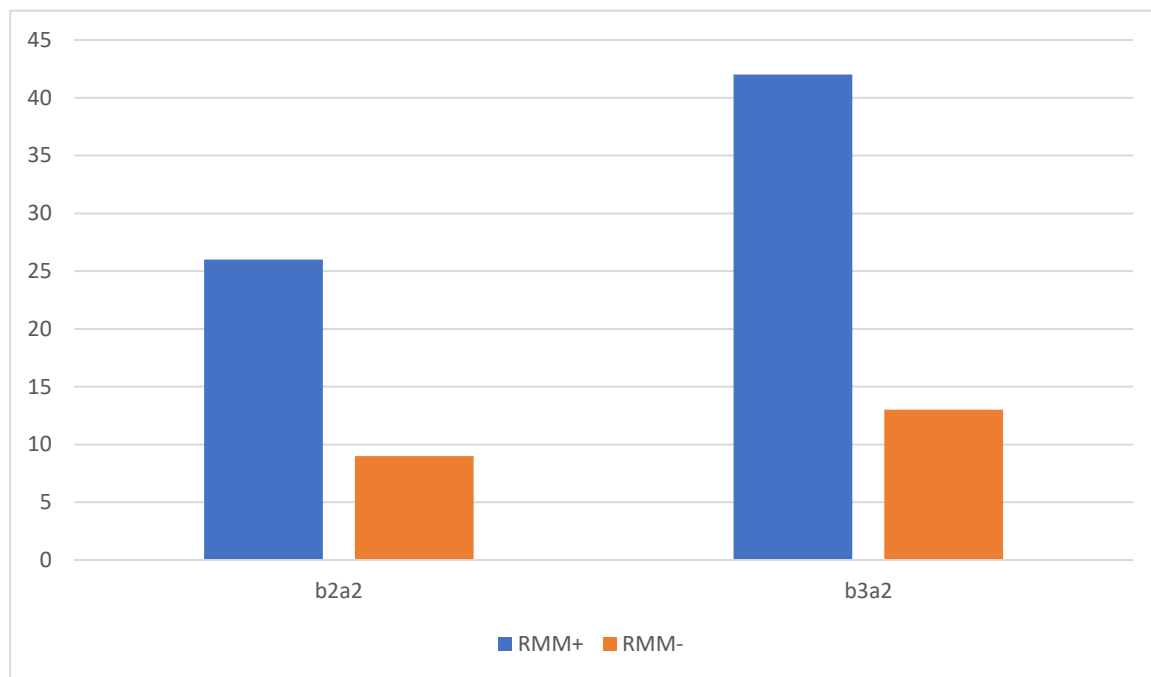
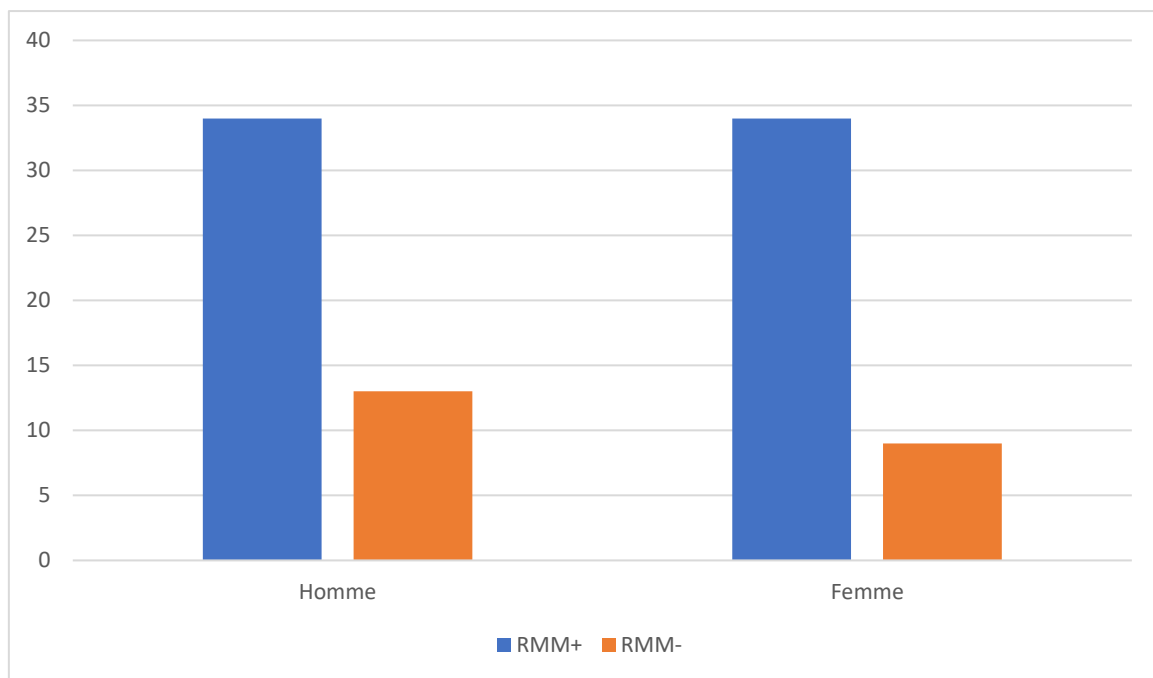


Figure 37 : Réponse moléculaire en fonction du type de transcrite BCR-ABL

	RMM+	RMM-	p-value
<b>b3a2</b>	42 (62%)	13 (59%)	0.99
<b>b2a2</b>	26 (38%)	9 (41%)	

Tableau 7: Réponse moléculaire en fonction du type de transcrite BCR-ABL

Nous avons également étudié une probable association entre la présence de rémission moléculaire et le sexe (Figure 38). Les résultats de l'étude statistique montrent que la réponse moléculaire majeure chez les femmes était similaire à celle des hommes, bien que l'absence de cette réponse fût un peu plus élevée chez les hommes que chez les femmes, cette différence n'a pas atteint le seuil de signification statistique ( $p=0.47$ ).



**Figure 38** : Réponse moléculaire en fonction du sexe des patients

	RMM+	RMM-	p-value
<b>Homme</b>	34 (50%)	13 (59,09%)	0.47
<b>Femme</b>	34 (50%)	9 (40,91%)	

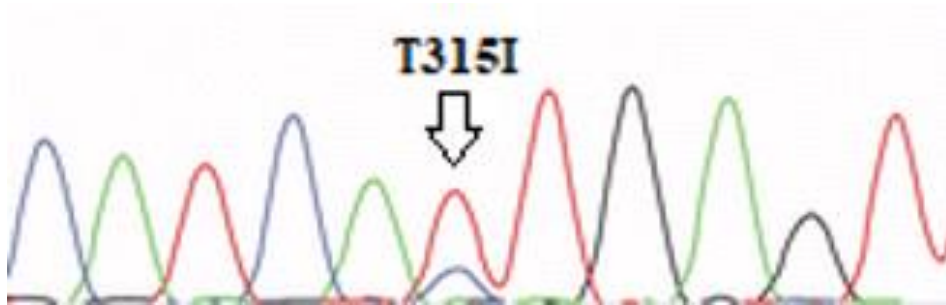
**Tableau 18** : Réponse moléculaire en fonction du sexe des patients

#### 4.3 Exploration moléculaire des facteurs génétiques responsables de la résistance au traitement

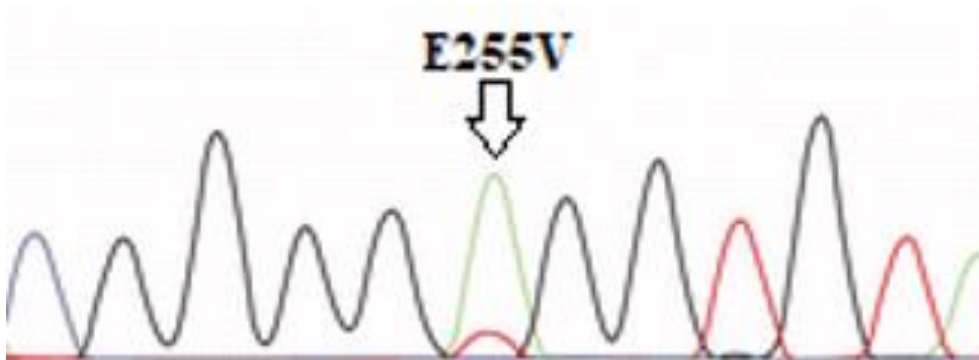
Les cellules de la leucémie myéloïde chronique acquièrent une résistance à la tyrosine kinase par le biais de mutations dans le domaine de la kinase ABL. La mutation T315I est la mutation la plus fréquente, et est à l'origine de la résistance à l'imatinib, au dasatinib, au nilotinib et au bosutinib, alors que sa sensibilité au ponatinib persiste [87].

L'objectif de ce chapitre est de révéler chez nos patients l'étiologie moléculaire derrière l'apparition de la résistance aux traitements par les inhibiteurs de la tyrosine kinase, notamment l'Imatinib. Pour cela, nous avons opté pour le séquençage du domaine kinase du transcrite Bcr-Abl à la recherche d'éventuelles mutations pouvant expliquer la résistance chez les patients étudiés en vue de personnaliser la thérapie.

Parmi les vingt-deux patients avec absence de rémission moléculaire. Nous avons pu séquencer uniquement les échantillons de 7 patients afin d'analyser le domaine kinase. Les résultats obtenus ont montré la présence de mutations au niveau du transcrite Bcr-Abl chez tous ces patients (100%). La mutation T315I était présente chez 4 patients (57.1%) (Figure 39). Deux patients (28.6%) étaient porteurs de la mutation E255V (Figure 40).



**Figure 39** : Résultats de l'analyse du séquençage du gène BCR-ABL montrant la présence de la mutation T315I dans le domaine de la kinase ABL



**Figure 40** : Résultats de l'analyse du séquençage du gène BCR-ABL montrant la présence de la mutation T315I dans le domaine de la kinase ABL

Une patiente malheureusement décédée, a présenté deux mutations, une mutation habituelle G250E et une autre mutation qui après analyse par plusieurs logiciels bio-informatique s'est avérée nouvelle et pathogène.

### III. Discussion

Nous avons mené cette étude dans le but d'établir, dans un premier temps, le diagnostic moléculaire de 123 patients atteints de LMC, en identifiant les types de transcrits BCR-ABL. Nous avons ensuite réalisé une étude de corrélation entre le type de transcrit et les données épidémiologiques, cliniques et hématologiques. La population étudiée était constituée de 123 patients dans les différentes phases de la maladie. Dans un second temps, nous avons déterminé la réponse moléculaire chez 90 patients et séquencé le domaine tyrosine kinase ABL chez les patients résistants au traitement.

#### 1. Données épidémiologiques

##### 1.1 L'âge

Dans notre série l'âge de nos patients se situait entre 18 et 86 ans, avec une moyenne de 50,11 ans. Nous avons comparé nos résultats avec ceux d'autres séries (Tableau 19).

	Age moyen au diagnostic	Extrêmes
El Mouhdi 2015 (Fès) [88]	47,2 ans	[13-77]
Z. Salah Eddine 2019 (Meknès) [90]	43,1 ans	[16-75]
Nachi et al. 2019 (Algérie) [89]	48,5 ans	[19-78]
Notre série	50,11 ans	[18-86]

Tableau 19 : La comparaison d'âge des différentes séries rapportées

Nos résultats rejoignent ceux de la série d'El Mouhdi [88] et de Nachi et al. [89]. On note cependant une légère différence avec les résultats de la série de Z. Salah Eddine[90].

## 1.2 Le sexe

Sur les 123 patients recrutés dans notre étude, 59 étaient des femmes soit 48% des cas tandis que 64 patients étaient des hommes soit 52%, avec un sexe ratio Homme–Femme de 1,08. On note alors une légère prédominance masculine. La distribution de la population en fonction du sexe a fait apparaître une nette prédominance masculine dans d'autres séries nord africaines. (Tableau 20).

	Sexe ratio
El Mouhdi 2015 (Fès)	0,96
Z. Salah Eddine 2019 (Meknès)	1
Nachi et al. 2019 (Algérie)	1,04
Baccarani et al. 2019 (Afrique)	1,33
Notre série	1,08

Tableau 20 : le sexe–ratio des différentes séries rapportées

En effet l'étude de Nachi et al. , réalisée sur une population Algérienne, montre un sexe ratio (H:F) de 1,04, alors que l'étude de Baccarani et al. [91], effectuée sur une très large cohorte provenant des cinq continents, montre un sexe ratio global de l'ordre de 1,33.

## **2. Données cliniques**

### **2.1 Phases de la maladie**

Environ 90 % des patients atteints de la LMC sont en phase chronique au moment du diagnostic [92].

Dans notre étude, 84% des patients étudiés étaient en phase chronique avec un effectif de 103 patients sur un total de 123, ce qui rejoint les données de la littérature.

15 individus (12,20%) étaient en phase accélérée dans notre étude. En comparaison, dans la série de Williams et al. 2013 [93], 8,57% des patients (soit trois patients sur 35) étaient en phase accélérée. Cette légère différence pourrait être due à la différence des tailles des échantillons comparés.

Concernant la phase blastique, 5 de nos patients soit 4% étaient dans cette phase. Ces résultats rejoignent ceux de la littérature.

### **2.2 Examen clinique**

#### **2.2.1 Splénomégalie**

La splénomégalie a été retrouvée chez 49,76% des patients inclus dans notre étude. Nous avons comparé ces résultats avec ceux d'autres séries dans le Tableau 21.

	<b>Taux de splénomégalie</b>
<b>El Mouhdi (Fès)</b>	88,67%
<b>Z. Salah Eddine (Meknès)</b>	90%
<b>David G. et al [94] (Angleterre)</b>	75,8%
<b>Notre série</b>	49,76%

**Tableau 21 : Taux de splénomégalie dans les différentes séries**

La splénomégalie représente le maître symptôme dans notre étude, ceci concorde avec les données des différentes séries d'études.

### 2.2.2 Hépatomégalie

L'hépatomégalie a été retrouvée chez 25,20% des individus explorés dans notre étude. Nous avons comparé ces résultats avec ceux d'autres séries dans le Tableau 22.

	Taux d'hépatomégalie
El Mouhdi (Fès)	15%
Z. Salah Eddine (Meknès)	5%
David G. et al (Angleterre)	2,2%
Notre série	25,20%

Tableau 22 : Taux d'hépatomégalie dans les différentes séries

Nous remarquons une grande disparité statistique entre les différentes séries d'études, l'hépatomégalie n'est pas un symptôme aussi fréquent que la splénomégalie. Cependant, ce symptôme doit être recherché systématiquement lors de l'examen clinique.

## 2.3 L'hémogramme

L'examen de référence pour évoquer le diagnostic de LMC est l'hémogramme ou NFS (Numération Formule Sanguine). C'est le premier examen qui sera effectué.

### 2.3.1 Leucocytes

Les résultats de notre étude montrent une forte hyperleucocytose chez nos patients avec un taux moyen de globules blancs de l'ordre de  $319,1 \times 10^9$  éléments/litre plus ou moins  $172,5 \times 10^9$  éléments/litre. Avec des extrêmes allant de 2,9



$\times 10^9$  éléments/litre à  $756 \times 10^9$  éléments/litre. Nous avons comparé nos résultats avec ceux d'autre séries d'études dans la le tableau 23.

	Taux moyen de leucocytes	Extrêmes
El Mouhdi (Fès)	$239 \times 10^9$ éléments/litre	27 à $431 \times 10^9$ éléments/litre
Z. Salah Eddine (Meknès)	$164,26 \times 10^9$ éléments/litre	150 à $346 \times 10^9$ éléments/litre
David G. et al (Angleterre)	$174 \times 10^9$ éléments/litre	5 à $850 \times 10^9$ éléments/litre
Notre série	$319,1 \times 10^9$ éléments/litre	2,9 à $756 \times 10^9$ éléments/litre

**Tableau 23** : Taux de leucocytes dans différentes séries

L'hyperleucocytose dans notre étude est plus élevée que ceux d'autres études similaires. Cela peut être explique par la différence de la taille de la population étudiée dans chaque étude.

### 2.3.2 Les plaquettes

Dans notre cohorte, le taux moyens des plaquettes était de  $387 \times 10^9$  /litre, avec des extrêmes allant de 39 à  $1400 \times 10^9$  éléments/litre. Ces résultats sont comparés avec ceux d'autres études dans le tableau 24.

	Taux moyen de plaquettes	Extrêmes
El Mouhdi (Fès)	–	116 à $1071 \times 10^9$ éléments/litre
Z. Salah Eddine (Meknès)	$391 \times 10^9$ éléments/litre	143 à $1805 \times 10^9$ éléments/litre
David G. et al (Angleterre)	$430 \times 10^9$ éléments/litre	17 à $3182 \times 10^9$ éléments/litre
Notre série	$387 \times 10^9$ éléments/litre	39 à $1400 \times 10^9$ éléments/litre

Tableau 24 : Taux de plaquettes dans différentes séries

Ce paramètre peut parfois être supérieur à  $1 \times 10^{12}$ /litre, parfois normal, ou même exceptionnellement abaissé. Nos résultats rejoignent ceux des autres séries d'études.

### **3. Profil génétique**

De nombreux travaux se sont focalisés sur l'étude de l'influence des principaux types de transcrits sur le phénotype de la maladie et la réponse au traitement. Cependant, les résultats de ces études demeurent contradictoires. Dans ce travail, nous avons corrélé la présence des transcrits Mb3a2 et Mb2a2 avec les paramètres cliniques et biologiques chez nos patients atteints de LMC.

#### **3.1 Type de transcrit de fusion**

Afin d'identifier les différents transcrits BCR-ABL, nous avons réalisé une PCR-multiplex en utilisant des amorces conçues pour amplifier 14 variants du transcrit BCR-ABL. L'analyse statistique a été réalisée pour étudier l'association entre le type du transcrit et les paramètres hématologiques et cliniques des patients.

Les résultats obtenus montrent une dominance totale des transcrits b2a2 et b3a2 dans notre population. En effet, 43% des patients exprimaient le transcrit b2a2, 52% des cas portaient le transcrit b3a2, tandis que 5% des sujets ont montré une co-expression des deux transcrits.

En comparant nos résultats avec ceux d'autres études, on constate une large discordance en fonction des populations. Dans certaines études le transcrit b3a2 est dominant par rapport au b2a2, et le cas contraire est démontré dans d'autres études. Les travaux de Castagnetti et al. en Italie sur une population de 1494 patients LMC, a montré une incidence de 49% du biomarqueur b3a2 [95]. De même, l'étude de Yaghmaie et al. a rapporté une fréquence élevée du transcrit b3a2 (73.5%) dans une population de 136 cas [96]. Un taux élevé du b3a2 a été également rapporté dans les populations Tunisienne, Brésilienne, Canadienne, Coréenne et autres (Tableau 25).

Pays	Effectif	b2a2 %	b3a2 %	Co-expression%
Maroc (Etude en cours)	123	43,09	52,03	5%
Tunisie (Bennour 2013)	44	36,36	63,63	0
Argentine (Sastre 2007)	53	41,7	37,5	8,3
Soudan (Osman 2010)	40	94,6	54	0
États-Unis (Jain 2016)	43	53,5	41,9	2.3
Syrie (Al-Achkar 2016)	481	42	41	18
Allemagne (Hanfstein 2014)	45	46,7	51,1	ND
Brésil (Pagnano 2017)	1105	41	45	14
Inde (Sharma 2010)	170	33	55	12
Inde (Polampalli 2008)	87	38	54	8
ELN cohorte (Pfirschmann 2017)	202	32	68	0
Italie (Castagnetti 2017)	1494	38	49	13
Inde (Mir 2015)	559	36	52	11
Canada (Lin 2016)	200	24	68	8
Pologne (Prejzner 2002)	166	36,7	50	13,3
Inde (Deb 2014)	27	29	62,3	8,2
Korea (Lee 2018)	80	41,25	56,25	ND
Angleterre (Claudiani 2017)	120	35	60	2,5
États-Unis (Verschraegen 1995)	64	42	58	0
Angleterre (Khorashad 2008)	362	30,2	67,9	ND
Serbie (Todoric-Zivanovic 2011)	319	41	46	ND
Iran (Yaghmaie 2008)	136	25	73,5	12
Inde (Arun 2017)	75	21	62	5
Thaïlande (Udomsakdi-Auewarakul2000)	1260	34,3	60	ND
	99	31	61	ND
Korea (Goh 2006)	548	32,34	66,74	ND
Japon (Ito 2004)	226	30,2	67,5	ND

**Tableau 25** : Résultats de l'incidence de 3 types de transcrits de fusion BCR-ABL rapportés dans différents pays des cinq continents (ND : non déclaré)

Contrairement à nos résultats, le transcrite de fusion b2a2 constitue le gène le plus exprimé chez quelques populations. En effet, le taux de b2a2 le plus élevé (53.5%)

a été rapporté par Jain et al aux États-Unis. L'étude Syrienne menée par Al-Achkar et al en 2016, avait décrit un taux de b2a2 de 42% contre 41% pour b3a2 [97].

La co-expression est un évènement rare qui n'a pas été décrits dans toutes les études. Dans le présent travail, la fréquence des transcrits b3a2 et b2a2 en co-expression a atteint 5%. Une incidence similaire a été rapportée par Arun et al dans une population Indienne. Cependant, Al-Achkar et al. ont mentionné un taux de 18% dans la population Syrienne, ce qui constitue la valeur la plus élevée jamais rapportée dans la littérature [97].

### **3.2 Corrélation clinico-biologique et type de transcrit de fusion**

Les différences structurelles des protéines p210 (c.-à-d. e14a2 et e13a2) peuvent entraîner des activités de tyrosine kinase différentes et donc, théoriquement, les paramètres cliniques et hématologiques chez les patients atteints de LMC avec les types de transcrits b2a2 et b3a2 peuvent différer.

De nombreuses études ont évalué les taux d'hémoglobine, des leucocytes, de myéloblastes, de plaquettes, de la taille de la rate chez des groupes de patients ayant exprimés des transcrits BCR-ABL différents. L'analyse statistique des différentes variables dans notre étude a montré l'absence de corrélation entre le taux des leucocytes, d'hémoglobine, des plaquettes, des blastes, la phase de la maladie et la présence de splénomégalie et le type du variant BCR-ABL.

Nos résultats concordent avec plusieurs études menées dans ce sens. Notamment, les travaux réalisés par Filho et al. sur une population brésilienne constituée de 50 patients LMC, qui a montré que les différences des données hématologiques et cliniques observées entre les groupes de patients exprimant les deux types de transcrits b3a2 et b2a2 n'a pas atteint la signification statistique. De

même pour la comparaison d'âge et du genre entre les deux groupes, aucune différence n'a été décelée [98].

Une étude Algérienne récente a consolidé ces résultats en rapportant une différence non significative entre les groupes de transcrits et les autres variables [89]. Des conclusions conformes ont été également décrites par Pagnano et ses collègues, qui ont découvert l'absence de corrélation entre le taux des cellules sanguines, la taille de la rate et du foie d'une part, et les transcrits b3a2 et b2a2 d'autre part [99].

Cependant, rares sont les études qui ont rapporté une différence significative. Une étude Nigérienne récente a montré que les patients exprimant le transcrit a2b2 avaient des taux de plaquettes plus élevés, une différence qui a été statistiquement prouvée ( $p=0.03$ ) [100]. Une étude Tunisienne qui a examiné les données sur les corrélations entre les types de variants M-BCR/ABL et le sexe, l'âge et les caractéristiques biologiques correspondants, a trouvé que le taux de plaquettes était plus élevé chez les patients présentant le transcrit b3a2 ( $p=0.001$ ) [101].

De nombreuses études ont également trouvé une association entre le nombre de leucocytes au moment du diagnostic et les types de transcrits. Dans leur étude, des chercheurs allemands ont démontré que les patients exprimant le variant b2a2 présentaient un taux moyen de leucocytes plus élevé que les patients exprimant le variant b3a2 ( $88 \times 10^9/L$  par rapport à  $65 \times 10^9/L$ ;  $P < 0,001$ ) [102]. Une étude publiée récemment au Brésil a également fait état de résultats similaires, et les patients ayant exprimés le transcrit b2a2 avaient un taux de leucocytes moyen plus élevé au moment du diagnostic que les patients exprimant le transcrit b3a2 ( $147 \times 10^9/L$  contre  $129 \times 10^9/L$ ;  $P=0.049$ ) (de Almeida Filho et al. 2019).

La technique de RT-PCR multiplex nous a permis de confirmer d'une part le diagnostic de LMC et d'autre part, de confirmer les données de la littérature, en montrant un taux de transcrit de fusion de type b3a2 plus élevé (52%) que celui de type b2a2 (43%). Elle nous a également montré son intérêt dans l'identification des transcrits rares. Dans notre série, six cas avec co-expression des deux transcrits ont été répertoriés (5%). Ceci démontre la nécessité de rendre systématique au diagnostic, la recherche qualitative des transcrits BCR-ABL1 par RT-PCR multiplex, afin d'avoir des données suffisamment informatives sur les différents variants de transcrits, permettant donc de bien choisir les amorces spécifiques pour le suivi ultérieur de la réponse moléculaire sous traitement. D'un point de vue pratique, cette technique possède des avantages considérables par rapport à la RT-PCR conventionnelle notamment en termes de gain de temps de réalisation (Technique plus rapide), et de sensibilité (seuil de détection 0.1%).

### **3.3 Réponse au traitement et type de transcrit**

Bien que la majorité des patients atteints de leucémie myéloïde chronique répondent bien au traitement avec des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK), certains patients montrent une mauvaise réponse. De nombreux facteurs peuvent influencer, y compris les différents types de transcrits BCR-ABL. Les études démontrant l'impact du type du transcrit sur la réponse aux ITKs reçu par les patients LMC, ont donné des résultats contradictoires [103][104][105].

Dans notre série le taux de réponse moléculaire majeure obtenue était de 75.5% sur une durée de 12 mois. En comparant nos résultats avec ceux de la littérature, on observe une légère discordance. En effet, Banford et ses collaborateurs ont rapporté un taux de 50% de RMM sur 12 mois [110]. De même, une étude égyptienne portant sur 95 nouveaux patients a obtenu un taux de 50% avec un temps médian d'obtention de

RMM de 12 mois (Hk et al. 2009). Une étude rétrospective réalisée par le Groupe Algérien de travail sur la LMC (GAT-LMC), qui a évalué le traitement par Imatinib chez 327 patients durant 12 mois, a obtenu une rémission moléculaire chez 181 patients soit 55.4% [89].

L'étude de l'association entre le type de transcrit Bcr-Abl et la réponse au traitement a montré l'absence de corrélation dans notre série, c'est-à-dire que le variant Bcr-Abl n'a aucune influence sur la réponse au traitement. Pourtant, dans la littérature plusieurs études ont montré que les patients avec le transcrit b3a2 présentaient une réponse meilleure par rapport aux patients porteurs du variant b2a2.

Dans l'étude de Lucas et al, les patients exprimant le transcrit b3a2 présentaient des taux de réponse cytogénétique complète supérieurs et obtenaient cette réponse plus rapidement que le groupe b2a2 ( $P = 0,01$  et  $P = 0,006$ , respectivement) dans une cohorte de 78 patients ayant une LMC recevant l'imatinib en première intention [105].

De même, parmi les patients avec LMC en phase chronique recevant l'Interferon (INF- $\alpha$ ) en première ligne, Bonifacio et al ont montré que le fait d'avoir le transcrit b3a2 était associé à une plus haute réponse moléculaire majeure par rapport à ceux du transcrit b2a2 ( $P=0.003$ ) (Bonifacio et al. 2015).

La majorité des publications ont confirmé l'impact du transcrit b3a2 sur la réponse au traitement. En règle générale, de meilleures réponses et des résultats favorables ont été rapportés. Cependant, des études avec des résultats contradictoires ont également été citées.

Une étude menée en Inde auprès de 87 patients atteints de LMC a démontré que ceux porteurs du variant b2a2 avaient de meilleures réponses lorsqu'ils recevaient de l'imatinib comparativement aux patients porteurs du variant b3a2. Les taux de réponse



cytogénétique complète étaient de 59 % contre 28 %, respectivement, en faveur du transcrit b2a2, et la différence était statistiquement significative ( $P=0.04$ )[106].

La littérature actuelle a bien documenté l'impact des différents transcrits (b2a2, b3a2 ou co-expression de b3a2 plus b2a2) sur le résultat à long et court-terme, ainsi que la corrélation de ces types de transcrits avec les caractéristiques de la maladie au moment du diagnostic initial.

La raison de la différence de réponse au traitement à l'imatinib est probablement due à des différences dans la cible du médicament. On a constaté que l'activité tyrosine kinase est plus élevée chez les patients b2a2 que chez les patients b3a2 [107]. Une dose fixe d'imatinib est capable d'éradiquer l'activité kinase chez les patients b3a2 d'une manière plus efficace que les patients b2a2 [105].

Étant donné que le transcrit b3a2 semble être liée à des résultats favorables, le choix de thérapies alternatives comme les 2GTKIs (Inhibiteurs de la Tyrosine Kinase de 2ème Génération) en première ligne de traitement pourrait être une approche convenable chez les patients ayant le transcrit b2a2, qui est généralement associée à une mauvaise réponse. Des essais contrôlés prospectifs et randomisés avec des échantillons de plus grande taille sont encore nécessaires pour déterminer l'impact du type de transcrit sur les résultats à court et à long terme chez les patients atteints de LMC qui reçoivent un traitement par ITKs [103].

### **3.4 Résistance au traitement**

Le développement de la résistance à l'Imatinib chez les patients atteints de LMC a été associé à un large éventail de mécanismes. Il s'agit notamment des voies dépendantes de la BCR-ABL et des voies indépendantes de la BCR-ABL. Les voies dépendantes de la BCR-ABL ont été signalées comme l'un des mécanismes les plus

fréquents qui contribuent à la résistance chez les patients de LMC traités avec l'imatinib [108]. La voie dépendante de la BCR-ABL concerne principalement les mutations du domaine de la tyrosine kinase du gène BCR-ABL (La Rosée et Deininger 2010)[109] (« Bcr-Abl Kinase Domain Mutations, Drug Resistance, and the Road to a Cure for Chronic Myeloid Leukemia » 2007). Druker et al. [111] a démontré que le blocage de la protéine BCR-ABL dans la conformation inactive par l'imatinib empêche le transfert de phosphate de l'AMP (ATP) vers les substrats et inhibe les voies descendantes. Toutefois, selon Corbin et al. [112], certaines mutations semblent perturber le point de contact critique entre l'imatinib et la BCR-ABL. En outre, d'autres mutations semblent induire une transition de l'état inactif à l'état actif, une conformation que l'imatinib ne pourrait pas lier.

Dans cette étude, 7/22 (32 %) patients atteints de LMC résistants à l'Imatinib ont montré la présence d'une mutation dans leur domaine tyrosine kinase du gène BCR-ABL. En comparant la fréquence des mutations de la présente étude et la fréquence signalée dans d'autres populations étudiées, on a observé une fréquence plus faible chez les patients atteints de LMC dans notre série.

Selon Kim et al, la fréquence des mutations est corrélée avec la proportion de patients dans les différentes phases de la maladie. Dans l'étude de Kim et al, 25 % des patients LMC résistants à l'Imatinib recrutés étaient en phase chronique (PC), tandis que les 75 % restants étaient en phase accélérée (PA) ou en phase blastique (PB). Par conséquent, Kim et al. ont observé une fréquence élevée (63 %) de mutation chez leurs patients LMC résistants à l'Imatinib (Kim et al. 2009). Ainsi, la fréquence globale relativement faible des mutations dans notre étude par rapport à d'autres études publiées peut s'expliquer par la prédominance des patients de LMC en phase chronique inclus pour l'analyse de mutation. Un faible pourcentage de mutations du domaine de

la tyrosine kinase (DTK) (19 %) a également été observé par Branford et al. chez des patients LMC australiens résistants à l'Imatinib. Le faible pourcentage de mutations DTK observé dans l'étude de Brandford et al. (2003) pourrait également être dû au fait que la majorité des patients dépistés se trouvaient dans la phase chronique [113].

Les résultats de la présente étude ainsi que d'autres rapports cités concordent avec ceux de Branford et al. qui ont indiqué que les pourcentages estimés de patients résistants à l'Imatinib dans la LMC en phase chronique et la LMC en phase accélérée, porteurs de mutations pathogéniques serait d'environ 18 % et 31 % respectivement, alors qu'elle serait de 29 % à 52 % chez les patients atteints de LMC en phase blastique [114].

En ce qui concerne l'analyse de survie, les patients atteints de LMC traités par l'Imatinib et porteurs des mutations du gène BCR-ABL, en particulier la mutation T315I, ont montré une période de survie plus courte que celles avec d'autres types de mutations et celles sans mutations. La localisation de la mutation T315I au site de liaison de l'Imatinib au niveau du domaine de la tyrosine kinase explique fortement la survie plus courte et le mauvais pronostic des patients atteints de LMC avec la mutation T315I.

De plus, certains rapports indiquent que les patients atteints de la mutation T315I sont non seulement résistants à l'Imatinib, mais aussi à d'autres ITKs de deuxièmes et troisièmes générations comme le dasatinib [115], le nilotinib [116] et le bosutinib [117]. Ainsi, la mutation T315I confère une véritable résistance aux ITKs et favorise ainsi le raccourcissement de la survie des patients.

L'évaluation des patients atteints de LMC présentant des signes cliniques de résistance aux mutations du gène BCR-ABL est un élément important du suivi de la maladie, afin de déterminer comment les patients réagissent au traitement.

Certaines mutations spécifiques de la BCR-ABL ont été associées à un mauvais pronostic, par conséquent, le dépistage des mutations est cliniquement pertinent pour identifier les patients atteints de LMC qui sont susceptibles de développer une résistance et de faciliter la sélection du traitement subséquent.

En outre, la présence de mutations dans différentes régions du domaine tyrosine kinase du gène BCR-ABL conduit à différents niveaux de résistance. Le type de mutation peut potentiellement indiquer si un inhibiteur de la BCR-ABL de deuxième ou de troisième génération ou d'autres stratégies thérapeutiques devrait être administré à de tels patients résistants à l'Imatinib et peut également aider à identifier ceux qui ont besoin d'une augmentation de la dose d'Imatinib.

## IV. Conclusion

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une maladie myéloproliférative caractérisée par une croissance accrue et non régulée des cellules myéloïdes dans la moelle osseuse et par l'accumulation de ces cellules dans le sang. Elle se produit avec une incidence annuelle de 1 à 1,5 pour 100 000 personnes. La LMC est très rarement présente chez les enfants. Dans les pays occidentaux, l'âge médian d'apparition est de 50–60 ans. Bien que les symptômes puissent se manifester par une asthénie, une perte de poids, une splénomégalie, une hépatosplénomégalie et une anémie, 50 % des patients sont asymptomatiques et sont diagnostiqués à la suite d'analyses sanguines fortuites. Plus de 90 % des patients atteints de LMC sont diagnostiqués lorsque leur maladie est dans une phase relativement précoce, en l'occurrence en phase chronique.

Heureusement, le diagnostic est rarement problématique. Il dépend de la démonstration du chromosome de Philadelphie par analyse cytogénétique ou du gène BCR–ABL par RT–PCR ou par FISH.

À travers cette thèse nous avons réalisé une caractérisation démographique, clinique et hématologique d'une population marocaine atteinte de LMC. Nous avons également étudié le profil génétique de cette population à travers la mise en évidence du chromosome Ph via le caryotype et la cytogénétique moléculaire, ainsi que la mise en évidence des différents types de transcrits de fusion par PCR multiplex.

Nous avons également essayé de chercher une éventuelle corrélation entre le type du transcrit de fusion BCR–ABL et les données démographiques et hématologique. L'absence de corrélation statistiquement significative nous mène à augmenter la taille de l'échantillon et d'explorer en perspectives d'autres pistes de recherche.

# RÉSUMÉS

## RÉSUMÉ

**INTRODUCTION:** La leucémie myéloïde chronique (LMC) appartient au groupe des syndromes myéloprolifératifs. Première maladie identifiée par une anomalie génétique acquise, la LMC bénéficie du développement d'une thérapie « ciblée » (inhibiteurs de tyrosine kinase ou ITK) qui en a transformé le pronostic.

**L'OBJECTIF** de notre travail est de déterminer le profil génétique, épidémiologique et clinique des patients atteints de la LMC.

**MATERIELS ET METHODES:** Il s'agit d'une étude rétrospective étalée sur une durée de 4 ans entre janvier 2016 et janvier 2020, effectué au niveau du laboratoire de génétique médicale et du service de médecine interne du CHU Hassan II de Fès, incluant 123 patients atteints de LMC.

**RÉSULTATS:** L'âge moyen de nos patients était de 50 ans. 48% étaient de sexe féminin, 52% de sexe masculin. 84% des individus étaient en stade chronique. Cliniquement 50% des malades présentaient une splénomégalie, 25% une plénitude abdominale, 20% une asthénie et des douleurs abdominales tandis que 15% présentaient une fièvre et une anémie.

La RT-PCR multiplex a démontré que 43% des patients exprimaient le transcrit b2a2, 52% des cas portaient le transcrit b3a2. La co-expression des deux transcrits a été démontrée chez 5% des sujets.

**CONCLUSION:** Le diagnostic de la LMC dépend de la présence du chromosome de Philadelphie par analyse cytogénétique ou du gène BCR-ABL par RT-PCR. Plus de 90 % des patients atteints de LMC sont diagnostiqués lorsque leur maladie est dans une phase relativement précoce. La biologie a été à la base d'importantes avancées théoriques et pratiques, les nouveaux traitements sont devenus plus pertinents et plus ciblés et ont globalement amélioré le pronostic.



## **ABSTRACT**

**INTRODUCTION:** Chronic myeloid leukemia (CML) belongs to the group of myeloproliferative syndromes. The first disease identified by an acquired genetic abnormality, CML has benefited from the development of "targeted" therapy (tyrosine kinase inhibitors or TKIs) which has transformed its prognosis.

**The aim** of our work is to determine the genetic, epidemiological, and clinical profile of CML patients.

**MATERIALS AND METHODS:** This is a retrospective study spread over a period of 4 years between January 2016 and January 2020, carried out at the laboratory of medical genetics and the department of internal medicine of the Hassan II University Hospital of Fez, including 123 patients with CML.

**RESULTS:** The average age of our patients was 50 years. 48% were female, 52% male. 84% of individuals were in chronic stage. Clinically 50% of the patients presented splenomegaly, 25% abdominal fullness, 20% asthenia and abdominal pain while 15% presented fever and anemia.

Multiplex RT-PCR showed that 43% of patients expressed the b2a2 transcript, 52% of cases carried the b3a2 transcript. Co-expression of both transcripts was demonstrated in 5% of subjects.

**CONCLUSION:** The diagnosis of CML depends on the presence of the Philadelphia chromosome by cytogenetic analysis or the BCR-ABL gene by RT-PCR. More than 90% of patients with CML are diagnosed when their disease is in a relatively early phase. Biology has led to important theoretical and practical advances, new treatments have become more relevant and targeted, and overall prognosis has improved.

## ملخص

**مقدمة:** سرطان الدم النخاعي المزمن (CML) ينتمي إلى مجموعة اضطرابات التكاثر النقوي. المرض الأول الذي تم تحديده من خلال شذوذ وراثي مكتسب، استفاد سرطان الدم النخاعي المزمن من تطوير العلاج "الموجه" (مثبطات التيروسين كيناز أو TKIs) الذي غير تشخيصه.

**الهدف** من عملنا هو تحديد الملامح الجينية والوبائية والسرييرية للمرضى المصابين بسرطان الدم النخاعي المزمن.

**المواد والطرق:** هذه دراسة بأثر رجعي موزعة على فترة 4 سنوات بين يناير 2016 ويناير 2020، أجريت على مستوى معمل الجينات وقسم الطب الباطني في CHU الحسن الثاني في فاس، بما في ذلك 123 مريضاً مصاباً بسرطان الدم النخاعي المزمن.

**النتائج:** كان متوسط عمر مرضانا 50 عاماً. 48% إناث و52% ذكور. 84% من الأفراد كانوا في المرحلة المزمنة. إكلينيكيًا، أظهر 50% من المرضى تضخم الطحال، و25% يعانون من امتلاء في البطن، و20% يعانون من وهن وألم في البطن، و15% يعانون من الحمى وفقر الدم.

أظهر Multiplex RT-PCR أن 43% من المرضى عبروا عن نسخة b2a2 ، وحمل 52% من الحالات نسخة b3a2. تم عرض التعبير المشترك للنصين في 5% من الموضوعات.

**الخلاصة:** يعتمد تشخيص سرطان الدم النخاعي المزمن على وجود كروموسوم فيلادلفيا عن طريق التحليل الوراثي الخلوي أو جين BCR-ABL بواسطة RT-PCR. يتم تشخيص أكثر من 90% من مرضى سرطان الدم النخاعي المزمن عندما يكون مرضهم في مرحلة مبكرة نسبيًا. لقد كان علم الأحياء أساس التطورات النظرية والعملية الهامة، وأصبحت العلاجات الجديدة أكثر صلة بالموضوع وأكثر استهدافًا وحسنت الإنذار بشكل عام.

# BIBLIOGRAPHIE

- [1]. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia – advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med* 2003 ; 349 : 1451–64.
- [2]. T.Leguay F.–X.Mahon. EMC – Hématologie Volume 2, Issue 3, September 2005, Pages 187–205.
- [3]. Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M; European LeukemiaNet. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*. 2007 Jul 28;370(9584):342–50
- [4]. Heisterkamp N, Groff en J, Stephenson JR, et al. Chromosomal localization of human cellular homologues of two viral oncogenes. *Nature* 1982; 299: 747–49.
- [5]. Ren R. Mechanisms of BCR–ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 172–83.
- [6]. Cortes J, Pavlovsky C, Saußebe S. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*. 2021 Nov 20;398(10314):1914–1926. doi: 10.1016/S0140–6736(21)01204–6. Epub 2021 Aug 20. PMID: 34425075.
- [7]. Velpeau A. Sur la résorption du pus et sur l'altération du sang dans les maladies. *Revue Médicale* 1827 ; 2 : 216–40.
- [8]. Craigie D. Case of disease of the spleen, in which death took place in consequence of the presence of purulent matter in the blood. *Edinburgh Med Surg J* 1845 ; 64 : 400–13.
- [9]. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973 ; 243 : 290–3.
- [10]. Virchow R. Die Leukämie. *Gesammelte Abhandlungen Zur Wissenschaftlichen Medizin*. Frankfurt : Meidinger, 1856 (p 190–211).
- [11]. Donné A. *Cours de microscopie complémentaire des études médicales*. Paris : Ballière, 1844 (p. 550).

- [12]. Ehrlich P. *Farbenanalytische Untersuchungen Zur Histologie und Klinik Des Blutes*. Berlin : Hirschwald, 1891.
- [13]. Nowell P, Hungerford DA. A minute chromosome in human granulocytic leukemia. *Science* 1960 ; 132 : 1497.
- [14]. Tough IM, Court Brown WM, Baikie AG, et al. Cytogenetic studies in chronic myeloid leukaemia and acute leukaemia associated with monogolism. *Lancet* 1961 ; 1 : 411–7.
- [15]. Pendergast AM. The Abl family kinases: mechanisms of regulation and signaling. *Adv Cancer Res* 2002 ; 85 : 51–100.
- [16]. Harrison SC. Variation on an Src-like theme. *Cell* 2003 ; 112 : 737–40.
- [17]. Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, et al. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* 1984 ; 36 : 93–9.
- [18]. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* 1990 ; 247 : 1079–82.
- [19]. R Gonon-Demoulian, JM Goldman, FE Nicolini. Historique de la leucémie myéloïde chronique : un paradigme de traitement du cancer. *Bulletin du Cancer SFC Volume* 101.
- [20]. Socialstyrelsen (2009) *Cancer incidence in Sweden*
- [21]. Smith A, et al. Haematological Malignancy Research N (2010) The Haematological Malignancy Research Network (HMRN): a new information strategy for population-based epidemiology and health service research. *Br J Haematol* 148(5):739–753.
- [22]. (2014) SEER. *Cancer statistics review 1975–2011*.

- [23]. Höglund M et al. (2013) Tyrosine kinase inhibitor usage, treatment outcome, and prognostic scores in CML: report from the population based Swedish CML registry. *Blood* 122(7):1284–1292.
- [24]. Smith AG et al. (2014) Determinants of survival in patients with chronic myeloid leukaemia treated in the new era of oral therapy: findings from a UK population-based patient cohort. *BMJ Open* 4.
- [25]. de la Fuente J et al. International BFMGSGCMLC (2014) Managing children with chronic myeloid leukaemia (CML): recommendations for the management of CML in children and young people up to the age of 18 years. *Br J Haematol* 167(1):33–47.
- [26]. Corm S. et al. (2008) Kinetic of chronic myeloid leukemia (CML) prevalence in Northern France since the introduction of imatinib. *J Clin Oncol (Suppl)* 26(15S):7088.
- [27]. Lichtman MA. Is there an entity of chemically induced BCR–ABL positive chronic myelogenous leukemia? *Oncologist*. 2008;13(6): 645–54.
- [28]. Segel GB, Lichtman MA. Familial (inherited) leukemia, lymphoma, and myeloma: an overview. *Blood Cells Mol Dis*. 2004;32: 246–61.
- [29]. Mehlman MA. Dangerous and cancer-causing properties of products and chemicals in the oil refining and petrochemical industries. Part XXX: causal relationship between chronic myelogenous leukemia and benzene-containing solvents. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1076:110–9.
- [30]. Smith MT. The mechanism of benzene-induced leukemia: a hypothesis and speculations on the cause of leukemia. *Environ Health Perspect*. 2007;104 Suppl 6:1219–25.

- [31]. Brandt L. Environmental factors and leukaemia. *Med Oncol Tumor Pharmacother.* 1985;2(1):7-10.
- [32]. Ichimaru M, Tomonaga M, Amenomori T, et al. Atomic bomb and leukemia. *J Radiat Res (Tokyo).* 1991;32 Suppl 2:14-9.
- [33]. Gluzman D, Imamura N, Sklyarenko L, et al. Patterns of hematological malignancies in Chernobyl clean-up workers (1996-2005). *Exp Oncol.* 2006;28(1):60-3.
- [34]. Deininger MW, Bose S, Gora-Tybor J, et al. Selective induction of leukemia-associated fusion genes by high-dose ionizing radiation. *Cancer Res.* 1998;58:421-5.
- [35]. J.Hoggatt L.M.Pelus Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition) 2013, Pages 418-421.
- [36]. Bradley Chereda and Junia V. Melo. *The Biology and Pathogenesis of Chronic Myeloid Leukemia.*
- [37]. D.E.Sabath Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition) 2013, Page 308
- [38]. Chandra et al. *Cancer Genetics* Volume 204, Issue 4, April 2011, Pages 171-179.
- [39]. Thijsen S, Schuurhuis G, van Oostveen J, Ossenkoppele G. Chronic myeloid leukemia from basics to bedside. *Leukemia* 1999;13:1646-74.
- [40]. Hantschel O, Superti-Furga G. Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:33-44.
- [41]. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med* 2003;349:1451-64.

- [42]. Tomasz Chojnacki et al. Simultaneous Inhibition of BCR–ABL1 Tyrosine Kinase and PAK1/2 Serine/Threonine Kinases Exerts Synergistic Effect Against Chronic Myeloid Leukemia Cells.
- [43]. Melo JV. The diversity of BCR–ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* 1996;88:2375–84.
- [44]. Pane F, Frigeri F, Sindona M, Luciano L, Ferrara F, Cimino R, et al. Neutrophilic–chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood* 1996;88:2410–4.
- [45]. Gordon MY, Dowding CR, Riley GP, Goldman JM, Greaves MF. Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature* 1987;328:342–4.
- [46]. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000;96:3343–56.
- [47]. Pendergast AM, Muller AJ, Havlik MH, Maru Y, Witte ON. BCR sequences essential for transformation by the BCR–ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non–phosphotyrosine-dependent manner. *Cell* 1991;66:161–71.
- [48]. Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska–Skorska M, Majewski M, Martinez R, Choi JK, et al. Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation.
- [49]. Amarante–Mendes GP, Naekyung Kim C, Liu L, Huang Y, Perkins CL, Green DR, et al. Bcr–Abl exerts its antiapoptotic effect against diverse apoptotic stimuli through blockage of mitochondrial release of cytochrome C and activation of caspase–3. *Blood* 1998;91:1700–5.



- [50]. Dai Z, Quackenbush RC, Courtney KD, Grove M, Cortez D, Reuther GW, et al. Oncogenic Abl and Src tyrosine kinases elicit the ubiquitin-dependent degradation of target proteins through a Ras-independent pathway. *Genes Dev* 1998;12:1415–24.
- [51]. Robledo M, Martinez B, Arranz E, Trujillo MJ, Gonzalez Ageitos A, Rivas C, et al. Genetic instability of microsatellites in hematological neoplasms. *Leukemia* 1995;9:960–4.
- [52]. Wada C, Shionoya S, Fujino Y, Tokuhiko H, Akahoshi T, Uchida T, et al. Genomic instability of microsatellite repeats and its association with the evolution of chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1994;83: 3449–56.
- [53]. Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Iwama H, Hayashi S, Shay JW, Toyama K. Telomerase activity and cytogenetic changes in chronic myeloid leukemia with disease progression. *Leukemia* 1997;11:190–4.
- [54]. Ahuja H, Bar-Eli M, Advani SH, Benchimol S, Cline MJ. Alterations in the p53 gene and the clonal evolution of the blast crisis of chronic myelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:6783–7.
- [55]. Daniel A. Arbe et Al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127 (20): 2391–2405.
- [56]. Katarzyna Szymańska, Sophie Park, Chronic Myelogenous Leukemia: Pathology, Genetics, Diagnosis, and Treatment, Editor(s): Paolo Boffetta, Pierre Hainaut, Encyclopedia of Cancer (Third Edition), Academic Press, 2019, Pages 418–424.
- [57]. Huntly BJ, Bench A, Green AR. Double jeopardy from a single translocation: deletions of the derivative chromosome 9 in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2003;102:1160–8.

- [58]. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2003;348:994-1004.
- [59]. Baccarani M, Cortes J, Pane F, et al. Chronic myeloid leukemia: An update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol*. 2009;27:6041-6051.
- [60]. Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes JE, et al. Complete cytogenetic and molecular responses to interferon-alpha-based therapy for chronic myelogenous leukemia are associated with excellent long-term prognosis. *Cancer*. 2003;97:1033-1041.
- [61]. Cortes J, Quintás-Cardama A, Kantarjian HM. Monitoring molecular response in chronic myeloid leukemia. *Cancer*. 2011;117(6):1113-1122. doi:10.1002/cncr.25527.
- [62]. Kantarjian H, O'Brien S, Shan J, et al. Cytogenetic and molecular responses and outcome in chronic myelogenous leukemia: Need for new response definitions? *Cancer*. 2008;112:837-845.
- [63]. Cross NC, Feng L, Chase A, Bungey J, Hughes TP, Goldman JM. Competitive polymerase chain reaction to estimate the number of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia patients after bone marrow transplantation. *Blood*. 1993;82:1929-1936.
- [64]. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: Recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2006;108:1809-1820.

- [65]. Branford S, Fletcher L, Cross NC, et al. Desirable performance characteristics for BCR–ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. *Blood*. 2008;112:3330–3338.
- [66]. Hughes TP, Kaeda J, Branford S, et al. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2003;349:1423–1432.
- [67]. Ross DM, Branford S, Moore S, Hughes TP. Limited clinical value of regular bone marrow cytogenetic analysis in imatinib–treated chronic phase CML patients monitored by RQ–PCR for BCR–ABL. *Leukemia*. 2006;20:664–670
- [68]. Lissauer H. Zwei Fälle von Leukämie. *Berl Klin Wochenschr* 1865 ; 2 : 403–5.
- [69]. Ohnishi K, Ohno R, Tomonaga M, Kamada N, Onozawa K, Kuramoto A, et al. A randomized trial comparing interferon–alpha with busulfan for newly diagnosed chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Blood* 1995;86:906–16.
- [70]. Hochhaus, Andreas. 2007. “Chronic Myeloid Leukaemia.” *Lancet* 370: : 342–350.
- [71]. Baccarani, Michele, Gianantonio Rosti, and Simona Soverini. 2019. “Chronic Myeloid Leukemia: The Concepts of Resistance and Persistence and the Relationship with the BCR–ABL1 Transcript Type.” *Leukemia*. <http://dx.doi.org/10.1038/s41375-019-0562-1>.
- [72]. Talpaz, M. et al. 2013. “Re–Emergence of Interferon– $\alpha$  in the Treatment of Chronic Myeloid.
- [73]. Geissler JF, Roesel JL, Meyer T, et al. Benzopyranones and benzothiopyranones: a class of tyrosine protein kinase inhibitors with selectivity for the v–abl kinase. *Cancer Res* 1992 ; 52 : 4492–8.

- [74]. Buchdunger E, Zimmermann J, Mett H, et al. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res* 1996 ; 56 : 100-4.
- [75]. Druker BJ. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood* 2008 ; 112 : 4808-17.
- [76]. Zitvogel, Laurence et al. 2016. "Immunological Off-Target Effects of Imatinib." *Nature Reviews Clinical Oncology* 13(7): 431-46.  
<http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.41>.
- [77]. Sorel, Nathalie, Émilie Cayssials, Françoise Brizard, and Jean Claude Chomel. 2017. "Actualisation Des Traitements et Du Suivi Moléculaire Dans La Prise En Charge de La Leucémie Myéloïde Chronique." *Annales de Biologie Clinique* 75(2): 129-45
- [78]. Modugno, Michele. 2014. "New Resistance Mechanisms for Small Molecule Kinase Inhibitors of Abl Kinase." *Drug Discovery Today: Technologies* 11(1): 5-10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ddtec.2013.12.001>.
- [79]. Apperley, Jane F. 2015. "Chronic Myeloid Leukaemia." *The Lancet* 385(13): 1447-59. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62120-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62120-0).
- [80]. An, Xin et al. 2010. "BCR-ABL Tyrosine Kinase Inhibitors in the Treatment of Philadelphia Chromosome Positive Chronic Myeloid Leukemia: A Review." *Leukemia Research* 34(10): 1255-68.
- [81]. Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010 ; 362 : 2260-70.
- [82]. Ankathil, Ravindran, Husin Azlan, Abu Abdullah Dzarr, and Abdul Aziz Baba. 2018. "Pharmacogenetics and the Treatment of Chronic Myeloid Leukemia: How Relevant Clinically? An Update." *Pharmacogenomics* 19(5): 475-93.

- [83]. Assouline, S., and J. H. Lipton. 2011. "Monitoring Response and Resistance to Treatment in Chronic Myeloid Leukemia." *Current Oncology* 18(2): e71. [/pmc/articles/PMC3070714/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22111111/) (December 3, 2020).
- [84]. Danisz, Katarzyna, and Janusz Blasiak. 2013. "Role of Anti-Apoptotic Pathways Activated by BCR/ABL in the Resistance of Chronic Myeloid Leukemia Cells to Tyrosine Kinase Inhibitors." *Acta Biochimica Polonica* 60(4): 503-14.
- [85]. Baccarani, Michele, Gianantonio Rosti, and Simona Soverini. 2019. "Chronic Myeloid Leukemia: The Concepts of Resistance and Persistence and the Relationship with the BCR-ABL1 Transcript Type." *Leukemia*. [http://dx.doi.org/10.1038/s41375-019-0562-1](https://doi.org/10.1038/s41375-019-0562-1).
- [86]. Neul, Claudia et al. 2016. "Impact of Membrane Drug Transporters on Resistance to Small-Molecule Tyrosine Kinase Inhibitors." *Trends in Pharmacological Sciences* xx.
- [87]. Baer et al 2016. « Ultra-deep sequencing leads to earlier and more sensitive detection of the tyrosine kinase inhibitor resistance mutation T315I in chronic myeloid leukemia ». *Haematologica* 101 (7): 830-38. <https://doi.org/10.3324/haematol.2016.145888>.
- [88]. El Mouhdi Ghizlan 2015. Les aspects cliniques et cytogenétiques de la leucémie myéloïde chronique.
- [89]. Nachi, Mourad et al. 2020. "Impact of the Major BCR-ABL1 Transcript Type on Clinical and Biological Parameters and Molecular Response in Patients with Chronic Myeloid Leukemia." *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy* 1658(3876): 8-12. <https://doi.org/10.1016/j.hemonc.2020.08.003>.
- [90]. Zerouali Salah Eddine Leucémie 2019 . Myéloïde Chronique Expérience du service de médecine interne de l'hôpital militaire Moulay Ismail de Meknès.

- [91]. Baccarani, Michele, Fausto Castagnetti, Gabriele Gugliotta, Gianantonio Rosti, Simona Soverini, Ali Albeer, et Markus Pfirrmann. 2019. « The proportion of different BCR–ABL1 transcript types in chronic myeloid leukemia . An international overview ». *Leukemia* 10 (1038): 1-12.  
<https://doi.org/10.1038/s41375-018-0341-4>.
- [92]. Goldman, John M, and Brian J Druker. 2016. “Chronic Myeloid Leukemia : Current Treatment Options.” *Blood journal* 98(7): 2039–43.
- [93]. Williams, Loretta A et al. 2013. “Measuring the Symptom Burden Associated with the Treatment of Chronic Myeloid Leukemia Measuring the Symptom Burden Associated with the Treatment of Chronic Myeloid Leukemia.” *Blood journal Journal* 122(5): 641–47.
- [94]. Savage, David & Szydlo, Richard & Goldman, John. (1997). Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukemia seen at a referral center over a 16–year period. *British journal of haematology*. 96. 111–6. [10.1046/j.1365-2141.1997.d01-1982.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1997.d01-1982.x).
- [95]. Castagnetti, Fausto, Gabriele Gugliotta, Massimo Breccia, Alessandra Iurlo, Luciano Levato, Francesco Albano, Paolo Vigneri, et al. 2017. « The BCR–ABL1 Transcript Type Influences Response and Outcome in Philadelphia Chromosome–Positive Chronic Myeloid Leukemia Patients Treated Frontline with Imatinib ». *American Journal of Hematology* 92 (8): 797-805.  
<https://doi.org/10.1002/ajh.24774>.
- [96]. Yaghmaie, Marjan, Seyed H. Ghaffari, Ardashir Ghavamzadeh, Kamran Alimoghaddam, Mohammad Jahani, Seyed–Asadollah Mousavi, Masoud Irvani, Babak Bahar, et Isa Bibordi. 2008. « Frequency of BCR–ABL Fusion

- Transcripts in Iranian Patients with Chronic Myeloid Leukemia ». *Archives of Iranian Medicine* 11 (3): 247-51. <https://doi.org/08113/AIM.003>.
- [97]. A I-Achkar, Walid, Faten Moassass, Nagham Youssef, et Abdulsamad Wafa. 2016. « Correlation of P210 BCR-ABL Transcript Variants with Clinical, Parameters and Disease Outcome in 45 Chronic Myeloid Leukemia Patients ». *Journal of B.U.ON.: Official Journal of the Balkan Union of Oncology* 21 (2): 444-49.
- [98]. Almeida Filho, T. P. de, P. A. Maia Filho, Maritza Cavalcante Barbosa, Luana Letícia Alves Dutra, Marilena Facundo de Castro, Fernando Barroso Duarte, Acy Telles de Souza Quixadá, et Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes. 2019. « Does BCR-ABL Transcript Type Influence the Prognosis of Patients in Chronic Myelogenous Leukemia Chronic Phase? » *Hematology, Transfusion and Cell Therapy* 41 (2): 114-18.  
<https://doi.org/10.1016/j.htct.2018.10.003>.
- [99]. Pagnano, Katia Borgia Barbosa, Eliana Cristina Miranda, Márcia Torresan Delamain, Gislaine Oliveira Duarte, Erich Vinicius de Paula, Irene Lorand-Metze, et Carmino Antonio de Souza. 2017. « Influence of BCR-ABL Transcript Type on Outcome in Patients With Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia Treated With Imatinib ». *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* 17 (11): 728-33. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2017.06.009>.
- [100]. Owojuyigbe, Temilola O., Muheez A. Durosinmi, Ramoni A. A. Bolarinwa, Lateef Salawu, Norah O. Akinola, Abdulwaheed A. Ademosun, et Oluwayomi T. Bosede. 2020. « Distribution of BCR-ABL1 Transcript Variants in Nigerians with Chronic Myeloid Leukemia ». *Indian Journal of Hematology & Blood Transfusion: An Official Journal of Indian Society of Hematology and Blood*

- Transfusion* 36 (4): 646-51. <https://doi.org/10.1007/s12288-020-01264-1>.
- [101]. Bennour, Ayda et al. 2013. "Analysis of the Clinico-Hematological Relevance of the Breakpoint Location within M- BCR in Chronic Myeloid Leukemia." *Medical oncology* 30(348): 1-6.
- [102]. Hanfstein, Benjamin, Michael Lauseker, Rüdiger Hehlmann, Susanne Saussele, Philipp Erben, Christian Dietz, Alice Fabarius, et al. 2014. « Distinct Characteristics of E13a2 versus E14a2 BCR-ABL1 Driven Chronic Myeloid Leukemia under First-Line Therapy with Imatinib ». *Haematologica* 99 (9): 1441-47. <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.096537>.
- [103]. Ercaliskan, Abdulkadir, et A. Emre Eskazan. 2018. « The Impact of BCR-ABL1 Transcript Type on Tyrosine Kinase Inhibitor Responses and Outcomes in Patients with Chronic Myeloid Leukemia ». *Cancer* 124 (19): 3806-18. <https://doi.org/10.1002/cncr.31408>.
- [104]. Greenfield, Graeme, Ross McMullan, Nuala Robson, Julie McGimpsey, Mark Catherwood, et Mary Frances McMullin. 2019. « Response to Imatinib therapy is inferior for e13a2 BCR-ABL1 transcript type in comparison to e14a2 transcript type in chronic myeloid leukaemia ». *BMC Hematology* 19 (1): 7. <https://doi.org/10.1186/s12878-019-0139-2>.
- [105]. Lucas, Claire M., Robert J. Harris, Athina Giannoudis, Andrea Davies, Katy Knight, Sarah J. Watmough, Lihui Wang, et Richard E. Clark. 2009. « Chronic myeloid leukemia patients with the e13a2 BCR-ABL fusion transcript have inferior responses to imatinib compared to patients with the e14a2 transcript ». *Haematologica* 94 (10): 1362-67. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.009134>.



- [106]. Sharma, Pratibha, Lalit Kumar, Sujata Mohanty, et Vinod Kochupillai. 2010. « Response to Imatinib Mesylate in Chronic Myeloid Leukemia Patients with Variant BCR–ABL Fusion Transcripts ». *Annals of Hematology* 89 (3): 241-47. <https://doi.org/10.1007/s00277-009-0822-7>.
- [107]. White, Deborah, Verity Saunders, A. Bruce Lyons, Susan Branford, Andrew Grigg, L. Bik To, et Timothy Hughes. 2005. « In Vitro Sensitivity to Imatinib–Induced Inhibition of ABL Kinase Activity Is Predictive of Molecular Response in Patients with de Novo CML ». *Blood* 106 (7): 2520-26. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1103>.
- [108]. Kantarjian, Hagop M., Moshe Talpaz, Francis Giles, Susan O'Brien, et Jorge Cortes. 2006. « New Insights into the Pathophysiology of Chronic Myeloid Leukemia and Imatinib Resistance ». *Annals of Internal Medicine* 145 (12): 913-23. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-145-12-200612190-00008>.
- [109]. La Rosée, Paul, et Michael W. Deininger. 2010. « Resistance to Imatinib: Mutations and Beyond ». *Seminars in Hematology, Chronic Myeloid Leukemia in the Imatinib Era*, 47 (4): 335-43. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2010.06.005>.
- [110]. Branford, S., Z. Rudzki, A. Harper, A. Grigg, K. Taylor, S. Durrant, C. Arthur, et al. 2003. « Imatinib Produces Significantly Superior Molecular Responses Compared to Interferon Alfa plus Cytarabine in Patients with Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase ». *Leukemia* 17 (12): 2401-9. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403158>.

- [111]. Druker, Brian J., Shu Tamura, Elisabeth Buchdunger, Sayuri Ohno, Gerald M. Segal, Shane Fanning, Jürg Zimmermann, et Nicholas B. Lydon. 1996. « Effects of a Selective Inhibitor of the Abl Tyrosine Kinase on the Growth of Bcr-Abl Positive Cells ». *Nature Medicine* 2 (5): 561-66.  
<https://doi.org/10.1038/nm0596-561>.
- [112]. Corbin, Amie S., Elisabeth Buchdunger, Furet Pascal, et Brian J. Druker. 2002. « Analysis of the Structural Basis of Specificity of Inhibition of the Abl Kinase by STI571\* ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (35): 32214-19.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111525200>.
- [113]. Branford, Susan, Zbigniew Rudzki, Sonya Walsh, Ian Parkinson, Andrew Grigg, Jeff Szer, Kerry Taylor, et al. 2003. « Detection of BCR-ABL Mutations in Patients with CML Treated with Imatinib Is Virtually Always Accompanied by Clinical Resistance, and Mutations in the ATP Phosphate-Binding Loop (P-Loop) Are Associated with a Poor Prognosis ». *Blood* 102 (1): 276-83.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2002-09-2896>.
- [114]. Branford, Susan, Junia V. Melo, et Timothy P. Hughes. 2009. « Selecting Optimal Second-Line Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy for Chronic Myeloid Leukemia Patients after Imatinib Failure: Does the BCR-ABL Mutation Status Really Matter? » *Blood* 114 (27): 5426-35. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-215939>.
- [115]. Soverini, Simona, Sabrina Colarossi, Alessandra Gnani, Fausto Castagnetti, Gianantonio Rosti, Costanza Bosi, Stefania Paolini, et al. 2007. « Resistance to Dasatinib in Philadelphia-Positive Leukemia Patients and the Presence or the Selection of Mutations at Residues 315 and 317 in the BCR-ABL Kinase Domain ». *Haematologica* 92 (3): 401-4.  
<https://doi.org/10.3324/haematol.10822>.

- [116]. Jabbour, E., A. Hochhaus, J. Cortes, P. La Rosée, et H. M. Kantarjian. 2010. « Choosing the Best Treatment Strategy for Chronic Myeloid Leukemia Patients Resistant to Imatinib: Weighing the Efficacy and Safety of Individual Drugs with BCR–ABL Mutations and Patient History ». *Leukemia* 24 (1): 6-12. <https://doi.org/10.1038/leu.2009.193>.
- [117]. Khoury, H. Jean, Jorge E. Cortes, Hagop M. Kantarjian, Carlo Gambacorti-Passerini, Michele Bacarani, Dong–Wook Kim, Andrey Zaritskey, et al. 2012. « Bosutinib Is Active in Chronic Phase Chronic Myeloid Leukemia after Imatinib and Dasatinib and/or Nilotinib Therapy Failure ». *Blood* 119 (15): 3403-12. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-390120>.



أطروحة رقم 22/060

سنة 2022

لمحة وراثية عن المرضى المصابين  
سرطان الدم النخاعي المزمن  
تجربة بالمستشفى الجامعي الحسن الثاني بفاس  
( بصدد 123 حالة )

الأطروحة

قدمت و نوقشت علانية يوم 2022/02/15

من طرف

السيد عثمان برادة  
المزداد في 23 أكتوبر 1996 بفاس

لنيل شهادة الدكتوراه في الطب

الكلمات المفتاحية

اللوكيميا النخاعية المزمنة - نسخة اندماج - BCR-ABL - Multiplex PCR مثبط التيروسين كيناز

اللجنة

الرئيس ..... السيدة بنميلود سارة.....  
أستاذة في علم طب الأطفال  
المشرف ..... السيدة بوكروش ليلي.....  
أستاذة مبرزة في علم الوراثة  
أعضاء { ..... السيدة خمار زينب.....  
أستاذة مبرزة في الطب الباطني  
..... السيدة تلمساني إيمان.....  
أستاذة مبرزة في علم الدم