

THESE

En vue de l'obtention du : **DOCTORAT**

Structure de Recherche : Laboratoire de Biologie des pathologies humaines

Discipline : Biologie

Spécialité : Biologie des pathologies humaines

Présentée et soutenue en 10/06/2019 par :

Zahra TAKKI CHEBIHI

***Profil cytogénétique des Leucémies Aigues Lymphoblastiques
de l'enfant au Maroc***

JURY

<i>Youssef BAKRI</i>	<i>PES, Faculté des Sciences, Université Mohammed V - Rabat</i>	<i>Président</i>
<i>Nadia DAKKA</i>	<i>PES, Faculté des Sciences, Université Mohammed V - Rabat</i>	<i>Directeur de Thèse</i>
<i>Rabii AMEZIANE EL HASSANI</i>	<i>PH Faculté des Sciences, Université Mohammed V - Rabat</i>	<i>Rapporteur / Examineur</i>
<i>Jamila El BAGHDADI</i>	<i>PES Ecole royale de service de santé militaire, Université Mohammed V - Rabat</i>	<i>Rapporteur / Examineur</i>
<i>Mohammed KHATTAB</i>	<i>PES Faculté de Médecine et de Pharmacie Université Mohammed V - Rabat</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>Karim OULDIM</i>	<i>PES Faculté de Médecine et de Pharmacie Université Sidi Mohamed Ben Abdellah - Fès</i>	<i>Rapporteur / Examineur</i>
<i>Aziza BELKHAYAT</i>	<i>Dr Laboratoire d'analyses médicales et de cytogénétique BIOLAB-Rabat</i>	<i>Invitée</i>

Dédicace

A mes très chers parents

*Il y a tant de choses à en sécher tout l'encre de ce monde
mais aucune dédicace ne saurait exprimer ma gratitude,
mon respect et mon profond amour pour vous.*

*Vous récoltez dans ce travail les fruits de vos efforts,
votre présence fait naître en moi l'espoir nécessaire pour aller de l'avant.
Je vous remercie pour toute les valeurs morales que vous m'avez inculquées
et pour l'éducation que vous m'avez donnée.*

*Je ne vais jamais oublier vos sacrifices pour moi,
Votre générosité sans limite, votre présence
et vos conseils que vous n'avez jamais cessé de consentir
pour mon instruction et mon bien-être.*

*Je vous rends hommage par ce modeste travail en guise
de ma reconnaissance éternelle et de mon infini amour.*

*Sans vos prières ; vos précieux conseils ; votre dévouement sans bornes ;
je n'en serais pas là aujourd'hui.*

*Que Dieu vous garde et vous procure santé,
longue vie et bonheur éternel.*

A ma très chère fille SARA

*Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut...
Avant même que mes yeux ne te voient ma chérie, mon amour et mon affection
pour toi n'ont jamais cessé de s'accroître de jour en jour.
Tu es la lumière de mes jours ; et une source de joie permanente dans ma vie.
Tu es ma raison de vivre..
Ton sourire illumine ma vie
et la rend plus joyeuse et pleine de sens.
Tu as partagé ma vie avec avant même ta naissance
et tu continues de l'illuminer à chaque instant.
A toi ma chérie je dédie ce modeste travail
en implorant DIEU le tout puissant de te garder pour moi.
Simplement, Je t'adore ...*

A ma très chère sœur Mariam et mon très cher frère Zakaria

*Aucune dédicace ne saurait exprimer la profondeur
de mon amour et mon attachement.
Chacun de vous possède dans ma vie une place originale,
l'estime la chaleur et l'amour qui nous unissent.
Je suis très heureuse de pouvoir vous présenter par ce travail
le témoignage de mon profond amour
et les liens de fraternité et d'amitié qui nous unissent.
Je vous souhaite une vie pleine de joie et de réussite.*

A mes très chers neveux Mohammed et Omar

Que ce travail soit le témoin de mon amour et mon estime pour vous.

Je prie dieu de vous prêter santé et longue vie,

et vous préserve santé et bonheur.

Je vous souhaite un très bel avenir ; aussi grand que votre coeur;

aussi beau que votre pureté d'âme.

Je vous aime fort.

A la mémoire de ma chère grande mère Rkia KHALIL,

Que dieu ait ton âme en sa sainte miséricorde.

Oncles et tantes paternels

Cousins et cousines

Ma chère grande mère Latifa BENBOUBKER,

Oncles et tantes maternels

Cousins et cousines

Veillez accepter l'expression de ma profonde gratitude pour

vos encouragements et affection.

J'espère que vous retrouvez dans la dédicace de ce travail,

le témoignage de mes sentiments sincères

et de mes vœux de santé et de bonheur.

Remerciements

Cette thèse de Doctorat a été réalisée en collaboration entre le laboratoire de biologie des pathologies humaines de la faculté des sciences, Université Mohammed V de RABAT et le laboratoire d'analyses médicales et de cytogénétique BIOLAB de Rabat.

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements à Monsieur le Doyen de la faculté des Sciences Mohammed V de Rabat pour l'importance qu'il accorde à la recherche scientifique au département de Biologie.

*J'adresse mes sincères remerciements au **Pr. Youssef BAKRI**, Chef de département de Biologie à la faculté des Sciences de Rabat pour m'avoir honoré en acceptant de présider le Jury.*

*Ma plus profonde gratitude va au directeur de ma thèse, **Pr. Nadia DAKKA**, Professeur au département de Biologie, Faculté des Sciences de Rabat, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et pour m'avoir fait l'honneur de diriger ce travail et présider le Jury. Je vous suis reconnaissante, Professeur, pour la confiance et le soutien permanent que vous m'avez témoigné ainsi que pour la grande autonomie que vous m'avez accordée.*

*À ma co-encadrante, **Dr. Aziza BELKHAYAT**, médecin biologiste cytogénéticien et directrice du laboratoire d'analyses médicales et de cytogénétique BIOLAB. Je profite de l'occasion qui m'est ainsi donnée pour vous exprimer ma profonde reconnaissance tant pour m'avoir accordé votre confiance que pour m'avoir guidé dans mon travail tout au long de ces années de recherche. Votre expérience, votre patience et votre disponibilité m'ont été amplement bénéfiques. Vos précieux conseils et votre gentillesse à mon égard ont contribué au bon déroulement de ce travail. J'espère être digne de la confiance que vous avez placée en moi en me guidant dans l'élaboration de cette étude. Veuillez trouver dans ce travail ; très chère Docteur; le témoignage de mon affection et ma profonde gratitude pour votre présence permanente.*

*Je suis particulièrement reconnaissante au **Pr. Mohammed KHATTAB**, Chef de Service d'oncologie pédiatrique à l'Hôpital d'enfant de Rabat. Je vous remercie, Professeur, d'avoir aimablement accepté de prendre de votre temps pour juger notre travail et d'en être l'un des rapporteurs.*

Votre collaboration et votre confiance nous a permis de mener à bien cette étude.

Votre soutien et votre présence parmi les membres du jury constituent pour moi un grand honneur. Veuillez trouver dans ce travail ; l'expression de ma reconnaissance et mes vifs remerciements.

*J'adresse mes sincères remerciements au **Pr. Rabii AMEZIANE El HASSANI**, PES à la faculté des Sciences de Rabat pour m'avoir honoré en acceptant de juger ce travail.*

*Je voudrais exprimer ma reconnaissance au **Pr. Jamila EL BAGHDADI**, chef de l'unité de génétique à l'Hôpital Militaire d'instruction Mohamed V. Rabat, d'avoir accepté de juger le contenu de ma thèse et d'en être l'un des rapporteurs.*

*Je tiens à remercier vivement, le **Pr. Karim OULDIM**, PES en génétique à la faculté de médecine et de Pharmacie de Fès et chef de l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique au Centre Hospitalier Universitaire Hassan II, pour l'honneur que vous m'avez fait en participant à mon jury de thèse en qualité de rapporteur de mon travail.*

*Je remercie également toute l'équipe du SHOP notamment : **Pr. Laila HESSISSEN**, **Pr. Mohamed EL KHORASSANI**, **Pr. Maria El KABABRI** et **Pr. Amina KILI**. Veuillez trouver dans ce travail le témoignage de ma respectueuse considération et de ma gratitude.*

*Un spécial remerciement s'adresse à l'association «**GLOBAL PEDIATRIC MEDICINE**» de l'Hôpital de recherche **St. Jude** à Memphis USA pour leur soutien financier qui nous a permis de réaliser l'étude cytogénétique des patients qui ont fait sujet de la présente étude.*

*Je remercie également **Mme. Saida EL MOUAZZEN**, coordinatrice de programme de l'association St. Jude pour sa collaboration et sa réactivité permanente.*

*Je remercie **Pr. Latifa HILAL**, Professeur au département de Biologie, Faculté des Sciences de Rabat, d'avoir assuré l'encadrement des premières années de la présente thèse. Je vous dois, Professeur, mes plus vifs remerciements pour votre temps et précieux conseils.*

*Je voudrais également exprimer toute ma gratitude, au **Dr. Elbakkay CHADLI**, cytogénéticien au laboratoire d'analyses médicales et de cytogénétique BIOLAB ; ancien chef du laboratoire de cytogénétique à l'institut Pasteur Casablanca. Je vous remercie infiniment pour l'importance que vous avez accordée à ce projet, à votre contribution à sa bonne réalisation, à votre disponibilité tout au long des années de préparation de ma thèse et à vos précieux conseils qui m'ont énormément servi lors de mes années de travail au sein du*

laboratoire BIOLAB. Veuillez accepter, Docteur, l'expression de mon profond respect et mon estime les plus sincères.

*Je remercie également **Dr. Abderrahmane LATRACHE, Dr. Mohammed ABDELLATIFI, Dr. Said KARIB et Dr. Abdelouahab BENANI**, pour votre soutien et encouragements tout au long de mes années d'études.*

*Mes sincères remerciements s'adressent au **Pr. Mohamed ELHASSAN GHARBI**, Médecin spécialiste en Endocrinologie et maladies métaboliques. Vos encouragements inlassables, votre amabilité, votre gentillesse méritent toute admiration. Je saisis cette occasion, cher Professeur, pour exprimer à travers ce modeste travail la manifestation de notre plus haute estime et de nos sentiments les plus respectueux.*

*Je ne manquerai pas d'exprimer ma grande admiration à notre **Pr. Abdelkarim FIALI MALTOUF**, Professeur au département de Biologie, à la faculté des Sciences de Rabat et responsable de ma formation en master de Qualité microbiologique et sécurité sanitaire. Votre amabilité; votre dynamisme; votre dévouement pour le travail et votre compétence ont suscité mon admiration. Nous avons été fascinés par la qualité de votre personne et de votre enseignement. Cher maître, veuillez trouver ici l'expression de notre profond respect.*

*Par ailleurs, je tiens à remercier **Pr. Mohammed HALIM**, Directeur du Centre d'Etudes Doctorales en Sciences et Technologies de Rabat (CEDESTR).*

*Mes remerciements vont également à l'ancien directeur de CEDESTR **Pr. Mohammed LFERDE**.*

Il m'est particulièrement agréable de remercier tous mes collègues du laboratoire d'analyses médicales et de cytogénétique BIOLAB, pour leur encouragement, leur soutien et pour le réconfort qu'ils ont pu m'apporter. Les moments partagés avec vous, nos échanges et nos discussions font partie des meilleurs souvenirs de cette période doctorale. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

RESUME

La leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) est l'hémopathie maligne la plus fréquente chez l'enfant représentant près de 30% des cancers dans ce groupe d'âge. L'examen cytogénétique tient une place prépondérante dans le bilan biologique des LAL, conjointement à la cytologie, l'immunophénotypage et la biologie moléculaire. Il permet l'établissement du diagnostic, l'évaluation du pronostic et par conséquent l'orientation thérapeutique des LAL.

Nous rapportons dans ce travail les résultats d'une étude rétrospective réalisée au sein du laboratoire d'analyses médicales et de cytogénétique BIOLAB de 155 patients âgés de 1 à 17 ans adressés par l'hôpital d'enfant pour suspicion de LAL sur une période de 4 ans (2012-2016).

Il s'agit pour tous les patients d'une étude cytogénétique conventionnelle qui nous a permis d'identifier des anomalies chromosomiques clonales dans 66% du total des cas étudiés, dont 70% ont révélé une valeur pronostique nous permettant de stratifier les groupes de risques des patients ; ainsi l'hyperdiploïdie et la t(12;21), sont associées à un pronostic favorable dans les LAL, par conséquent, une chimiothérapie moins agressive est indiquée. Par contre, l'hypodiploïdie, la t(9;22), la t(8;14), la t(4;11) et les caryotypes complexes appartiennent à une catégorie à haut risque faisant appel à des thérapies plus agressives, basées sur une intensification de la chimiothérapie et le recours à des greffes de cellules de moelle osseuse.

La fréquence de la plupart des réarrangements chromosomiques identifiés dans notre étude est en corrélation avec celles rapportées dans les données publiées dans la littérature.

Mots clés : leucémie aiguë lymphoblastique, étude cytogénétique, anomalies chromosomiques, enfants, Maroc.

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common malignant hemopathy in children accounting for nearly 30% of all cancers in this age group. Cytogenetic analysis plays a prominent role in the biological assessment of ALL, along with cytology, immunophenotyping, and molecular biology. It allows the establishment of the diagnosis, the evaluation of the prognosis and consequently the therapeutic orientation of ALL.

We report in this work the results of a retrospective study carried out in BIOLAB laboratory of 155 patients aged from 1 to 17 years sent by the children's hospital for ALL suspicion over a period of 4 years (2012-2016).

We performed a conventional cytogenetic study for all patients that allowed us to identify clonal chromosomal abnormalities in 66% of the total studied cases, 70% of which revealed a prognostic value allowing us to stratify risk groups patients ; thus hyperdiploidy and t (12;21) are associated with a favorable prognosis in ALL, therefore less aggressive chemotherapy is indicated. In contrast, hypodiploidy, t (9;22), t (8;14), t (4;11), and complex karyotypes belong to a high risk category using more aggressive therapies, based on intensification of chemotherapy and the use of bone marrow cell transplants.

The frequency of most of the chromosomal rearrangements identified in our study correlates with those reported in literature data.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, cytogenetic study, chromosomal abnormalities, children, Morocco.

LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1</u> : Représentation schématique des différents compartiments du système hématopoïétique.....	4
<u>Figure 2</u> : Représentation schématique des principales étapes cibles des facteurs extrinsèques de l'hématopoïèse.....	7
<u>Figure 3</u> : Représentation schématique des différents types de leucémies.....	10
<u>Figure 4</u> : Aspect morphologique des cellules blastiques de la LAL1.....	25
<u>Figure 5</u> : Aspect morphologique des cellules blastiques de la LAL2..	25
<u>Figure 6</u> : Aspect morphologique des cellules blastiques de la LAL3.	25
<u>Figure 7</u> : Caryotype partiel montrant la translocation t(9;22)(q34;q11.2)	38
<u>Figure 8</u> : La t(4;11)(q21;q23) Cellule en métaphase, positive pour le réarrangement AF4/MLL détecté par la technique FISH.....	39
<u>Figure 9</u> : La t(11;19)(q23;p13.3)	40
<u>Figure 10</u> : La t(1;19)(q23;p13)	41
<u>Figure 11</u> : La t(12;21)(p13;q22).....	43
<u>Figure 12</u> : La AMPi21.....	44
<u>Figure 13</u> : Les différentes formes du chromosome 21 avec amplification du gène RUNX1..	41
<u>Figure 14</u> : La t(8;14)(q24;q32).....	45
<u>Figure 15</u> : La t(2;8)(p13;q24)	46
<u>Figure 16</u> : La t(8;22)(q24;q11).	46
<u>Figure 17</u> : La t(11;14)(p13;q11)	47
<u>Figure 18</u> : La t(1;14)(p32;q11).....	48
<u>Figure 19</u> : La t(10;14)(p24;q11).	49
<u>Figure 20</u> : Image de FISH de la t(5;14)(q35;q32)	50
<u>Figure 21</u> : Délétion du 6q-, du 9q- et du 12p-.....	50
<u>Figure 22</u> : Amélioration de la survie des enfants atteints de leucémie lymphoblastique aiguë entre	

les années 1960 et 2005.....	54
<u>Figure 23</u> : La réalisation du frottis sanguin.....	64
<u>Figure 24</u> : Étapes de la réalisation de la technique du caryotype.....	68
<u>Figure 25</u> : Lame de Malassez en verre.....	67
<u>Figure 26</u> : Comptage sur cellule de MALASSEZ.....	68
<u>Figure 27</u> : Flacon de 500ml du milieu de culture RPMI.....	69
<u>Figure 28</u> : Hotte à flux laminaire vertical.....	70
<u>Figure 29</u> : Etapes de mise en culture de la moelle osseuse pour étude cytogénétique.....	71
<u>Figure 30</u> : Culture avec mitogènes.....	72
<u>Figure 31</u> : Les phases de la mitose.....	74
<u>Figure 32</u> : Culot de culture cellulaire.....	76
<u>Figure 33</u> : Structure des chromosomes : bandes.....	80
<u>Figure 34</u> : Classification des chromosomes.....	83
<u>Figure 35</u> : Image d'une métaphase au grossissement 100.....	84
<u>Figure 36</u> : Exemple de caryotype masculin normal en bandes R.....	84
<u>Figure 37</u> : Étapes de la réalisation de la technique de FISH.....	86
<u>Figure 38</u> : Les différents types de sondes.	81

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau I</u> : La classification FAB des LAL.....	13
<u>Tableau II</u> : Valeurs normales d'un hémogramme.....	23
<u>Tableau III</u> : Valeurs normales d'un myélogramme.....	24
<u>Tableau IV</u> : Marqueurs définissant l'appartenance à une lignée cellulaire.....	26
<u>Tableau V</u> : Facteurs pronostics dans les LAL de l'enfant.....	32
<u>Tableau VI</u> : Liste des anomalies chromosomiques étudiées.....	51
<u>Tableau VII</u> : Evaluation de la réponse au traitement.....	58
<u>Tableau VIII</u> : Nomenclature génétique.....	82
<u>Tableau XIV</u> : Types de sondes utilisées.....	87

LISTE DES ABREVIATIONS

Abréviation	Signification
ABL	Abelson
ADN	Acide DésoxyRibonucléique
BCR	Breakpoint Cluster Region
CALLA	Commun Acute Lymphoblastic Leukemia
CGH	Comparative Genomic Hybridization
CIVD	Coagulation IntraVasculaire Disséminée
CSHP	Cellules Souches Hématopoïétiques Pluripotentes
CSL	Cellules Souches Leucémiques
del.	Délétion
EBV	Epstein Barr Virus
FAB	French – American – British
FISH	Fluorescence In Situ Hybridization
FT	Facteur de Transcription
GB	Globules Blancs
HLA	Human Leukocyte Antigen
HTLV 1	Human T-cell Leukemia Virus
IL	Interleukin
iso	Isochromosome
LAL	Leucémie Aigue Lymphoblastique
LAM	Leucémie Aigue Myéloblastique
LMC	Leucémie Myéloïde Chronique
MRD	Minimal Residual Disease
MLL	Mixed-Lineage Leukemia
MPO	Myélo Per Oxydase
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCL	Progéniteurs Communs de cellules Lymphoïdes
PCM	Progéniteurs Communs de cellules Myéloïdes
PCR	Polymerase Chain Reaction
Ph	chromosome Philadelphie
SNC	Système Nerveux Central
TEL	Translocation-Ets-Leukaemia
t	Translocation.
TCR	Récepteurs des Cellules T
RBTN2	Rhombotin-2
WHO	World Health Organisation.

SOMMAIRE

Dédicaces
Remerciements
Résumé
Liste des figures
Liste des tableaux
Liste des abréviations

Introduction générale.....	1
Chapitre I : Etude bibliographique.....	4
A. Hématopoïèse et oncogenèse.....	5
1- Hématopoïèse normale.....	5
2- Régulation de l'hématopoïèse.....	6
2-1 Le microenvironnement médullaire.....	6
2-2 Les vitamines et oligoéléments.....	6
2-3 Les facteurs de croissance.....	6
3- La cancérogenèse des leucémies (leucémogénèse).....	8
4- Classification des leucémies.....	9
4-1 Les leucémies chroniques.....	10
4-2 Les leucémies aiguës.....	10
B. Les leucémies aiguës lymphoblastiques de l'enfant.....	12
1. Historique	12
2. Définition.....	13
3. Classification des LAL.....	13
3-1 Classification FAB.....	14
3-2 Classification de l'OMS.....	14
3-2-1 Leucémie lymphoblastique aiguë de type B.....	15
3-2-2 Leucémie lymphoblastique aiguë de type T.....	15
4. Incidence.....	16
5. Etiologie et facteurs de risque.....	16
5-1 Facteurs génétiques.....	17
5-2 Facteurs exogènes et environnementaux.....	18
6. Symptomatologie clinique.....	20

6-1- Syndrome d'insuffisance médullaire.....	20
6-1-1 Syndrome anémique.....	20
6-1-2 Syndrome hémorragique d'origine plaquettaire.....	21
6-1-3 Syndrome infectieux d'origine granulocytaire.....	21
6-2- Syndrome tumoral.....	21
6-2-1 Douleurs osseuses.....	22
6-2-2 Atteinte tumorale lymphoïde et non-lymphoïde.....	22
7. Diagnostic biologique.....	22
7-1 Hémogramme.....	23
7-2 Myélogramme.....	24
7-3 Immunophénotypage.....	27
7-4 Cytogénétique	28
7-5 Cytogénétique moléculaire et Biologie moléculaire.....	29
7.5.1 La technique FISH.....	29
7.5.2 La technique CGH array.....	30
7.5.3 La technique de PCR.....	30
8. Pronostic.....	31
C. Anomalies cytogénétiques dans les LAL.....	34
1. Historique.....	34
2. Types d'anomalies chromosomiques.....	35
2-1 Les anomalies de nombre.....	35
2-2 Les anomalies de structure.....	38
2-2-1 Dans les LAL de phénotype B.....	38
2-2-2 Dans les LAL de phénotype T.....	47
2-2-3 Les anomalies non spécifiques à un phénotype B ou T.....	51
3. Intérêts de l'analyse cytogénétique.....	53
3-1 Intérêt dans la recherche fondamentale de la leucémogénèse.	53
3-2 Intérêt clinique dans le diagnostic, le pronostic et le traitement des	
LAL pédiatriques.....	53
3-2-1 Au niveau du diagnostic.....	53
3-2-2 Pronostic et traitement.....	54
D. Aspect Thérapeutique.....	55
1. Le Traitement Symptomatique.....	55

2. Le traitement de fond.....	56
2.1 Traitement d'induction.....	56
2.2 Traitement de consolidation.....	56
Chapitre II : Matériel et méthodes.....	60
1. Patients.....	61
1-1 Provenance.....	61
1-2 Critères d'étude.....	62
2. Prélèvement pour étude cytogénétique.....	62
3. Matériel et réactifs.....	63
3-1 Matériel.....	63
3-2 Consommable.....	64
3-3 Réactifs.....	64
4. Mode opératoire : Techniques autres que la cytogénétique.....	65
4-1 Hémogramme.....	65
4-2 Cytologie et frottis sanguin.....	65
4-3 Réaction cytochimique par la Myéloperoxydase.....	66
4-4 Myélogramme.....	66
4-5 Immunophénotypage.....	67
5. Etude cytogénétique.....	68
5.1 La culture cellulaire.....	69
5.1.1 Comptage sur cellule de Malassez.....	69
5.1.2 Milieu de culture RPMI.....	71
5.1.3 Mise en culture.....	72
5.1.4 Culture avec mitogènes.....	73
5.1.5 Technique de la culture synchronisée.....	74
5.1.6 Cas particulier.....	75
5.2 La récolte.....	74
5.2.1 Traitement à la colchicine.....	74
5.2.2 Choc hypotonique.....	75
5.2.3 Fixation.....	76
5.2.4 Etalement des lames.....	78
5.3 Dénaturation des chromosomes.....	79
5.4 Coloration des lames.....	81

5.5	Observation au microscope.....	82
5.6	Interprétation du caryotype.....	83
5.6.1	Classification des chromosomes.....	83
5.6.2	Interprétation.....	85
5.6.3	Nombre de mitoses à examiner.....	87
5.6.4	Conservation des échantillons.....	87
5.7	La technique FISH : hybridation in situ par fluorescence.....	88
	Résultats.....	91
	I- Article N°1: Cytogenetic Profile of Moroccan Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: Analysis of 155 Cases with a Review of the Literature.....	92
	II- Article N°2: The rare translocation t(14;21)(q11;q22) detected in a Moroccan patient with T-cell acute lymphoblastic leukemia.....	104
	Discussion.....	110
	Conclusion.....	116
	Annexes.....	119
	Références bibliographiques.....	130
	Résumé.....	144

*INTRODUCTION
GENERALE*

Les leucémies aiguës sont des proliférations clonales et malignes de cellules hématopoïétiques immatures (blastes), bloquées dans leur processus de différenciation, qui envahissent la moelle osseuse puis le sang périphérique et finalement de nombreux organes.

Si la classification cytologique et cytochimique du groupe Franco-Américano-Britannique (FAB) reste déterminante pour la caractérisation des leucémies aiguës, l'étude du phénotype immunologique et l'examen cytogénétique sont des compléments indispensables pour affiner le diagnostic et apprécier le pronostic de ces hémopathies.

L'étude du phénotype immunologique permet de distinguer les LAL de la lignée B et T afin d'assigner les malades à un protocole thérapeutique approprié.

L'étude cytogénétique des leucémies aiguës, quant à elle, permet la mise en évidence d'anomalies chromosomiques acquises et non aléatoires dans 60 à 90% des cas.

Ces anomalies sont de mieux en mieux précisées grâce aux progrès de la cytogénétique hématologique, ce qui fait de cet examen un élément clé de l'évaluation initiale de tout patient porteur d'une leucémie aiguë du fait de ses implications diagnostiques et pronostiques qui conditionnent la prise en charge thérapeutique.

Certaines anomalies sont spécifiques et sont corrélées avec la classification FAB et permettent de conforter le diagnostic (ou constituent un apport diagnostique précieux dans certains cas d'interprétation cytologique difficile).

Par ailleurs le caryotype permet l'identification d'anomalies cytogénétique spécifiques ou non spécifiques qui ont une valeur pronostique majeure permettant de prédire la réponse au traitement, la durée de rémission et la survie globale. Trois groupes pronostiques ont pu être identifiés par comparaison aux caryotypes normaux : favorable (meilleure survie que les caryotypes normaux), intermédiaire (même pronostic) et défavorable (survie inférieure).

En plus de l'intérêt diagnostique et pronostique, la cytogénétique est à la base de la découverte des gènes impliqués dans les phénomènes de leucémogénèse, et la biologie moléculaire s'intègre logiquement à sa suite pour leur compréhension. Ses applications en pratique clinique sont croissantes, qu'il s'agisse d'une détection affinée de certaines translocations ou d'appréciation de la maladie résiduelle.

Ainsi l'introduction du caryotype hématologique par la technique de cytogénétique conventionnelle et son utilisation en pratique courante représente l'essentiel de notre travail.

Après un rappel sur la leucémie aiguë lymphoblastique et ses caractéristiques épidémiologiques, physiopathologiques, cliniques et évolutives nous nous intéresserons aux aspects

cytogénétiques de la leucémogénèse et aux caractéristiques cytogénétiques des différents types de LAL avant de mettre en évidence l'intérêt et l'impact de leur classification en groupes de risque.

OBJECTIFS DU TRAVAIL :

1/ Etudier les anomalies chromosomiques associées aux leucémies aiguës lymphoblastiques de l'enfant.

2/ Etablir la fréquence des anomalies chromosomiques dans les leucémies aiguës lymphoblastiques au Maroc en comparaison aux données de la littérature.

3/ Définir les valeurs diagnostiques et pronostiques de chaque anomalie.

4/ Etablir la corrélation entre les différentes anomalies chromosomiques et la classification FAB.

5/ Etablir les corrélations entre les résultats du caryotype et le pronostic des LAL.

6/ Rechercher les gènes impliqués dans l'oncogenèse hématologique et comprendre leur mécanisme d'action.

CHAPITRE I :
ETUDE
BIBLIOGRAPHIQUE

A- HEMATOPOÏÈSE ET ONCOGENESE :

1- HEMATOPOÏÈSE NORMALE :

L'hématopoïèse est l'ensemble des mécanismes de prolifération et de différenciation qui conduisent à la production continue et régulée des différents types de cellules sanguines : les globules rouges (érythrocytes), les globules blancs (leucocytes) et les plaquettes (thrombocytes).

L'hématopoïèse comporte 4 compartiments cellulaires : les cellules souches hématopoïétiques pluripotentes (CSHP), les progéniteurs, les précurseurs et les cellules matures. Les CSH sont des cellules capables d'autorenouveau et de différenciation en cellules de toutes les lignées hématopoïétiques [1].

En se divisant, la CSHP conduit à la formation de progéniteurs communs de cellules lymphoïdes (PCLs) et de progéniteurs communs de cellules myéloïdes (PCMs). La différenciation et maturation des PCLs conduit à la production des différents types de cellules lymphoïdes, à savoir les lymphocytes B et T et les *natural killers* (NK), et des granulocytes/monocytes, les plaquettes et les érythrocytes dans le cas des PCMs (Figure 1) [2].

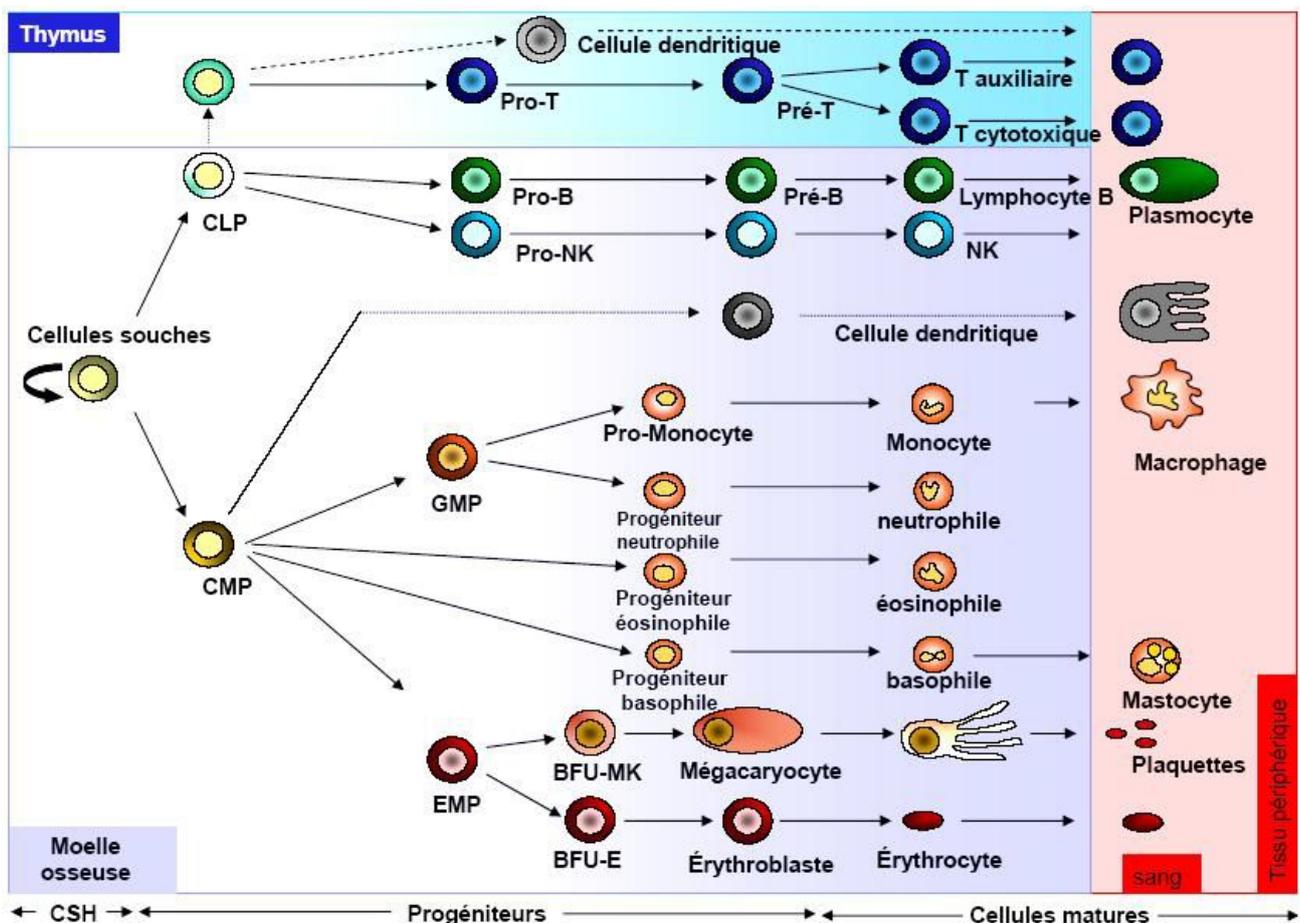


Figure 1: Représentation schématique des différents compartiments du système hématopoïétique [3]

GMP : progéniteurs granulocytaire monocytaire, EMP : progéniteurs érythroïdes, BFU : Burst Forming Unit

2- REGULATION DE L'HEMATOPOÏESE:

Les cellules souches de la moelle constituent la base indispensable à une hématopoïèse efficace. Trois éléments jouent également un rôle important pour obtenir une hématopoïèse correcte et régulée: le microenvironnement médullaire, certaines vitamines et oligoéléments, les facteurs de croissance [4].

2-1 Le microenvironnement médullaire :

Il participe à l'organisation générale de la moelle. Il donne aux cellules souches les conditions anatomiques et intercellulaires satisfaisantes pour assurer l'hématopoïèse.

Le stroma médullaire est formé de différents types de cellules: fibroblastes, cellules endothéliales, macrophages, cellules épithéliales et adipocytes. Ces cellules du stroma sont organisées au sein des logettes hématopoïétiques. Elles sécrètent des matrices extracellulaires et des facteurs de croissance. Les matrices extracellulaires permettent l'adhésion des cellules souches en particulier grâce au collagène [4].

2-2 Les vitamines et oligoéléments :

Ce sont des éléments indispensables à l'hématopoïèse: certains agissent sur l'ensemble des lignées cellulaires. C'est le cas de la vitamine B12 et de l'acide folique qui sont nécessaires à la synthèse de l'ADN et donc à la division cellulaire. Ces vitamines sont dites anti mégaloblastiques. Leur déficit entraînera des anomalies de formation dans toutes les lignées.

D'autres sont nécessaires à la fabrication de protéines spécifiques de lignées. C'est le cas du fer, indispensable à l'érythropoïèse pour la synthèse de l'hémoglobine [4].

2-3 Les facteurs de croissance :

L'étude des cellules souches par culture de moelle in vitro a montré la nécessité de "facteurs de croissance hématopoïétiques" pour la survie, la différenciation, la multiplication et la maturation des cellules de l'hématopoïèse. Le premier facteur connu a été l'érythropoïétine (EPO). Leur rôle exact dans l'hématopoïèse est de mieux en mieux défini. Ils permettent de grands espoirs dans le traitement des maladies de l'hématopoïèse et certains sont déjà utilisés en thérapeutique.

Les facteurs de croissance hématopoïétiques sont des glycoprotéines agissant comme des "hormones hématopoïétiques". Elles sont synthétisées par un grand nombre de cellules

présentes dans divers organes: cellules endothéliales, fibroblastes, monocytes / macrophages, lymphocytes [4].

Les cytokines reconnaissent leurs cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques. On distingue schématiquement 3 types de facteurs de croissance selon leur lieu d'action au cours de l'hématopoïèse:

*** Les facteurs de promotion:**

Ce sont principalement l'IL-6 (Interleukine-6) et le SCF (Stem Cell Factor), le Flt3-ligand, le LIF (Leukemia Inhibiting Factor). Ils augmentent le nombre de cellules souches en cycle cellulaire et sensibilisent les cellules souches multipotentes à l'action des autres facteurs de croissance.

*** Les facteurs multipotents:**

Ce sont principalement l'IL3 et le GM-CSF (CSF = Colony Stimulating Factor). Ils agissent sur les cellules souches les plus immatures après sensibilisation par les facteurs de promotion et ils permettent la survie et la différenciation des cellules souches.

*** Les facteurs restreints:**

Ils agissent sur les cellules souches engagées et favorisent la multiplication cellulaire et la maturation des précurseurs. Ce sont principalement : le G-CSF (lignée granuleuse neutrophile), le M-CSF (lignée monocytaire), l'IL 5 (lignée granuleuse éosinophile), l'IL 4 (lignée granuleuse basophile), l'IL6 (lignée mégacaryocytaire), l'EPO (lignée érythroïde) la TPO (thrombopoïétine, mégacaryocytaire) [4].

Ce niveau de régulation regroupe des protéines de liaison à l'ADN dont un grand nombre est impliqué dans des translocations chromosomiques ou des mutations somatiques dans les hémopathies malignes. Alors que certains de ces FTs sont importants dans la formation et le fonctionnement de la CSHP, d'autres sont primordiaux dans la différenciation lignée-spécifique. Parmi les gènes importants pour la formation et le fonctionnement de la CSHP, on retrouve les gènes *MLL* (*Mixed-Lineage Leukemia*), *RUNX1* (*runt-related transcription factor 1*), *ETV6* (*ETS variant gene 6*), et *LMO2*. D'autre part, des gènes tels que *C/EBP α* ou *GATA1* sont importants dans la différenciation. Les facteurs lignée-spécifiques favorisent la différenciation en une lignée spécifique tout en réprimant des facteurs spécifiques à d'autres lignées (Figure 2) [5].

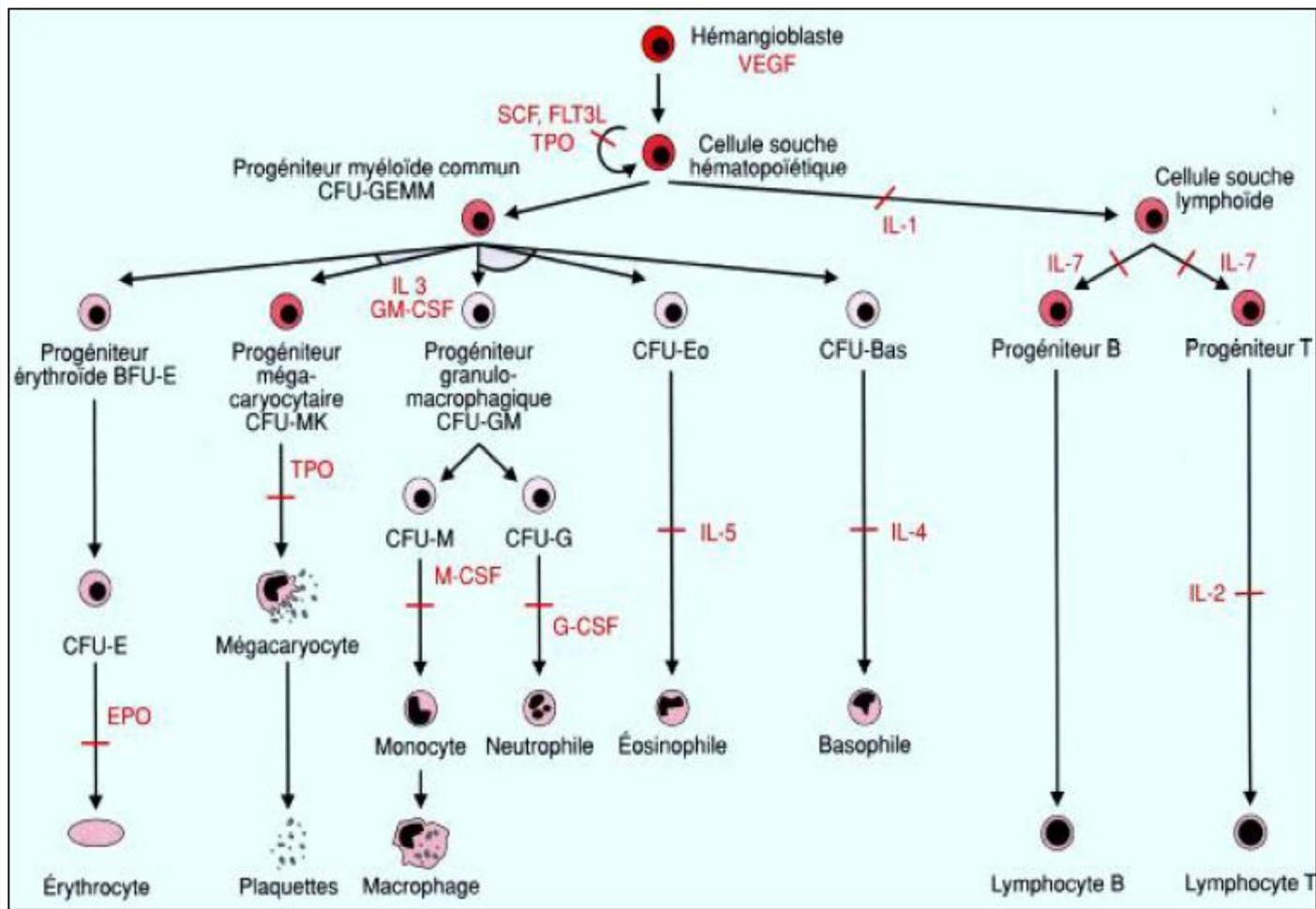


Figure 2 : Représentation schématique des principales étapes cibles des facteurs extrinsèques de l'hématopoïèse [3].

VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, EPO : Erythropoïétine, TPO : Thyroperoxydase, CFU : Unité Formant Colonie

3- LA CANCEROGENESE DES LEUCEMIES (LEUCEMOGENESE) :

Dans les organismes pluricellulaires, chaque cellule constitue une entité morphologiquement et fonctionnellement distincte, mais qui reste toutefois, soumise en permanence à des mécanismes de contrôle et de régulation extrêmement rigoureux. Parfois, les cellules échappent à ces systèmes qui inhiberaient leurs multiplications et se comportent ainsi comme des cellules embryonnaires primitives avec une incapacité partielle ou totale à subir les transformations morphologiques et fonctionnelles qui devraient leur permettre de se différencier, de se spécialiser en une cellule mature [6].

La perturbation de l'hématopoïèse peut donc être à l'origine d'une hémopathie maligne. Ce dysfonctionnement peut être consécutif à une expression inadaptée ou à des altérations structurales de certains gènes suite à des mutations ponctuelles ou à des anomalies de structures telles que les translocations chromosomiques. On entend par hémopathie

maligne un groupe de pathologies regroupant les leucémies, les lymphomes, les syndromes myéloprolifératifs (SMP) et les syndromes myélodysplasiques (SMD) [6].

La leucémie est un ensemble de processus hématopoïétiques aberrants prenant origine dans des cellules souches leucémiques (CSL) ayant accumulé des mutations et/ou des remaniements chromosomiques. Ces altérations permettent à la cellule de maintenir ou de réacquies la capacité d'autorenouvement et de prolifération clonale indéfinie [7].

Comme pour la majorité des cancers, la leucémogénèse impliquerait une interaction entre les gènes et l'environnement. Les expositions à des substances toxiques ou carcinogènes durant la grossesse chez la femme pourraient causer des dommages à l'ADN. Même si plusieurs facteurs, tels que certaines infections, la consommation de drogues et la déficience en folate, sont proposés comme carcinogènes *in utero*, il n'existe pas d'évidences concluantes du lien entre l'exposition pré-gestationnelle et le cancer.

Les principales cibles des altérations génétiques responsables du cancer sont celles des gènes impliqués dans la régulation positive et négative de la prolifération, de la différenciation, de la sénescence et de l'apoptose cellulaire ainsi que les gènes responsables du maintien de l'intégrité du génome [8].

4- CLASSIFICATION DES LEUCEMIES :

Les leucémies constituent un groupe très hétérogène d'affections hématologiques clonales, caractérisées par une prolifération anarchique, maligne, dans la moelle osseuse d'un clone cellulaire anormal du tissu hématopoïétique, bloqué à un stade précis de différenciation, avec expansion de cellules immatures qui peuvent être présentes dans le sang périphérique.

Selon le type cellulaire incriminé, on distingue :

- Les leucémies dans lesquelles le clone cellulaire prolifère essentiellement dans la moelle, diffuse dans le sang et envahit finalement la plupart des organes par voie sanguine.
- Les lymphomes malins dans lesquels la prolifération néoplasique est surtout ganglionnaire, revêt un caractère localisé et qui essaime ensuite par voie lymphatique et sanguine (Figure 3).

En matière de leucémies, il est important de distinguer les leucémies myéloïdes des lymphoïdes, et de définir ensuite le caractère aigu ou chronique de la prolifération, ainsi:

4-1 Les leucémies chroniques :

Suivant qu'il s'agisse de cellules lymphocytaires ou myéloïdes, on parle de leucémie myéloïde chronique (LMC) ou de leucémie lymphoïde chronique (LLC).

- **La leucémie myéloïde chronique (LMC) :**

C'est un syndrome myéloprolifératif. C'est une maladie clonale de la cellule souche pluripotente hématopoïétique caractérisée par la prolifération prédominante de la lignée granulocytaire. Elle prédomine dans la moelle osseuse, la rate, le foie. Ces deux derniers sont les sièges d'une métaplasie myéloïde accompagnée d'une hyperleucocytose avec myélémie dans le sang périphérique. Le risque d'être atteint de la LMC est très faible chez les enfants mais augmente avec l'âge. La LMC est associée au chromosome Philadelphie qui confirme le diagnostic et permet de faire le suivi de la rémission cytogénétique.

- **La leucémie lymphocytaire chronique (LLC) :**

C'est une maladie clonale se traduisant par la prolifération et l'accumulation de lymphocytes matures. Elle est définie par une augmentation permanente (sur une période d'au moins trois mois) de la concentration lymphocytaire au-dessus de $5 \times 10^9/l$. La LLC apparaît presque toujours chez des personnes de plus de 55 ans. C'est la forme de leucémie la plus courante dans l'ensemble et touche environ deux fois plus d'hommes que de femmes. Elle apparaît plus lentement que la LAL.

4-2 Les leucémies aiguës :

Elles sont caractérisées par une évolution clinique rapide et par la prolifération dans la moelle osseuse (voire dans le sang) de cellules bloquées à un stade précoce de leur différenciation, appelées «blastés» avec un hiatus leucémique.

Suivant l'origine des blastés, on parle de lymphoblastes (cellules normalement destinées à devenir des lymphocytes) ou de myéloblastes (normalement destinées à devenir des polynucléaires, des plaquettes ou des globules rouges) et donc de leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) ou lymphoblastiques (LAL).

- **Les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) :**

Ce sont des proliférations néoplasiques de précurseurs médullaires des lignées granuleuses, monocytaires, érythroïdes ou plaquettaires, associées à un blocage de maturation

de ces précurseurs au stade de blastes, qui s'accumulent dans la moelle, dans le sang, et éventuellement dans d'autres organes. Par ailleurs, il existe un déficit de production de cellules matures, d'où une anémie, une neutropénie / hyperleucocytose et une thrombopénie / thrombocytose, et leurs conséquences cliniques.

La transformation maligne peut toucher les précurseurs des différentes lignées sanguines myéloïdes (Granulocytaire, monocytaire, érythrocytaire et mégacaryocytaire), donnant lieu aux différents types de leucémies aiguës myéloblastiques.

La LAM est la forme de leucémie aiguë qui touche le plus souvent les adultes.

- **Les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) :**

Les LAL sont des hémopathies malignes aiguës correspondant à une prolifération monoclonale des cellules souches engagées dans la différenciation lymphoïde B (LAL B) ou T (LAL-T), à point de départ médullaire, de lymphoblastes, s'accompagnant constamment d'une insuffisance médullaire due à l'envahissement des cellules leucémiques (blastes) dans le sang et la moelle osseuse des patients. Elle est la forme la plus courante chez les enfants.

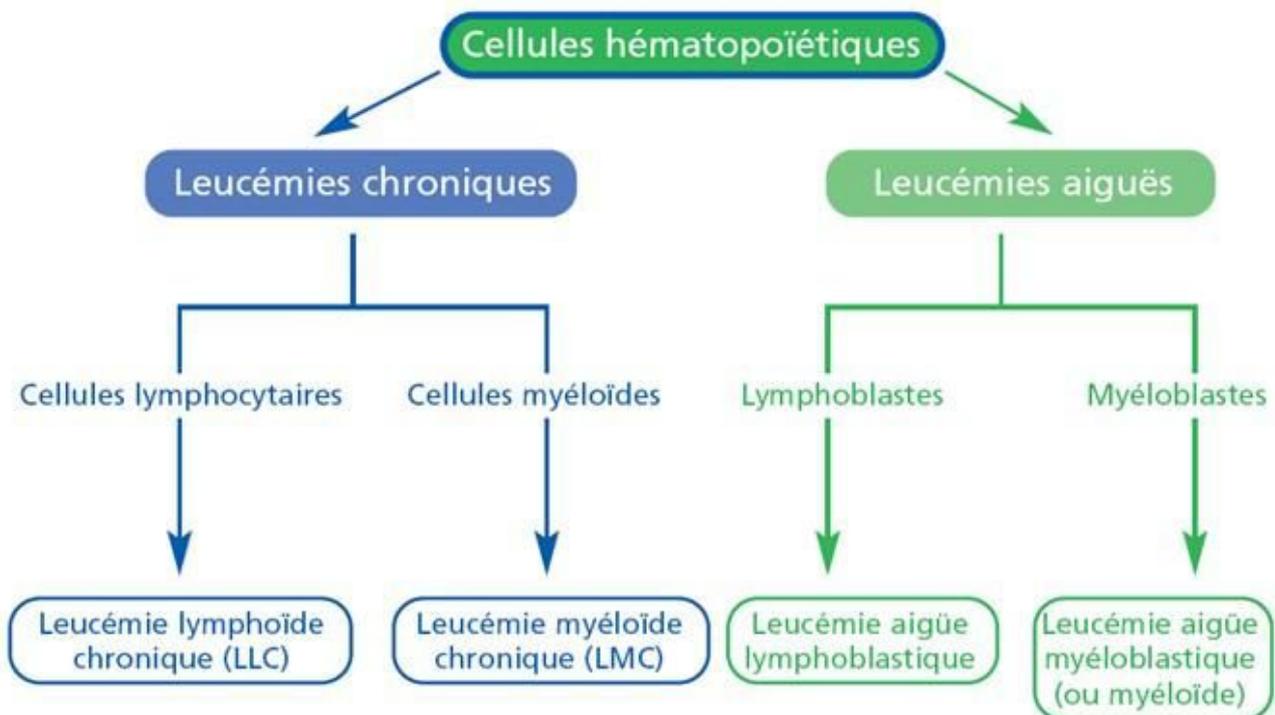


Figure 3 : Représentation schématique des différents types de leucémies [8].

Dans ce projet, nous nous intéresserons aux perturbations de l'hématopoïèse spécialement au niveau des cellules engagées dans la lignée lymphoïde, engendrant une leucémie lymphoblastique particulièrement retrouvée chez l'enfant.

B- LES LEUCEMIES AIGUES LYMPHOBLASTIQUES DE L'ENFANT

1- HISTORIQUE :

Les premières descriptions de la "leucémie" se produisirent simultanément mais indépendamment en France, en Allemagne et en Grande Bretagne vers 1850 par : David Craigie, Alfred Donné et, de manière plus explicite, John Bennett et Rudolf Virchow [9].

Le terme leucémie fit son entrée dans le langage médical en 1856, dérivé du terme allemand "leukamie" qui fût introduit dans le vocabulaire spécialisé par l'allemand Rudolf Virchow en 1847; Du grec *leukos* qui signifie " blanc lumineux, blanc éclatant " et *aima* qui veut dire "sang".

Ils définissaient la leucémie par l'association d'un excès de globules blancs et d'une hypertrophie de la rate, du foie et/ou des ganglions lymphatiques.

La caractérisation de la leucémie et son autonomisation nosologique à cette époque résulta d'avancées techniques et conceptuelles dans divers domaines : La microscopie, l'émergence de la théorie cellulaire et de l'intérêt sans précédent pour le sang [10].

Dès les premières descriptions de ces pathologies et avec le développement des connaissances en médecine et en biologie, une confusion s'est installée dans les termes utilisés pour désigner les différents cas. Cela rendait difficile la comparaison des résultats de recherches. La classification des leucémies en une série de variétés distinctes s'est imposée du simple fait de leurs diversités cytomorphologiques. Cette constatation a débouché sur la réunion d'un groupe de travail composé d'hématologistes français, américains et britanniques en 1974 et leurs travaux ont conduit à la publication en 1976 de la classification FAB (French – American – British) qui distingue 3 approches complémentaires pour établir une classification : L'aspect clinique, la cytomorphologie et la cytochimie. Ces subdivisions ont montré par la suite un intérêt pronostique du fait de leurs sensibilités différentes aux chimiothérapies.

La conception FAB de la classification des hémopathies malignes en général et des leucémies en particulier a évolué avec le développement des connaissances surtout en cytogénétique, en immunologie, et en biologie moléculaire. Ceci a conduit à l'apparition de nouveaux critères dans le sens d'une meilleure distinction entre les diverses formes de leucémies en général et des leucémies aigues en particulier et à une réduction de l'inclassable

dans le but de définir des entités biologiquement homogènes et cliniquement pertinentes; c'est la classification OMS mise en œuvre en 1992, qui est la plus limpide [11].

2- DEFINITION :

Les leucémies de l'enfant sont un groupe hétérogène d'entités clinico-biologiques représentant le cancer le plus fréquent de l'enfant. Il s'agit d'une prolifération monoclonale constituée de cellules hématopoïétiques jeunes ayant été figées à un stade précoce de maturation avec un hiatus leucémique.

Le caractère aigu de la leucémie est défini par le potentiel évolutif rapide (en quelques semaines) des symptômes et signes biologiques de la maladie et le caractère rapidement létal des troubles viscéraux engendrés, ceci en l'absence d'un traitement efficace.

Le développement des études immunologiques et de la génétique a permis de mieux caractériser les diverses entités et comprendre les mécanismes physiopathologiques des leucémies aiguës. Les progrès liés à une meilleure stratification des facteurs pronostiques et une amélioration des soins de support permettent actuellement des taux de survie à long terme de 70 à 80% dans les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) et 50 à 60% dans les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) [12][13].

La LAL se caractérise par une prolifération monoclonale des cellules souches engagées dans la différenciation lymphoïde B ou T, arrêtées au stage de lymphoblastes, s'accompagnant constamment d'une insuffisance médullaire due à l'envahissement des cellules leucémiques (blastés) dans le sang et la moelle osseuse des patients et leur infiltration dans les tissus [12][13].

3- CLASSIFICATION DES LAL :

La classification morphologique des hémopathies malignes proposée par le groupe franco-américano-britannique (FAB) dès 1976 et modifiée en 1982, reposait sur une distinction des LAL selon des critères qualitatifs de morphologie et de cytochimie, et quantitatifs de dénombrement de blastés dans le sang ou dans la moelle [13]. Elle s'est imposée pendant deux décennies. Le développement des méthodes de cytogénétique à partir des années 1980, de l'immunophénotypage puis de la biologie moléculaire ont rapidement confirmé la solidité des bases de cette classification FAB [14]. Mais ces progrès ont aussi souligné le besoin d'une

nouvelle nosologie pour prendre en compte de façon globale l'ensemble des données biologiques obtenues à l'aide des nouvelles techniques. Une classification MIC (Morphologie, Immunologie, Cytogénétique) est née de ces réflexions [15], mais n'a pas été utilisée en pratique clinique, et c'est ultérieurement que l'OMS s'est penchée sur le sujet [16][17]. Celle-ci a intégré, pour la première fois en 2001, les facteurs génétiques aux autres facteurs morphologiques, immunophénotypiques, cytochimiques et cliniques dans la classification [18].

3.1. LA CLASSIFICATION FAB

Cette classification subdivise les LAL en trois groupes : L1, L2, et L3 (Tableau I) [19].

Type de LAL	Particularités
LAL-1	Petits blastes monomorphes, noyau régulier, peu ou pas de nucléoles, cytoplasme très réduit. Forme habituelle chez l'enfant (85 % des cas)
LAL-2	Blastes hétérogènes en forme et taille, noyaux et nucléoles parfois irréguliers, cytoplasme plus étendu. Forme habituelle chez l'adulte (65 % des cas)
LAL-3	Nommée également cellules de Burkitt Cellules régulières de taille moyenne, cytoplasme très basophile, souvent criblé de vacuoles– Rare, 3% des LAL

Tableau I : La classification FAB des LAL [20]

L'immunophénotypage permet en deuxième lieu de déterminer le type de marqueurs de surface des blastes, c'est-à-dire s'il s'agit de cellules lymphocytaires B ou T. La leucémie lymphoblastique aiguë de type B (LAL-B) est la prolifération non régulée de cellules progénitrices engagées dans la lignée lymphocytaire B. La leucémie lymphoblastique aiguë de type T (LAL-T) est la prolifération non régulée de cellules progénitrices engagées dans la lignée lymphocytaire T [21].

3.2. CLASSIFICATION DE L'OMS

La classification de l'OMS a introduit les anomalies génétiques dans la classification car il s'agit de facteurs pronostiques importants.

3.2.1. Leucémie lymphoblastique aiguë de type B

Selon la classification de l’OMS de 2008, les LAL-B sont divisées en 2 groupes :

- Les LAL-B associées à des anomalies génétiques récurrentes.
- Les LAL-B non associées à des anomalies génétiques récurrentes.

Dans le premier groupe, on retrouve les anomalies suivantes :

- t(9;22)(q34;q11.2) conduisant à la formation du gène de fusion BCR-ABL1
- les translocations impliquant un réarrangement de MLL (11q23) : principalement la t(4;11)(q21;q23) et la t(11;19)(q23;p13.3)
- t(12;21)(p13;q22) conduisant à la fusion ETV6-RUNX1
- l’hyperploïdie, avec un nombre de chromosomes compris entre 51-57
- l’hypoploïdie, avec un nombre de chromosomes inférieur à 45
- t(5;14)(q31;q32) IL3-IGH conduisant à la surexpression d’IL3
- t(1;19)(q23;p13.3) entraînant la fusion *TCF3-PBX1*

Le deuxième groupe regroupe les LAL-B non associées à des anomalies génétiques récurrentes. Les critères de classification non génétiques seraient alors utiles pour identifier l’appartenance des blastes à la lignée lymphocytaire B [17][19].

3.2.2. Leucémie lymphoblastique aiguë de type T

Selon la classification de l’OMS de 2008, les LAL-T ne sont pas divisées selon les facteurs génétiques car ceux-ci ne sont pas clairement associés à des caractéristiques biologiques uniques des LAL-T. L’immunophénotype identifie et classe alors les blastes dans la lignée lymphocytaire T.

Les anomalies les plus récurrentes dans ce groupe sont les translocations impliquant les locus α et δ des récepteurs des cellules T (TCR) en 14q11.2, le locus β en 7q35 et le locus γ en 7p14-15 avec une liste étendue de partenaires (autres chromosomes impliqués dans la translocation). Ces translocations entraînent la surexpression des gènes partenaires, majoritairement des facteurs de transcription.

Dans les dernières années, la survie à 5 ans des patients atteints de LAL-T s’est considérablement amélioré grâce, en partie, à la mise en évidence d’anomalies chromosomiques impliquant des gènes de tyrosines kinases (t(9;22) ou chromosome Ph). Ces patients sont aujourd’hui traités avec des inhibiteurs de tyrosine kinases [22].

4- INCIDENCE :

Le cancer constitue un problème majeur de santé publique, selon l’OMS, plus de 8 millions de nouveaux cas de cancer sont déclarés chaque année avec plus de six millions de décès annuellement, dont la moitié survient dans les pays en voie de développement. Le cancer constitue ainsi la deuxième cause de mortalité (13%) après les maladies cardiovasculaires (WHO 2009).

Le cancer survient à tout âge, même à la naissance, il affecte un enfant sur 700 avant l’âge de 15 ans, correspondant à peu près à 2000 nouveaux cas par an en France. Chez l’enfant, le cancer est souvent curable sous réserve d’un diagnostic précoce et de traitement adéquat, celui-ci se caractérise par un taux de guérison largement supérieur à celui de l’adulte [23].

Parmi les différents types de cancer, la LAL est la plus fréquente tumeur maligne chez les enfants (âgés de 1-18 ans), ce qui représente près de 30% de tous les cancers dans ce groupe d’âge [23].

Elle survient chez 75 % des enfants de moins de six ans. Le pic d’incidence se situe entre les âges de 2 et 5 ans, plus marqué chez les garçons que chez les filles, et la grande majorité des cas (80%-85%) sont des précurseurs de la lignée B. Environ 80% des enfants atteints de LAL-B semblent être guéris [23].

Au Maroc, environ 30000 à 54000 personnes sont atteints par le cancer chaque année, dont plus de 1000 enfants. Ces chiffres sont malheureusement en constante progression. Face à l’ampleur de la maladie, les structures spécialisées sont aujourd’hui nettement insuffisantes, seuls 4 centres publics d’oncologie existent au Maroc (à Casablanca, Rabat, Marrakech et Fès) avec seulement deux unités pédiatriques (Rabat et Casablanca) et par rapport à celle observée dans les pays développés, le traitement est moins efficace. Le taux de survie après un traitement pour tous les enfants au Maroc est inférieur à 40 %, même dans les centres spécialisés [21]. En 2003, un programme de partenariat entre deux unités d’oncologie pédiatrique et le « programme de sensibilisation international St. Jude » a été mis en place afin d’améliorer les résultats des enfants marocains atteints de tumeurs malignes [21].

5- ETIOLOGIE ET FACTEURS DE RISQUE :

L’étiologie des leucémies n’est pas encore connue dans la majorité des cas. Les facteurs étiologiques les plus évidents, susceptibles d’être favorisants sont souvent d’ordres génétiques constitutionnels ou acquis et parfois environnementaux [24].

5.1. LES FACTEURS GENETIQUES :

Un syndrome génétique est un ensemble de symptômes causés par un changement, ou mutation, dans un ou plusieurs gènes. Ils sont transmis des parents aux enfants. Être atteint de certains syndromes génétiques peut accroître le phénomène d'instabilité génétique qui conduit à la modification d'une ou plusieurs séquences d'acides nucléiques par activation, inhibition ou fusion entre deux séquences modifiant la fonction du gène [25].

Les syndromes génétiques qui suivent font augmenter le risque de LAL, en particulier la LAL infantile:

Le syndrome de Down est causé par la présence d'une copie supplémentaire (troisième copie) du chromosome 21. Il est caractérisé par diverses anomalies congénitales, une déficience intellectuelle, un aspect facial caractéristique et un faible tonus musculaire chez le nourrisson. Les personnes atteintes du syndrome de Down risquent davantage d'avoir plusieurs complications, dont la leucémie infantile.

Par exemple, un enfant porteur d'une trisomie 21 a un risque multiplié par 50 de développer une leucémie avant 5 ans et rendent compte de 2 % du total des LAL de l'enfant. A distinguer d'une trisomie 21 acquise qui est fréquente au cours des LAL (30 %) [26][27].

Le syndrome de Bloom est causé par une instabilité chromosomique. Les personnes atteintes du syndrome de Bloom sont habituellement plus petites que la moyenne, elles ont une voie aiguë et un aspect facial caractéristique. Leur risque d'être atteintes de différents types de cancer, dont la LAL, est élevé.

L'anémie de Fanconi causé par une fragilité chromosomique avec augmentation du nombre des cassures chromosomiques. Elle affecte surtout la moelle osseuse en l'empêchant de produire suffisamment de globules rouges, de globules blancs et de plaquettes sains. Les personnes atteintes de l'anémie de Fanconi risquent davantage d'avoir des leucémies. C'est une maladie héréditaire qui nécessite un conseil génétique et un diagnostic anténatal.

L'ataxie-télangiectasies (AT) est une maladie génétique qui affecte le système nerveux, le système immunitaire et d'autres systèmes du corps. Les personnes atteintes de l'AT ont des difficultés à garder l'équilibre et ont des troubles de la coordination. Leur système immunitaire est souvent affaibli et le risque d'avoir un cancer est plus élevé, en

particulier pour le lymphome et les leucémies. L'ataxie-télangiectasie peut être à l'origine de la survenue de LAL-T avec anomalies chromosomiques impliquant le chromosome 14 [27].

La neurofibromatose de type 1 (maladie de von Recklinghausen) est caractérisée par l'apparition de tumeurs dans le tissu nerveux. Ces tumeurs se forment sous l'épiderme et peuvent atteindre les nerfs crâniens et la moelle épinière. Elle prédispose aux cancers, dont les leucémies.

➤ **Âge** : L'instabilité génétique augmente avec l'âge. Ainsi, l'augmentation de l'incidence des leucémies en général est proportionnelle à l'âge. C'est dû au phénomène de vieillissement des cellules souches marquées par l'érosion télomérique des chromosomes. Les télomères protègent normalement des accidents de la réplication; les cellules sont ainsi plus exposées à des cassures chromosomiques ou à des modifications génétiques, qui non réparées, causent un déficit de l'engagement dans l'apoptose lié à l'existence de ces anomalies génétiques [25].

5.2. LES FACTEURS EXOGENES ET ENVIRONNEMENTAUX :

➤ **Radiations ionisantes**

Exposition externe

L'exposition aux rayonnements ionisants à forte dose est un facteur de risque reconnu des leucémies infantiles. De plus, la littérature épidémiologique suggère un effet plus important des expositions aux rayonnements ionisants reçues durant l'enfance.

Un taux significativement élevé de LAL a été trouvé chez les populations d'enfants vivants autour des centrales nucléaires. Par exemple, l'étude des survivants de Hiroshima et Nagasaki montre un risque par unité de dose 5 à 10 fois plus élevé si l'exposition survient avant l'âge de 5 ans. Néanmoins, de nombreuses interrogations persistent pour ce qui est des risques associés aux très faibles expositions. [29][30].

Exposition in utero

L'étude « *Oxford Survey of Childhood Cancer* » initiée dans les années 1950 en Grande-Bretagne s'est intéressée au risque de cancer chez les enfants dont la mère avait été soumise à des examens radiologiques durant la grossesse. Elle incluait plus de 10 000 cas et témoins apparus nés entre 1943 à 1976. Un taux élevé de leucémie a été observé chez les enfants ayant reçu une exposition in utero à partir de 10 milli Gray [31][32].

Exposition au radon

De nombreuses études géographiques, portant sur le risque de leucémies lié au radon ont montré qu'il existait une association positive faible entre la concentration de radon dans l'habitat et la leucémie de l'enfant [33].

➤ Expositions aux pesticides

Il n'y a pas de lien bien établi entre l'exposition aux pesticides et le déclenchement de leucémies, malgré de nombreuses études réalisées sur le sujet [34]. Toutefois, certains trouvent une corrélation entre les pesticides à forte dose et pendant une longue période et les SMD.

➤ Expositions au benzène

Les études sur le risque de leucémies lié au benzène donnent des résultats divergents. Plusieurs études ont décrit l'absence d'association avec la pollution liée au trafic routier [34][35] alors que d'autres études établissent une association [36].

➤ Autres agents environnementaux

Il s'agit de peintures, de solvants ou d'exposition en raffinerie de pétrole. L'identification de ces facteurs est importante car elle peut aboutir sur une reconnaissance de maladie professionnelle.

Le tabac, l'alcool et un certain type d'alimentation au cours de la grossesse ont été suspects sans résultat clairement établi [37].

Une étude a rapporté un risque élevé de LAL dans la filiation de mères fumeuses, le risque augmentant si le père fume également [38].

➤ Facteurs infectieux :

Les facteurs infectieux ont été évoqués dans la genèse de LAL de l'enfant survenant le plus souvent à l'âge scolaire mais aucun agent infectieux n'a été impliqué formellement. Dans la LAL de Burkitt, équivalent leucémique du lymphome de Burkitt, le virus EBV (Epstein Barr Virus) joue un rôle leucémogène dans les formes survenant en Afrique (mais pas dans celles survenant en Europe). Ce rôle paraît lié au fait que ce virus augmente la prolifération des lymphocytes B infectés, favorisant la survenue d'anomalies génétiques dans ces cellules.

Dans une forme particulière de leucémie lymphoïde T de l'adulte, assez proche des LAL, et qui est principalement rencontrée au Japon et dans les Antilles, l'infection par le virus HTLV 1 (Human T-cell Leukemia Virus) intervient également dans la leucémogénèse, mais cette fois par l'intégration du virus dans le génome des lymphocytes T [39].

6- SYMPTOMATOLOGIE CLINIQUE :

Les leucémies n'ont en général aucune spécificité physiopathologique particulière d'où la difficulté d'établir un diagnostic fiable uniquement à partir d'un examen clinique. La manifestation sur ce plan de ces affections hématologiques peut être déterminée par deux processus majeurs, ainsi que certains aspects particuliers, de prévalences variables avec tous les extrêmes possibles.

Dans les LAL, notamment chez l'enfant, les syndromes tumoraux sont pratiquement constants, alors que dans les LAM, c'est l'insuffisance médullaire qui domine, le syndrome tumoral n'étant pas très parlant.

La symptomatologie clinique peut être regroupée en plusieurs syndromes, de prévalences variables, qui rendent compte essentiellement de *l'insuffisance médullaire* et du *syndrome tumoral* lié à l'envahissement [39]:

6.1. SYNDROME D'INSUFFISANCE MEDULLAIRE :

Il est lié à l'existence de blastes granuleux médullaires responsables de l'inhibition de l'hématopoïèse normale et de cytopénie(s) myéloïde(s). Le tableau clinique comporte de façon plus ou moins complète : une anémie, neutropénie et thrombopénie avec leurs conséquences : syndromes anémiques, infectieux et hémorragiques respectivement [40].

6.1.1. Syndrome anémique

Il existe une asthénie et une pâleur d'apparition récente. Il existe une dyspnée d'effort et/ou des troubles neuro-sensoriels d'origine anémique, bourdonnements d'oreille. L'anémie peut être sévère et parfois bien tolérée jusqu'à des taux d'hémoglobine très bas comme inférieurs à 5 g/dl.

L'examen clinique confirmera le syndrome anémique : pâleur cutanéomuqueuse, palpitations, tachycardie.

La transfusion de culots globulaires est réalisée si l'anémie est mal tolérée et/ou il existe une anémie sévère avec un taux d'Hb < 7,5 g/dL [41][42].

6.1.2. Syndrome hémorragique d'origine plaquettaire

On utilise le terme de thrombocytopénie pour un taux de plaquettes inférieur à 150000 par mm³ (la normale étant de 150000 à 400000 par mm³).

Le syndrome hémorragique d'origine plaquettaire est souvent de topographie cutanéomuqueuse sous forme d'un purpura pétéchial, prédominant aux membres inférieurs au début de l'expression de la maladie. Un purpura ecchymotique peut y être associé. L'existence de bulles hémorragiques buccales et/ou d'hémorragies au fond d'œil constituent des signes de gravité.

La tolérance de la thrombopénie dépend de l'âge, du terrain cardio-vasculaire, d'un tableau infectieux associé ou de troubles de la coagulation. Une telle association s'observe de façon élective dans la LAL de type Burkitt (LAL3) mais peut se voir dans toutes les formes de leucémie aiguë (un tableau hémorragique est présent chez environ 50 % des patients porteurs d'une LAL).

Il faut réaliser un support transfusionnel plaquettaire en culots plaquettaires d'aphérèse (ou CPA) s'il existe un syndrome hémorragique d'origine plaquettaire ou systématiquement si les plaquettes sont inférieures à 15 Giga/L ou si inférieures à 20 Giga/L en présence de signes infectieux ou de fièvre [43].

6.1.3. Syndrome infectieux d'origine granulocytaire

Le tableau infectieux est lié à la neutropénie souvent inférieure à 0,5 Giga/l. Il s'agit souvent d'angine ulcéro-nécrotique résistante au traitement ou d'une fièvre en rapport avec une infection cliniquement documentée ou bactériologiquement documentée ou une fièvre d'origine indéterminée. Il peut s'agir d'une infection localisée (pneumopathie) ou d'une septicémie avec un tableau de choc septique.

Le tableau infectieux nécessite une prise en charge en urgence. Le risque est celui de la survenue d'une insuffisance rénale aiguë et d'une défaillance cardio-vasculaire. Une fièvre peut être présente associée à une altération de l'état général [44].

6.2. SYNDROME TUMORAL :

Il est dû à la prolifération cellulaire anarchique des cellules leucémiques et leur infiltration dans les tissus (adénopathies, splénomégalie, hépatomégalie, et touchant parfois des localisations neuroméningées, cutanées et testiculaires).

Le syndrome tumoral peut être absent ou marqué par :

- des douleurs osseuses;
- et/ou une atteinte tumorale d'un tissu lymphoïde ;
- et/ou une atteinte tumorale d'un tissu non lymphoïde.

6.2.1. Douleurs osseuses

Elles sont fréquentes : 20-40% des LAL de l'enfant, surtout de la lignée B.

Elles sont localisées aux membres inférieurs et au voisinage des articulations, fixes, de rythme inflammatoire sans tuméfaction articulaire et réveillant l'enfant la nuit. Elles peuvent entraîner une boiterie ou un refus de la marche. Les douleurs sont typiquement axiales au niveau du bassin, du sternum, des côtes ou chez l'enfant au niveau des épiphyses fertiles simulant soit une ostéite : présence de bandes claires métaphysaires soit un rhumatisme articulaire aigu de l'enfant. Rarement le tableau est aigu avec tassement vertébral [45].

6.2.2. Atteinte tumorale lymphoïde et non-lymphoïde

On trouve des atteintes tumorales des organes lymphoïdes secondaires, plus fréquemment dans les LAL-T où le syndrome tumoral lymphoïde entraîne des adénopathies superficielles, symétriques, fermes, indolores et mobiles, touchant toutes les aires, mais en particulier cervicales.

L'atteinte médiastinale est associée à une LAL-T dans 95 % des cas. Il peut exister une splénomégalie, une hépatomégalie, une néphromégalie (LAL de la lignée B). On note la présence également d'atteintes tumorales non lymphoïdes, neuro-méningées, mais plutôt lors des phases évolutives (rechutes) ou tardives et avancées de la maladie hématologique [46].

7- DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE :

Pendant de nombreuses décennies, le diagnostic en matière d'oncologie hématologique dont les leucémies font partie, était le privilège des cytologistes. L'aisance du prélèvement sanguin, médullaire et ganglionnaire par ponction, la simplicité des techniques de coloration y a contribué.

Certes, l'étude cytologique quantitative et qualitative reste la base du diagnostic à travers la réalisation du frottis sanguin et médullaire, hémogramme et myélogramme. Cependant, des changements prodigieux sont intervenus avec la découverte des anomalies du caryotype, des oncogènes et le typage cellulaire par l'étude des antigènes de membrane grâce aux anticorps monoclonaux [48].

Le diagnostic biologique est indispensable pour confirmer le type de leucémie en cause.

Cependant, certains examens sont plus importants que d'autres. Le frottis sanguin et médullaire, l'hémogramme et le myélogramme restent des examens systématiquement réalisés en présence d'hémopathies, les réactions cytochimiques spécifiques (myéloperoxydase MPO) sont utilisées parfois pour préciser le caractère myéloïde ou lymphoïde de la prolifération. Les résultats obtenus par ces techniques sont parfois non concluants, ceci en présence de cas difficiles à classer surtout dans les LAL [49].

7.1. L'HEMOGRAMME

L'hémogramme, ou numération Formule Sanguine (NFS) est une étude quantitative et qualitative des différents éléments cellulaires du sang : les globules blancs (ou leucocytes), les globules rouges (ou hématies) et les plaquettes sanguines. C'est un examen essentiel pour apprécier un éventuel dysfonctionnement de la moelle osseuse ou des perturbations dites périphériques. Il apporte des renseignements sur les organes hématopoïétiques, sur les lignées sanguines, sur les processus de défense et sur l'hémostase. Il permet de révéler un grand nombre de pathologies : anémies, augmentation ou baisse des globules blancs en réponse à une attaque de l'organisme, problème de coagulation et consommation des plaquettes [50].

Dans la plupart des cas, les résultats de l'hémogramme fournis par l'automate sont anormaux à des degrés divers et montrent :

- des anomalies quantitatives isolées ou associées (apprécie le retentissement des cytopénies) :
 - anémie normo- ou macrocytaire non régénérative dans 89-90% des cas.
 - thrombopénie,
 - leucocytose variable, allant d'une leucopénie plus ou moins profonde avec neutropénie à une franche hyperleucocytose pouvant dépasser $100 \times 10^9/l$ globules blancs,
 - voire pancytopénie plus ou moins profonde ;
- et/ou des anomalies qualitatives (Met en évidence des cellules anormales) :

Il s'agit d'alarmes de suspicion d'éléments inhabituels (myélémie, cellules lymphoïdes anormales, blastes) fournies par l'automate. Leur spécificité est variable, mais leur présence, sur un échantillon vu pour la première fois, est une indication formelle à examiner le frottis de sang.

D'une façon générale, la présence d'anomalies qualitatives ou quantitatives de l'hémogramme rend indispensable l'examen du frottis de sang au microscope (Tableau II) [50].

Type de cellules	3 à 10 ans	Femme	Homme
Hématies (millions/mm³)	4,0-5,4	4.0 - 5.3	4.2 - 5.7
Hémoglobine (g/100 ml)	12.0 - 14.5	12.5 - 15.5	14.0 - 17.0
Hématocrite (%)	36 – 45	37 - 46	40 - 52
VGM (μ³)	74 – 91	80 - 95	80 - 95
TCMH (pg)	24 – 27	28 - 32	28 - 32
CCMH (%)	28 – 33	30 - 35	30 - 35
Leucocytes (/mm³x1000)	5000 - 11000	4000 - 10000	4000 - 10000
Réticulocytes (%)	0,2 - 0,8	0,3 - 0,8	0,3 - 0,8

Tableau II : Valeurs normales d'un hémogramme. VGM: volume globulaire moyen ; CCMH: concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine ; TCMH : teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine

7.2. LE MYELOGRAMME

Le myélogramme, également appelé médullogramme, est une étude quantitative et qualitative des différentes cellules de la moelle osseuse. C'est une analyse de la morphologie et de l'équilibre des différentes cellules présentes dans la moelle osseuse. Cette étude permet de diagnostiquer des cytopénies, des leucémies par un envahissement médullaire par des blastes.

Le myélogramme est réalisé en principe à la suite d'un hémogramme ayant mis en évidence des anomalies des éléments figurés du sang. Il permet d'apprécier quantitativement et qualitativement les précurseurs des différentes lignées (érythroblastes: précurseurs des globules rouges, leucoblastes : précurseurs des globules blancs polynucléaires lymphocytes et monocytes, mégacaryocytes: précurseurs des plaquettes sanguines), et éventuellement de suspecter une leucémie aigue si le taux de blastes est supérieur à 20%.

Le prélèvement de moelle osseuse en vue de la réalisation d'un myélogramme se fait par ponction sternale ou au niveau de la crête iliaque, après désinfection locale et éventuellement légère anesthésie locale à l'aide d'un trocart ou le plus souvent d'une fine aiguille à ponction (sous anesthésie générale en réanimation chez l'enfant).

Le prélèvement est alors rapidement étalé sur des lames en frottis qui seront ensuite colorés au May-Grünwald-Giemsa et observés au microscope. [51]

Le myélogramme confirme le diagnostic montrant une infiltration médullaire par des lymphoblastes (> 20% **par définition** mais souvent massive > 80%) (Tableau III).

Lignée	Stade	Pourcentage
Erythrocytaire (8 - 30 %)	Proérythroblaste	1 - 4 %
	Erythroblaste basophile	1 - 8 %
	Erythroblaste polychromatophile	2 - 10 %
	Erythroblaste acidophile	5 - 20 %
Granulocytaire (50 - 75 %)	Myéloblaste	0,5 - 4 %
	Promyélocyte	1 - 8 %
	Myélocyte neutrophile	5 - 20 %
	Métamyélocyte neutrophile	10 - 25 %
	Polynucléaire	10 - 30 %
Eléments non myéloïdes (3-15 %)	Lymphocytes	5 - 15 %
	Plasmocytes	0 - 2 %
	Monocytes	0 - 2 %
Mégacaryocytaire	Mégacaryocytes	10 à 100/frottis

Tableau III : Valeurs normales d'un myélogramme

Le myélogramme permet de réaliser une classification cytologique des LAL en 3 groupes cytologiques (LAL1 à LAL3) [52].

LAL de type L1

Les cellules blastiques sont non granuleuses, présentant une petite taille et un rapport nucléo-cytoplasmique élevé (Figure 4).

Forme habituelle chez l'enfant (85 % des cas)

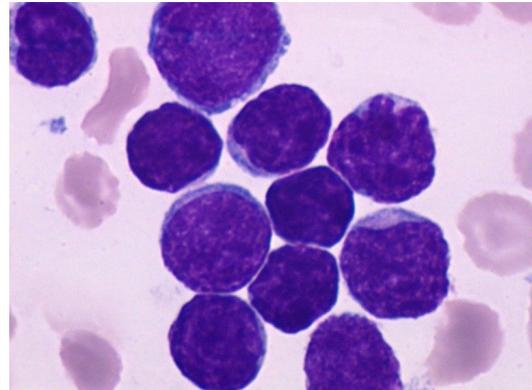


Figure 4 : Aspect morphologique des cellules blastiques de la LAL1 [52]

LAL de type L2

Les lymphoblastes ont un aspect plus hétérogène en forme et taille, avec présence de blastes de grande taille et nucléolés. Le cytoplasme est plus étendu (Figure 5).

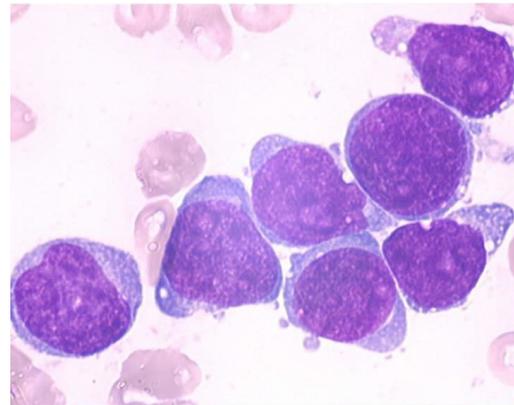


Figure 5 : Aspect morphologique des cellules blastiques de la LAL2 [52]

LAL de type L3

La leucémie aiguë lymphoblastique de type Burkitt (LAL3). On observe des cellules régulières de taille moyenne, cytoplasme très basophile, souvent criblé de vacuoles (Figure6)

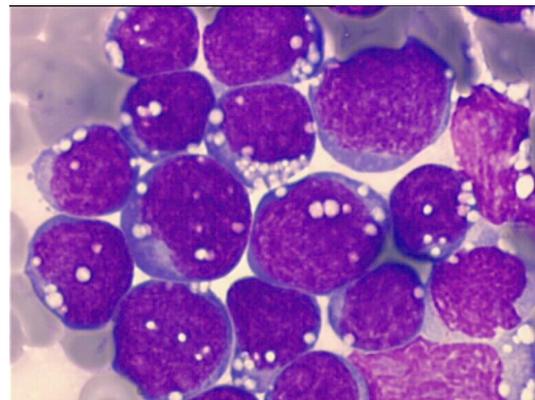


Figure 6 : Aspect morphologique des cellules blastiques de la LAL3 [52]

Cette classification morphologique des LAL est actuellement systématiquement complétée par une analyse immunocytochimique : réaction de la myéloperoxydase (MPO) qui

caractérise les cellules myéloïdes granulocytaires. Dans les LAL, la réaction de la MPO est négative [53].

7.3. L'IMMUNOPHENOTYPAGE

L'immunophénotypage est une technique de cytométrie en flux qui permet, grâce à des anticorps spécifiques, la détection de sous-types cellulaires au sein d'une population hétérogène. Cette technique est très utilisée en hématologie pour distinguer le type de leucémie ou de lymphome (Tableau IV).

L'immunophénotypage détermine la présence ou l'absence de certaines glycoprotéines à la surface de la cellule leucémique ou dans son cytoplasme. Cette technique utilise des anticorps monoclonaux spécifiques de la lignée qui prolifère (myéloïde, lymphoïde B ou T), ce qui permet de déterminer le stade de différenciation des blastes par le degré de l'infiltration médullaire et d'affecter des leucémies aiguës à une lignée donnée. Cette analyse a une valeur diagnostique et pronostique [54][55].

L'antigène CD 10 ou CALLA (« Commun Acute Lymphoblastic Leukemia ») est présent dans la plupart des LAL de l'enfant et corrélé à un bon pronostic [54].

Lignée myéloïde	MPO ; CD33 ; CD13 ; CD17 ; CD15 ; CD65
Lignée lymphoïde B	CD19 ; CD20 ; CD79a cytoplasmique et CD22
Lignée lymphoïde T	CD3 cytoplasmique et TCR à la surface (récepteur cellules T)
Marqueurs mégacaryocytaires	CD61 ; CD41 (CD42b)
Marqueurs monocytaires	CD14 ; CD11b ; CD64 ; CD36
Marqueurs précurseurs hématopoïétiques	CD34 ; HLA-DR ; TdT ; CD45 (faible)

Tableau IV : Marqueurs définissant l'appartenance à une lignée cellulaire [54]

La cytométrie de flux est également utilisée pour la mesure quantitative de la maladie résiduelle nécessaire à l'évaluation de la réponse au traitement après le 15ème jour du traitement d'induction [56]

7.4. LA CYTOGENETIQUE

L'examen cytogénétique est un élément indispensable pour le diagnostic, la classification, le pronostic des LAL et le suivi du traitement. La cytogénétique inclut le caryotype conventionnel qui examine l'ensemble des chromosomes obtenus à partir de cellules leucémiques en métaphase.

Les analyses cytogénétique dans les LAL ont révélé un grand nombre d'anomalies chromosomiques non aléatoires. Dans de nombreux cas, des études moléculaires de ces anomalies ont identifiés des gènes spécifiques impliqués dans le processus de leucémogénèse. Les aberrations chromosomiques plus courants ont été associées avec des caractéristiques cliniques et sont maintenant utilisés en tant que marqueurs diagnostiques et pronostiques pour guider le clinicien dans le choix des traitements les plus efficaces. Des aberrations chromosomiques spécifiques et leurs homologues moléculaires ont été inclus dans la classification de l'OMS de tumeurs malignes, et en corrélation avec la morphologie, l'immunophénotype et les caractéristiques cliniques sont utilisés pour définir des entités distinctes de la maladie [57]. (Voir chapitre C)

Les anomalies chromosomiques dans les leucémies :

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

Les anomalies de structure conduisent à un réarrangement au niveau de l'organisation des gènes. Dans certains cas, l'expression de ces gènes peut être modifiée.

Il existe plusieurs types d'anomalies de structure notamment les délétions (perte d'un segment chromosomiques), les inversions (deux cassures sur le même chromosome, suivies de recollement après retournement du segment intermédiaire), les duplications , les isochromosomes (chromosomes formés de deux bras identiques avec la perte de l'autre bras

du chromosome), les chromosomes an anneau (cassure des extrémités d'un chromosome suivie d'une fusion des extrémités restantes) et les translocations (cassures au niveau des chromatides de deux chromosomes non homologues suivies d'un échange segmentaire entre ces deux chromosomes donnant naissance à deux dérivés). Les translocations chromosomiques sont les anomalies de structure les plus retrouvées dans les hémopathies malignes.

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

Ces gènes donnant lieu à un avantage prolifératifs sont généralement des gènes qui contrôlent la survie et / ou la croissance cellulaire. Ainsi, les oncogènes ou proto-oncogènes ont été classiquement définis comme des gènes qui, lorsque leur expression est dérégulée ou lorsque leur structure est altérée, contribuent à l'apparition d'un phénotype malin. Actuellement, plus de 100 oncogènes différents ont été découverts et décrits dans les hémopathies malignes humaines. Ces gènes codent des protéines de fonctions très diverses. Un grand nombre code des facteurs de transcription tel que PAX5, des co-activateurs ou corépresseurs transcriptionnels comme ETV6, mais aussi des tyrosines kinases (KIT, PDGFR^α, ...), des protéines intervenant dans le contrôle du cycle cellulaire (cycline D1...) ou enfin des protéines anti-apoptotiques, comme la molécule BCL2 [57].

7.5. LA CYTOGENETIQUE MOLECULAIRE ET LA BIOLOGIE MOLECULAIRE

7.5.1 La technique FISH

Les techniques de FISH (hybridation in situ en fluorescence) ont été utilisées pour compléter le caryotype conventionnel. Ces techniques se sont développées depuis une vingtène d'années grâce à la disponibilité de sondes moléculaires marquées ou révélées par un ou plusieurs fluorochromes qui s'hybrident sur les séquences homologues dans les chromosomes (FISH sur métaphase) ou les noyaux (FISH interphasique). La détection des

signaux spécifiques se fait au microscope à fluorescence équipée de filtres spécifiques de chacun des fluorochromes employés et le plus souvent couplée à une caméra et un logiciel semi-automatique d'analyses d'images.

Trois types de sondes sont utilisés en cytogénétique hématologique : Sondes centromériques, les sondes locus spécifique ou séquence unique qui permettent de mettre en évidence des anomalies de structure cryptiques qui échappent au caryotype conventionnel et les sondes de peinture chromosomique dont l'utilisation reste réservée aux cas les plus complexes. La FISH est une analyse ciblée à la recherche d'anomalies chromosomiques spécifiques [58][59].

7.5.2 La technique CGH Array

Par la suite, la CGH ou techniques d'hybridation génomique comparative fondées sur l'hybridation simultanée d'un ADN normal de référence et d'un ADN tumoral à étudier.

La CGH est particulièrement utile dans les pathologies où l'index prolifératif est faible et où les délétions et les amplifications sont fréquentes comme les pathologies lymphoïdes chroniques, dans lesquelles, s'accumulent des lymphocytes matures [60][61].

7.5.3 La technique de PCR

Le développement en parallèle des techniques d'amplification génique par PCR (polymérase chain réaction) ont très largement modifié les pratiques, et, sans se substituer à la cytogénétique, permettent une prise en charge fiable du diagnostic et du suivi de certaines hémopathies. Il peut s'agir de PCR conventionnelle ou de PCR quantitative, appliquée soit à un ADN génomique soit à un ADN complémentaire [62].

Elle représente une aide précieuse en cas d'échec cytogénétique ou de translocation cryptique, mais son intérêt principal repose sur la sensibilité des techniques d'amplification qui vont permettre de quantifier les cellules tumorales et de suivre la maladie résiduelle avec une précision bien supérieure à ce que permettent les analyses morphologiques, chromosomiques ou la cytométrie en flux.

De façon très pratique, le recours à l'analyse moléculaire doit être systématique dans le cadre de certains protocoles thérapeutiques [63].

En conclusion, les outils de biologie moléculaire, de plus en plus performants, sont venus s'ajouter aux outils de cytogénétique et de cytogénétique moléculaire, et le recours raisonné à cet ensemble de techniques permet aujourd'hui une meilleure prise en charge des patients porteurs d'une hémopathie maligne.

8- PRONOSTIC :

Le développement de nouvelles techniques cliniques et biologiques, capables de caractériser des facteurs pronostiques et ainsi de mieux identifier les différentes catégories de leucémies aiguës lymphoblastiques, est important sur le plan stratégique pour améliorer les résultats des traitements. Les facteurs pronostiques permettent de définir des groupes de risques dans les LAL pour lesquels une approche thérapeutique stratifiée sur le risque évolutif peut être définie. L'établissement de ces groupes de risques repose sur un certain nombre de paramètres mesurés au moment du diagnostic. Les principaux paramètres sont : l'âge, le phénotype immunologique, le caryotype, le nombre de globules blancs et des caractéristiques cliniques [64].

➤ Nombre initial de globules blancs (GB)

Le nombre de GB lors du diagnostic est considéré comme l'un des plus importants facteurs pronostiques. Les enfants dont le nombre de GB est bas (inférieur à 50 000 cellules/mm³) ont un meilleur pronostic que les enfants dont le nombre de GB est plus élevé.

➤ Âge

L'âge au moment du diagnostic est un facteur pronostique important. Les enfants âgés entre 1 et 10 ans ont un meilleur pronostic que les enfants âgés de plus de 10 ans et les nourrissons de moins de 1 an.

➤ Sexe

Le sexe féminin est considéré de meilleur pronostic.

➤ **Sous-type de LAL**

Les enfants atteints d'une LAL pré-B (CD10+) ont généralement un meilleur pronostic que ceux qui sont atteints d'une leucémie à cellules T (CD10-).

➤ **Atteinte du système nerveux central (SNC)**

L'atteinte du SNC au moment du diagnostic est un facteur pronostique défavorable.

➤ **Anomalies cytogénétiques ou nombre de chromosomes**

On associe la haute hyperdiploïdie (plus de 50 chromosomes) à un bon pronostic. L'hypodiploïdie (moins de 46 chromosomes) et l'haploïdie (23 chromosomes) engendrent un pronostic plus sombre.

➤ **Translocations chromosomiques**

Les translocations chromosomiques sont le résultat d'un échange de matériel génétique entre les chromosomes. Les enfants porteurs de la t(12;21) ont un meilleur pronostic, tandis que ceux qui sont porteurs de la t(9;22), t(1;19) ou t(4;11) ont tendance à avoir un pronostic plus sombre [64].

➤ **Réaction à la chimiothérapie**

Les enfants dont la leucémie réagit rapidement au traitement (soit ceux qui parviennent à la rémission 7 à 14 jours après avoir commencé la chimiothérapie) ont un meilleur pronostic (<5% blastes médullaires à J15 de l'induction) que ceux dont la leucémie ne réagit pas rapidement (\geq 25% blastes médullaires à J15 de l'induction) ou qui ont besoin de plus d'un cycle de chimiothérapie pour parvenir à la rémission [65].

Ces facteurs sont prédictifs pour l'obtention de la rémission complète et pour la durée de cette rémission. Ces facteurs pronostiques sont néanmoins dépendants du traitement utilisé et ne peuvent donc être extrapolés d'une étude à une autre.

La plupart des essais thérapeutiques actuels tendent à regrouper les leucémies aiguës lymphoblastiques en leucémies à risque standard et leucémies à haut risque afin d'utiliser des

thérapeutiques plus conservatrices pour le premier groupe et des traitements plus agressifs pour le second, basés sur une intensification de la chimiothérapie et le recours à des greffes de moelle (allogreffe ou autogreffe) (Tableau V) [66].

Facteur pronostic	Favorable	Défavorable
Âge	≥ 1 et ≤ 9 ans	< 1 et > 10 ans
Sexe	Féminin	Masculin
Leucocytes au Diagnostic	$< 5000/\text{mm}^3$	$\geq 50000 \text{ mm}^3$
Atteinte neuroméningée	Absence	Présence
Hémogramme de j8	Pas de blastes	Persistance de blastes
Nombre de chromosomes	> 50 chromosomes	< 45 chromosomes
Cytogénétique	t(12;21)	t(9;22), t(4;11), t(1;14), t(11;19)
Biologie moléculaire	TEL-AML1	Réarrangement de MLL
Immunophénotypage	Précurseur B	LALT, LAL B mature

Tableau V: Facteurs pronostics dans les LAL de l'enfant

C- LES ANOMALIES CYTOGENETIQUES DANS LES LAL :

1- HISTORIQUE

L'organisation dense et compacte de la substance nucléaire appelée " chromatine ", a été décrite pour la première fois par Miescher en 1869, et a été nommée ainsi par Fleming en 1882 [67].

En 1890, Von Hanseman découvrit des anomalies chromosomiques dans les cancers humains et nota l'existence de mitoses multipolaires. En 1914, Boveri énonçât l'hypothèse que les anomalies chromosomiques étaient la cause même du cancer, et Winge introduisit la notion de sélection des clones cellulaires anormaux à la base de leur matériel chromosomique [68].

Un pas important a été franchi en 1956 par la description du caryotype humain normal réalisée par Tjio et Levan. Les études chromosomiques ont connue dès lors un nouvel essor, mais des problèmes techniques demeuraient non résolus. Les connaissances les plus importantes accumulées jusqu'à lors par l'étude cytogénétique des cancers concernent les hémopathies malignes et surtout les leucémies. Ceci essentiellement pour des raisons techniques [69][70].

La relation étroite entre, d'une part, le chromosome Philadelphie découvert par Nowell et Hungerford, les premiers, en 1960, et la LMC, d'autre part, a confirmé le caractère clonal de l'anomalie et fait naître l'idée que des anomalies chromosomiques spécifiques pouvaient être liées à des types particuliers d'hémopathies malignes. La recherche de tels " variants communs " n'a pas permis d'obtenir de résultats réellement probants à cause de l'insuffisance des techniques jusqu'à la mise en place des procédés de formation des bandes sur les chromosomes métaphasiques à partir de 1970. La description de la translocation t(9,22) (q34, q11) de la leucémie myéloïde chronique en 1973 : Première anomalie cytogénétique acquise et caractéristique d'un processus tumoral, marque le début de la recherche d'anomalies chromosomiques récurrentes des leucémies [70][71].

La reconnaissance du caractère non aléatoire des anomalies chromosomiques en regard du type de différenciation de l'hémopathie maligne a été acquise progressivement à partir de la fin des années 1970.

C'est ainsi qu'est née la distinction entre les anomalies dites primaires, communes à la grande majorité des proliférations d'un type cellulaire donné et considérées comme proches d'un événement causal, et des anomalies secondaires, souvent non aléatoires elles aussi, et surajoutées aux précédentes [72].

2- LES TYPES D'ANOMALIES CHROMOSOMIQUES DANS LES LAL

Plusieurs facteurs pronostiques sont utilisés dans le cadre clinique chez les patients leucémiques dans le but de classer les patients en groupes de risque. Ainsi, l'âge, le nombre de leucocytes au diagnostic, l'immunophénotype, les anomalies chromosomiques et la réponse au traitement initial (évaluée par la mesure de la maladie résiduelle) sont pris en considération lors du diagnostic et du choix de thérapie. Ils permettent de stratifier les patients en groupes de risque afin d'administrer des traitements intensifs au groupe à haut risque et de diminuer les doses chez les patients à faible risque pour éviter les effets secondaires et la toxicité.

L'examen cytogénétique demeure un des facteurs pronostiques les plus importants dans la leucémie aiguë pédiatrique. Il permet de démontrer des anomalies chromosomiques clonales décelées dans les cellules malignes dans 80% des cas de LAL [73].

Les cellules malignes contenant des anomalies chromosomiques proviennent toutes d'un même clone cellulaire. Ces anomalies chromosomiques peuvent être de nombre (perte / gain d'un chromosome) ou de structure (cassures suivies de réarrangements, d'amplifications ou de délétions). Parmi les anomalies de structure, on retrouve les translocations chromosomiques qui se définissent par le transfert d'un segment d'ADN d'un chromosome vers un autre. Elles peuvent être réciproques, impliquant deux chromosomes (échange de matériel chromosomique) et équilibrées, c'est à dire sans perte de fragment d'ADN ou déséquilibrées avec perte ou duplication de matériel [74][75].

2.1. LES ANOMALIES DE NOMBRE :

Des anomalies de nombre isolées ou associées à des anomalies de structure sont présentes dans environ 50 % des LAL. Dans les LAL de l'enfant et de l'adulte, 8 groupes de ploïdie, peuvent être définis :

➤ **Hypodiploïdie (41 à 45 chromosomes) :**

Plus de 80 % des cas ont un nombre modal à 45 chromosomes. Les chromosomes fréquemment impliqués sont les chromosomes 7, 9, 12, 17 et 20, en plus de la perte de l'un des chromosomes sexuels (l'Y essentiellement) [76][77].

➤ **Near-haploïdie (<30 chromosomes) :**

La Near-haploïdie est défini comme un nombre de chromosomes inférieur à 30 chromosomes; généralement le clone anormal possède 23 à 28 chromosomes. La majorité des chromosomes est sous forme monosomique. La perte des chromosomes dans ce groupe n'est pas aléatoire, car la disomie est conservée chez les chromosomes 6, 8, 10, 14, 18, 21, et les chromosomes sexuels [78].

En plus du clone haploïde il est courant de voir un clone diploïde normal.

C'est un groupe rare (1%) qui est associé à une rémission complète de courte durée et un mauvais pronostic [79].

➤ **Hypodiploïdies sévères / haploïdie:**

Le profil cytogénétique des hypodiploïdies sévère n'est pas aléatoire. Les chromosomes 3, 7, 13, 15 et 17 sont habituellement monosomiques et les chromosomes 1, 6, 8, 11, 18, 19, 21 et les chromosomes sexuels disomiques [77].

L'hypodiploïdie sévère/haploïdie est observée dans 3-4% des cas de LAL pédiatriques (principalement des jeunes adultes) et confère un mauvais pronostic, la survie sans événement après 8 ans étant estimée à 39% [80]. Le pronostic le plus défavorable serait associé aux caryotypes presque haploïdes, dont le nombre de chromosomes varie entre 23 et 28 [81].

➤ **Hyperdiploïdie (47 à 50 chromosomes) :**

Représente environ 15 % des caryotypes des enfants ou des adultes, associée dans 50 % des cas à des anomalies de structure, Les trisomies 8, 18, 19 et 21 sont les plus fréquentes, de répartition équivalente dans les LAL B ou T et de pronostic intermédiaire. La trisomie 8 isolée est considérée comme une anomalie récurrente rare dans les LAL T [77][82].

➤ **La haute Hyperdiploïdie à plus de 50 chromosomes (51 à 65 chromosomes) :**

Représente entre 20 et 30% des LAL chez l'enfant, avec un pic d'incidence entre 3 et 6 ans [83].

Les chromosomes trouvés à l'état trisomique, les plus fréquemment impliqués sont les chromosomes 4, 6, 10, 14, 17, 18, 21 et X ; on trouve fréquemment quatre copies du chromosome 21 [84].

La haute hyperdiploïdie caractérise les caryotypes de 51 à 65 chromosomes ou un index d'ADN supérieur ou égal à 1.16. Elle confère un pronostic favorable avec une survie à long terme de 70% à 80% [85].

Elle est plus fréquente chez les jeunes enfants présentant un nombre faible de leucocytes. La présence de certaines trisomies telles que les trisomies 4,10 et 17 serait associée à un meilleur pronostic [86][87][88].

Des translocations et d'autres anomalies chromosomiques sont présentes dans environ la moitié des cas de haute hyperdiploïdie; notamment la duplication 1q qui est l'anomalie additionnelle la plus commune, la délétion du 6q et des anomalies de structure aléatoires qui n'ont pas d'impact pronostique connu. Par contre, la présence de translocations non-aléatoire telles que les t(9,22), t(4,11), t(1,19) et t(12,21) indiquent que la translocation est probablement la principale anomalie et que l'hyperdiploïdie est probablement un événement secondaire; dans ces cas, la leucémie devrait être classé en fonction de la translocation plutôt que le groupe de ploïdie afin d'attribuer les implications pronostiques correctes [83].

➤ **Near-triploïdie (64 à 78 chromosomes) :**

Très rare chez l'enfant (<1%), mais pouvant atteindre 3 % chez l'adulte âgé, ce type d'hyperdiploïdie est caractérisé par un profil non aléatoire et correspond à une duplication d'une forme « hypodiploïdie sévère ». Les chromosomes 3, 7, 15 et 17 sont fréquemment à l'état disomique et les chromosomes 1, 6, 8, 11, 18, 19, 21 et 22 à l'état tri ou tétrasomique [89].

➤ **Near-tétraploïdie (82 à 94 chromosomes) :**

Groupe rare (1-2%) résulterait de l'endoduplication d'un clone pseudodiploïde ou hyperploïde. Plus fréquente dans les LAL de la lignée T que B [90].

➤ **Pseudodiploïdie (46 chromosomes) :**

Groupe hétérogène, plus élevé chez l'adulte que chez l'enfant (59% et 42%, respectivement) [90].

2.2. LES ANOMALIES DE STRUCTURE :

2.2.1. DANS LES LAL DE PHENOTYPE B

Les cas de LAL-B représentent 80-85 % des LAL pédiatriques [75].

Dans ce type de LAL, on retrouve :

➤ **La translocation t(9;22)(q34;q11) ou chromosome Philadelphie :**

Ce réarrangement est présent dans 2-5% des LAL pédiatriques (L1 ou L2), le plus souvent avec le phénotype des cellules B (CD10+ dans la plupart des cas, des fois CD19+ CD10-), de rares cas de LAL-T.

Le chromosome Philadelphie résulte d'une translocation réciproque entre le chromosome 9 et le chromosome 22. Il entraîne la fusion du gène *ABL (Abelson)* en 9q34 au gène *BCR (Breakpoint Cluster Region)* en 22q11 [91][92].

Le gène de fusion code pour une protéine chimérique avec une activité tyrosine kinase accrue ceci induit la prolifération, inhibe l'apoptose et provoque des anomalies d'adhésion cellulaire et plus précisément aux cellules stromales de la moelle osseuse, ce qui permet la prolifération non régulée des progéniteurs leucémiques [93].

Cette protéine (190 kD) est plus petite que celle retrouvée dans les leucémies myéloïde chronique LMC (210 kD) permettant de les distinguer [44].

Même si la t(9;22) est associé à un mauvais pronostic (taux survie après 5 ans sans événement de 28%), la transplantation de moelle osseuse de donneur apparenté compatible en première rémission a permis d'améliorer les taux de survie (Figure 7) [94][95].

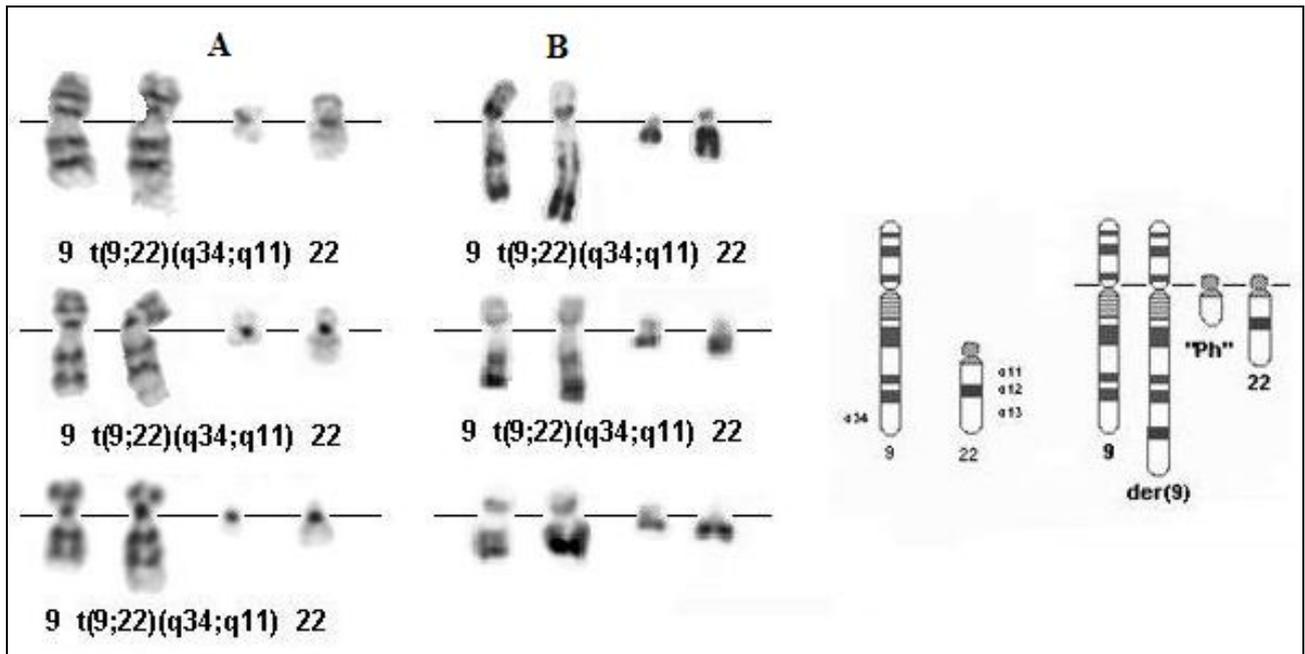


Figure 7 : Caryotype partiel montrant la translocation $t(9;22)(q34;q11.2)$.
 A : Résolution en bandes G, B : résolution en bandes R [96].

➤ **Réarrangements du gène *MLL* (*Mixed Lineage Leukemia*)**

Les réarrangements du gène *MLL* en 11q23 sont retrouvés dans 5-8% des LAL pédiatriques. Ils sont particulièrement fréquents chez le nourrisson (moins de 12 mois), représentant 80% des cas de LAL diagnostiqués chez cette catégorie d'âge [97][98] où ils confèrent un pronostic très défavorable (survie à long terme sans événement de 10-30%), indépendamment du gène partenaire de fusion [99]. Chez les enfants de plus de 12 mois, le pronostic reste défavorable mais peut varier selon le gène partenaire de fusion [100].

Ainsi, la translocation $t(4;11)(q21;q23)$, impliquant la fusion *MLL-AF4* est associée au pronostic le plus défavorable parmi les réarrangements de *MLL* alors que la fusion *MLL-ENL* de la translocation $t(11;19)(q23;p13.3)$ semble avoir un meilleur pronostic [98].

La plupart de ces réarrangements sont facilement reconnaissables par la cytogénétique conventionnelle. Cependant, dans certains cas, des réarrangements complexes, inhabituels ou cryptiques rendent l'implication du gène *MLL* difficile ou impossible à détecter par la cytogénétique classique. L'hybridation in situ par fluorescence (FISH) avec un panel de sondes couplées à la RT-PCR a été utilisée pour déterminer les réarrangements chromosomiques impliquant le gène *MLL* [101].

- **La translocation t(4;11)(q21;q23)**

La t(4;11)(q21;q23) est la translocation la plus fréquente des celles impliquant le remaniement de la bande chromosomique 11q23 (MLL). Elle représente environ 40% de ces anomalies [102].

Elle est retrouvée dans 2 à 5% des LAL généralement de type B (L1 ou L2) (CD19+ à 75%, CD10+ à 15%); peut être accompagné avec des marqueurs myéloïdes et rarement retrouvée dans les LAL-T [103].

Elle survient dans le 1/3 des LAL pédiatriques (<1 an), ce groupe d'âge est caractérisé par un mauvais pronostic et une forte incidence de translocations MLL [104].

Elle implique une organomégalie, atteinte du SNC, anémie, thrombocytopénie, 90% de blastes dans le sang et une hyperleucocytose.

Des anomalies additionnelles peuvent être retrouvées dans le 1/4 des cas au diagnostic, notamment l'évolution clonale à une hyperdiploidie sans changer le pronostic.

Les gènes impliqués sont le *AF4 (AFF1)* en 4q21 et le *MLL* en 11q23 (Figure 8).

La greffe de la moelle osseuse est fortement indiquée, vu que le pronostic est très mauvais [105][106][107].

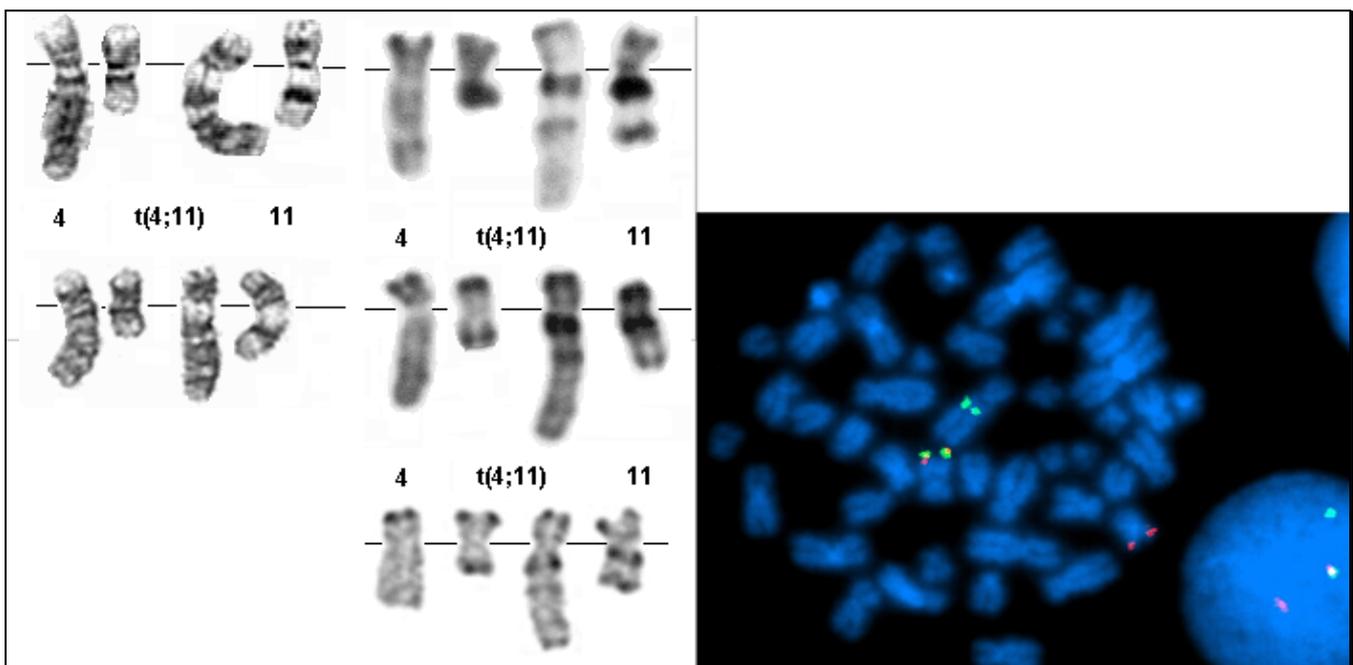


Figure 8: La t(4;11)(q21;q23) Cellule en métaphase, positive pour le réarrangement AF4/MLL détecté par la technique d'hybridation in situ en fluorescence (technique FISH à droite) [103].

- **La translocation t(11;19)(q23;p13.3)**

Le point de cassure sur le chromosome 19 est variable, il peut se produire soit à 19p13.1 ou 19p13.3 [108].

Les patients avec la t(11;19)(q23;p13.1) sont principalement des adultes avec la leucémie de la lignée myéloïde. En revanche, la t(11;19)(q23;p13.3) est retrouvée chez les nourrissons de moins de 1 an dans les LAL de type B: L1/L2 CD19+, CD10- généralement; LA biphenotypique: CD19+ également, et aussi avec des marqueurs myéloïdes; ANLL: M4/M5 principalement; des fois dans les LAL-T [108][109].

Elle implique une organomégalie et une atteinte fréquente du SNC. Les anomalies additionnelles ne sont pas retrouvées dans la plupart des cas.

Les gènes impliqués sont le gène *MLL* en 11q23 et le gène *ENL* en 19p13.

MLL / *ENL* est un gène de fusion qui définit un sous-type leucémique rare. Il représente environ 1% des cas de LAL pédiatrique (Figure 9) [110].

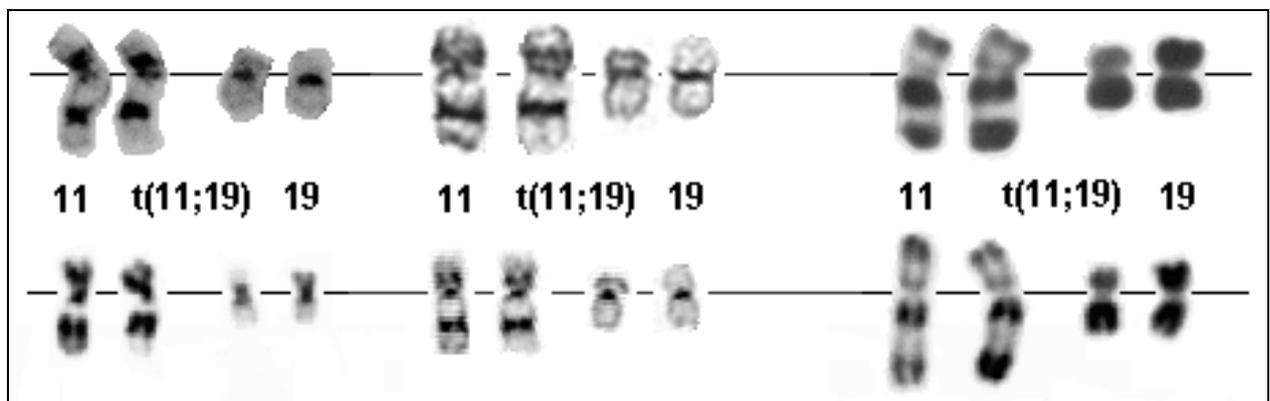


Figure 9 : La t(11;19)(q23;p13.3) [108].

- **La translocation t(1;19)(q23;p13)**

La t(1;19)(q23;p13) est retrouvée avec une fréquence quasi-identique (environ 5 %) dans les LAL de l'adulte et de l'enfant dans les formes L1 et L2 [111].

Elle implique la fusion du gène *E2A(TCF3)* en 19p13 au gène *PBX1* en 1q23. Initialement associée à un pronostic défavorable, cette translocation est de moins en moins utilisée comme facteur pronostic à cause de l'intensification des traitements actuels [112].

Le gène E2A/PBX1 produit une protéine oncogène chimérique qui transforme les cellules en activant de manière constitutive la transcription de gènes normalement régulés par le gène PBX1 [113].

Bien que cette anomalie chromosomique révèle des caractéristiques pronostiques défavorables (atteinte du SNC et une hyperleucocytose), elle est associée avec un bon pronostic avec les protocoles intensifs modernes. Le taux de survie après 5 ans sans événement est estimé à 85%; l'âge n'a pas de signification pronostique [114].

Des anomalies secondaires sont trouvées dans la moitié des cas, principalement la dup (1q), +6, del(6q), +8, i (9q), +17, i (17q), +21 [114].

Le niveau d'expression du gène E2A-PBX1 au 33ème jour durant l'induction de la rémission peut être quantifié par la PCR en temps réel et peut être utilisé pour l'évaluation du pronostic (Figure 10) [115].

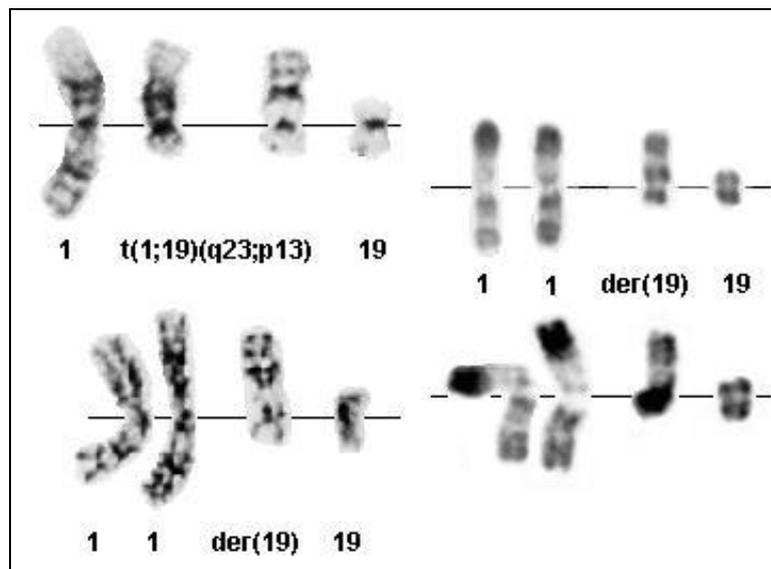


Figure 10 : La t(1;19)(q23;p13) [114].

➤ **La translocation t(12;21)(p13;q22)**

La translocation t(12;21)(p13;q22) est le réarrangement chromosomique le plus fréquent dans les LAL pédiatriques, représentant 15 à 35% des LAL de type B de l'enfant (L1 et L2, CD10+) [116]. Elle est beaucoup moins répandue dans la leucémie adulte (3%) et, à ce jour,

absente dans les autres sous-types de leucémie, aucun cas de LAL-T ou de LAM n'ont été rapportés associés à cette translocation [117].

Elle entraîne la fusion du gène *TEL* (*translocation-Ets-leukaemia*) en 12p13 à la quasi-totalité du gène *AML* en 21q22 (aussi connue par *ETV6-RUNX1*) [118][119].

Ces deux gènes sont des régulateurs critiques de l'hématopoïèse qui codent pour des facteurs de transcription. Leur fusion entraîne la formation d'une protéine chimérique dont la fonction est d'altérer la régulation normale de l'hématopoïèse, en intervenant dans la maturation et la différenciation des cellules hématopoïétiques. Il a été décrit qu'elle est associée à une élévation accrue des taux de ROS (Reactifs Oxygen Species) qui sont des molécules chimiques à très forte réactivité, capables d'oxyder les macromolécules intracellulaires, y compris les protéines, les lipides et l'ADN. [120]. L'accumulation des ROS favorise l'augmentation de l'instabilité génétique et des cassures des double-brins, permettant ainsi aux clones pré-leucémiques de se développer en cellules leucémiques entièrement transformées [121][122]

Elle est associée à un nombre faible de leucocytes lors du diagnostic [117].

La présence de cette translocation indique un pronostic favorable [123].

Étant cryptique, elle est généralement non détectable par analyse cytogénétique conventionnelle seule, son diagnostic nécessite la FISH. Elle est facilement détectable par la peinture chromosomique des chromosomes 12 et 21 ou par des sondes spécifiques au réarrangement recherché [124].

Des anomalies additionnelles peuvent se rajouter à cette translocation, notamment la del(12)(p12) sur le deuxième chromosome ou dans des cas rares la duplication du der(21)t(12;21) qui ressemble à un troisième 21. Ces anomalies secondaires n'influencent pas la valeur pronostic de cette anomalie [125].

Le dépistage de la TEL/AML-1 devrait devenir systématique au moment du diagnostic étant une variable biologique utile pour la stratification du risque dans les traitements des LAL de l'enfant (Figure 11) [126][127].

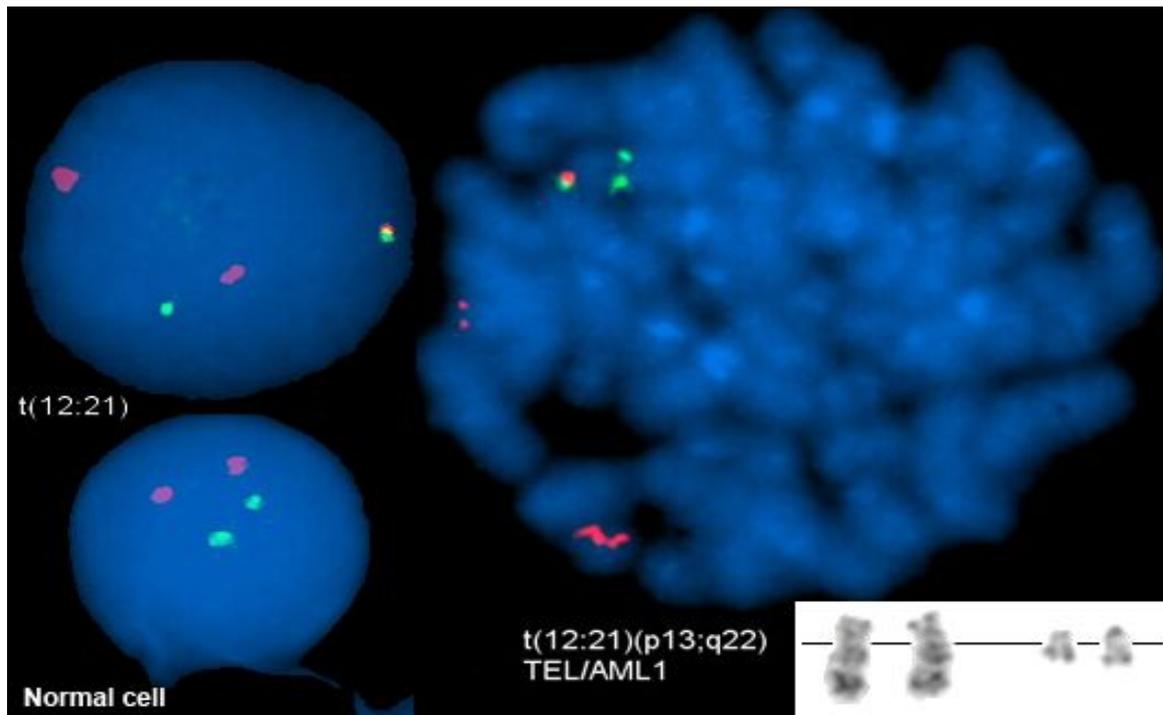


Figure 11 : La t(12;21)(p13;q22) [116]

➤ **Amplification intrachromosomique du chromosome 21**

L'amplification (c'est-à-dire la présence de 3 copies ou plus) du gène RUNX1 (*runt-related transcription factor 1*) sur le chromosome 21 est retrouvée dans 1-2% des LAL de type B de l'enfant (type L1 / L2) [128]. L'échantillon est négatif pour une fusion de ETV6 et RUNX1, mais plusieurs sites d'hybridation ont été notés pour RUNX1, ce qui a évoqué l'idée d'une amplification de ce locus.

Cette anomalie est plus fréquente chez les enfants âgés et les adolescents (moyenne d'âge d'apparition entre 6 et 14 ans) [129].

Les patients atteints présentent typiquement une faible numération de globules blancs $<20 \times 10^9/L$.

La FISH est essentielle pour la détection précise de cette anomalie. Presque tous les cas déclarés jusqu'à présent ont été identifiés à l'aide de la sonde de translocation TEL- AML1 LSI. Cependant, toute sonde FISH dirigé vers le gène RUNX1 pourrait être utilisée (Figure 12) [130].

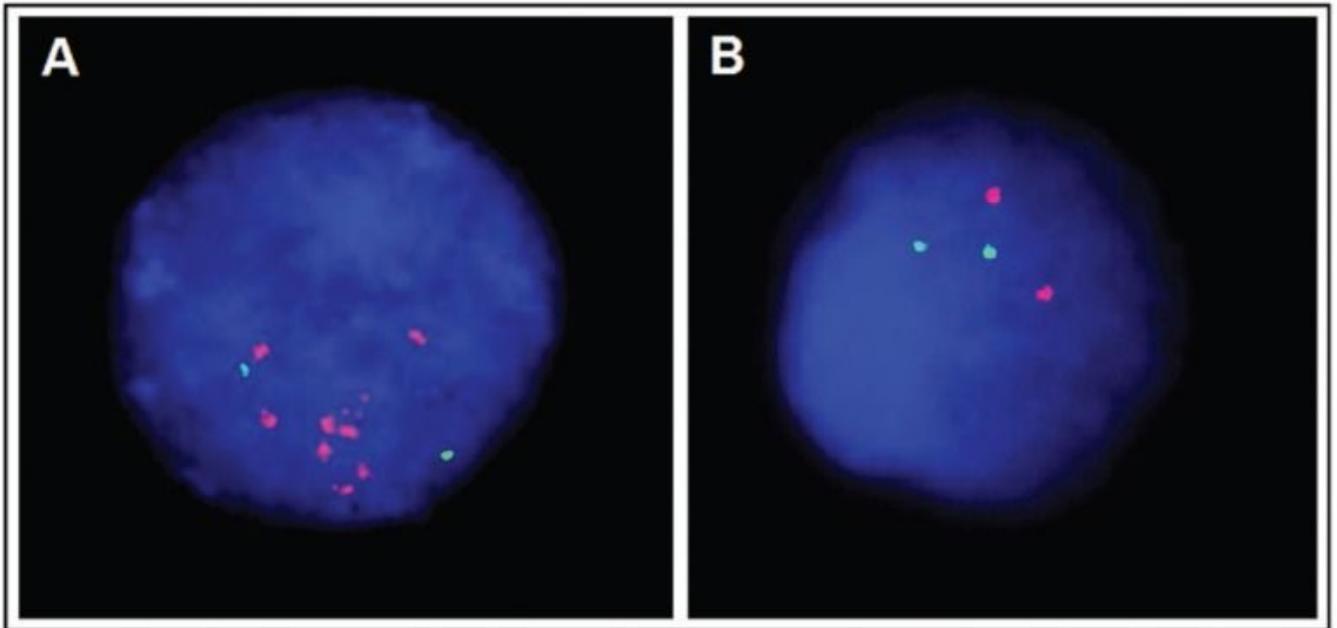


Figure 12 : La AMPi21[133].

- A) La FISH détecte 8 copies en tandem du gène RUNX1 en utilisant la sonde LSI TEL-AML1.
- B) contrôle négatif de la sonde TEL/AML1 montrant une cellule normale [130]

Le chromosome 21 dupliqué est facilement visible en utilisant la cytogénétique conventionnelle. Des études ont montré que la morphologie du chromosome 21 anormal est très variable entre les patients et que la région communément amplifiée comprend toujours le gène RUNX1 [131]. Il se présente comme un métacentrique, acrocentrique ou comme un anneau chromosomique. Le 21q dupliqué est rarement la seule anomalie chromosomique. Le caryotype est souvent complexe, même si aucune anomalie secondaire récurrente n'a encore émergé. Cette anomalie ne se produit pas avec d'autres anomalies chromosomiques primordiales dans toutes les LAL comme la $t(12;21)(p13;q22)$ / ETV6-RUNX1, $t(9;22)(q34;q11)$, $t(1;19)(q23;p13)$, etc.

Toutefois, quelques cas de haute hyperdiploïdie ont été rapportés (Figure 13) [132].

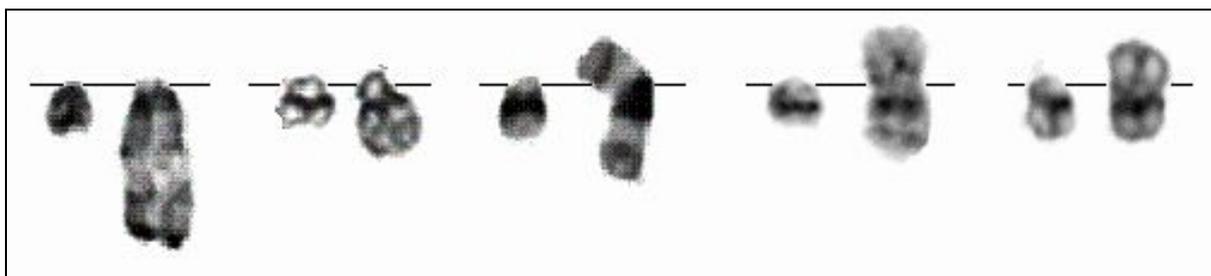


Figure 13 : Les différentes formes du chromosome 21 avec amplification du gène RUNX1.

Sur la figure, le chromosome 21 normal est à gauche [133]

Cette anomalie est associée à un pronostic plutôt défavorable avec un taux de survie à 5 ans sans événement de 29% [134].

Ainsi, sa détection précise est importante pour guider le traitement, au moins dans certains protocoles [134].

➤ **la translocation t(8;14)(q24;q32)**

la t(8;14)(q24;q32) est retrouvées dans le lymphome de Burkitt et les LAL type Burkitt correspondant aux LAL L 3 de la classification FAB [135].

Elle survient dans 2% des cas et est considérée comme un facteur de pronostic défavorable [136].

Des anomalies additionnelles sont rapportées dans 70% des cas, et en particulier: des anomalies de structure du bras long du chromosome 1 (30% des cas), des réarrangements de 13q34 (15% des cas), une t(1,13)(q23,q34) a été décrite (Figure 14) [136].

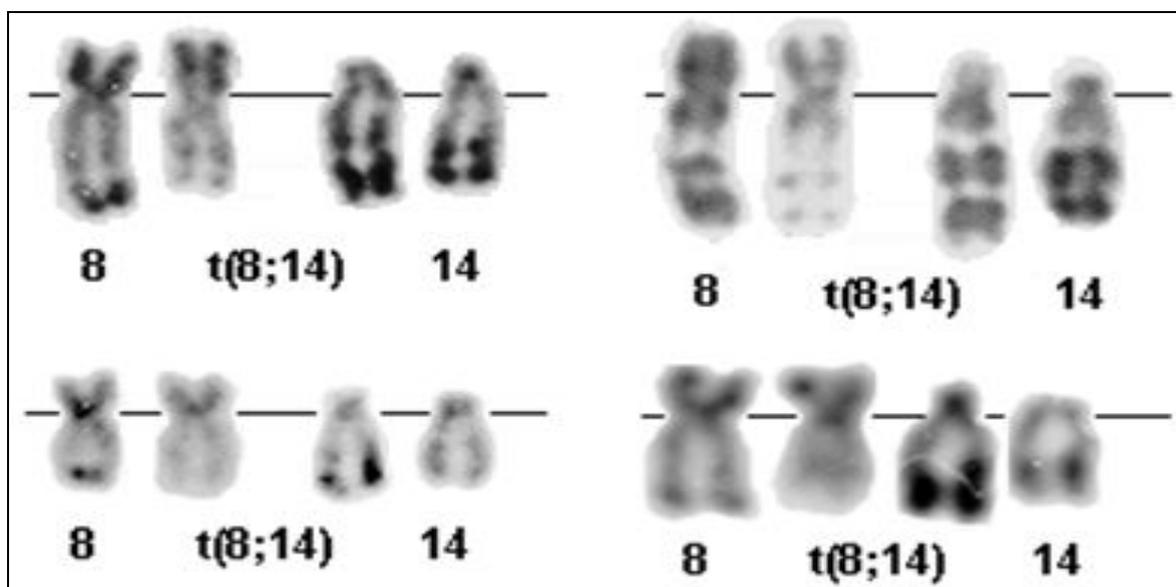


Figure 14 : La t(8;14)(q24;q32) [136]

Cette anomalie a été associée avec le syndrome de Down, bien que le mécanisme de cette association n'est pas clair [137][138].

Les formes rares variantes sont : La $t(2;8)(p13;q24)$ (Figure 15) et la $t(8;22)(q24;q11)$ (Figure 16).

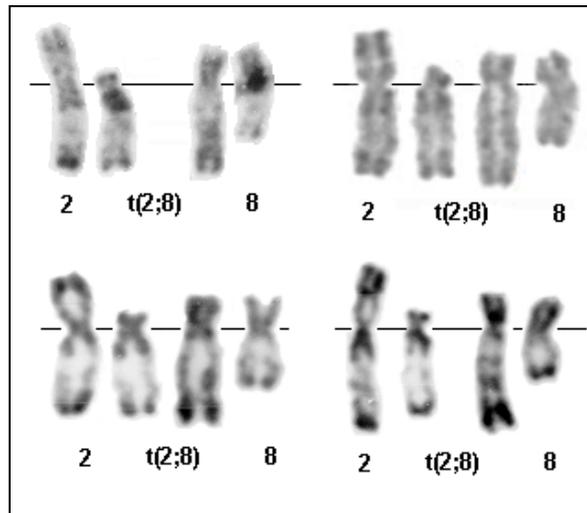


Figure 15 : La $t(2;8)(p13;q24)$ [136]

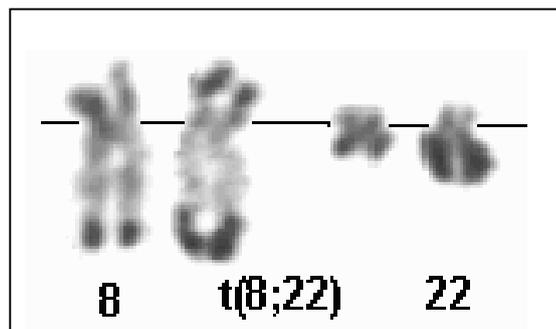


Figure 16 : La $t(8;22)(q24;q11)$ [136]

Les gènes impliqués sont le *C-MYC* en 8q24 et le *IGH*, *IGK*, *IGL* en 14q32, 2p12 et 22q11 respectivement

L'expression constitutive de la protéine de fusion induit la prolifération, même en l'absence de facteurs de croissance [136].

2.2.2. DANS LES LAL DE PHENOTYPE T

Les LAL de type T représentent 10-15% des LAL pédiatriques. Avant l'introduction de thérapies intensives, ce groupe était considéré à haut risque. Cependant, les régimes thérapeutiques intensifs ont permis d'atteindre des taux de survie sans événement à 5 ans similaires à ceux des LAL-B chez l'enfant [139]. Dans ce type de LAL, 70% des cas

présentent des anomalies chromosomiques détectables par la cytogénétique, qui diffèrent de celles qu'on trouve habituellement dans la LAL-B, alors que le reste des cas ont des caryotypes normaux [140].

Les anomalies chromosomiques les plus fréquentes ont des points de cassures non aléatoires impliquant les loci des récepteurs des cellules T (TCRs). Elles juxtaposent une région promotrice des gènes *TCRs* à des facteurs de transcriptions (FTs) dont l'expression est altérée.

En effet, les aberrations impliquant *TCRA/D* et *TCRB* en 14q11 et 7q34 respectivement sont détectées dans 35% des LAL-T [141].

À titre d'exemple :

➤ **la translocation t(11;14)(p13;q11)**

Cette translocation est la plus fréquente des anomalies impliquent les gènes des TCR. Elle constitue 5 à 10% des LAL-T de l'enfant. Elle est facilement détectée par la cytogénétique conventionnelle.

Elle entraîne la fusion du gène *RBTN2 (rhombotin-2) ou LMO2* en 11p13 avec le gène *TCRA/D et TCRB* en 14q11 et 7q34 respectivement.

La trisomie 17 est décrite comme anomalie additionnelle, en plus du chromosome Philadelphie (noté dans un seul cas de LAL-T).

La t(11,14)(p13;q11) et t(7;11)(q35;p13) sont des translocations variantes l'une de l'autre. Une délétion cryptique interstitielle du chromosome 11 : del (11) (p12p13), est trouvé chez 4% des patients atteints de LAL-T, conduit à la perte d'un domaine de régulation négative directement en amont du gène *LMO2*, entraînant sa surexpression (Figure 17) [142].

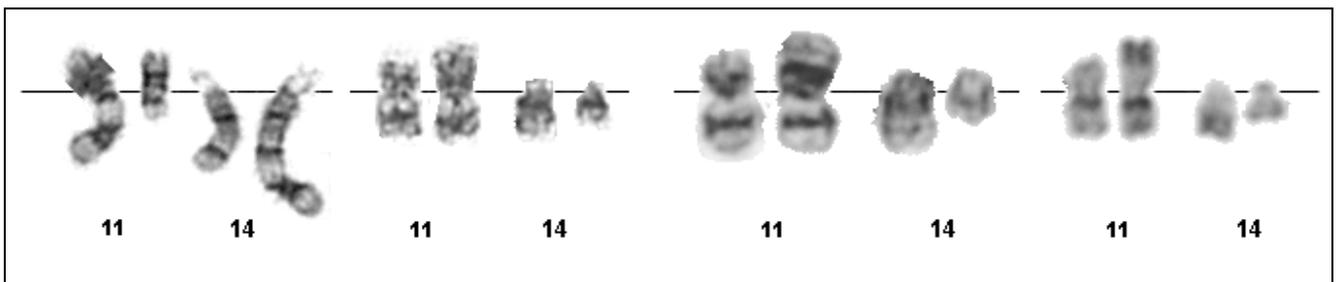


Figure 17 : La t(11;14)(p13;q11) [143]

➤ **Anomalies du 1p32**

La t(1;14)(p32;q11.2) a été observée chez 3% des patients atteints de LAL-T.

Dans cette translocation, le gène *TAL1* (*TCL / SCL*) sur 1p32 est juxtaposée à *la TRA / D* sur le chromosome 14 (Figure 18) [144].

Le gène *TAL1* est dérégulé dans d'autres translocations rares tels que t(1;7)(p32; q34) / *TRB/TAL1*, t(1;3)(p32;p21) / *TCTA-TAL1* et t(1;5)(p32;q31), mais la perturbation la plus courante de *TAL1* est la délétion interstitielle site spécifique dans lequel une région de codage *TAL1* est juxtaposée à la région de promoteur *SIL* (*STIL*) pour générer la fusion *SIL-TAL1* [145].

La délétion, qui se produit dans 30% des patients atteints de LAL-T, est détecté par PCR ou FISH mais pas par le caryotype conventionnel.

Environ 60% des patients atteints de LAL-T expriment l'altération du gène *TAL1*, faisant d'elle une des lésions génétiques les plus communs associés à la lignée T de LAL.

Le fait que le réarrangement *TAL1* est un facteur pronostique reste controversée [146][147].

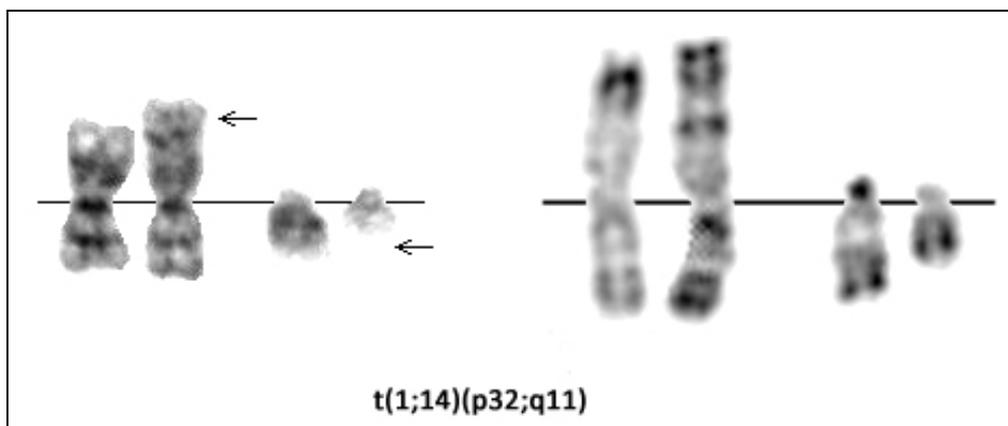


Figure 18 : La t(1;14)(p32;q11) [148]

➤ **la translocation t(10;14)(q24;q11)**

La t(10;14)(q24;q11) représente 5 à 10% des LAL-T [149].

La juxtaposition du gène *TLX1 (HOX11)* situé à 10q24 au locus des récepteurs des cellules T alpha/delta *TRA/D* en 14q11.2, cause sa surexpression. En comparaison à d'autres patients atteints de LAL-T, ceux qui ont cette translocation ne semblent pas avoir une hyperleucocytose.

Cette translocation et sa variante t(7;10)(q36;q24) sont facilement détectables par le caryotype conventionnel [150].

Plusieurs études ont suggéré que la présence de la translocation t(10;14) ou la surexpression de TELX1 est associée à un pronostic amélioré [151].

Des anomalies additionnelles de nombre ou de structures peuvent être retrouvées impliquant différents chromosomes, parfois complexe (Figure 19) [152].

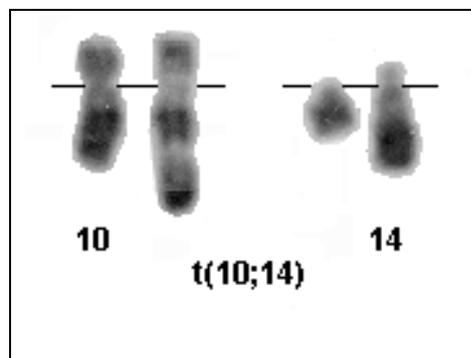


Figure 19 : La t(10;14)(q24;q11) [149]

➤ **la translocation t(5;14)(q35;q32)**

La translocation cryptique t(5;14)(q35;q32) est une anomalie fréquente dans les LAL-T pédiatriques, elle est présente dans 20% des cas (CD1a+,CD10+) et entraîne la surexpression du gène facteur de transcription *TLX3 (HOX11L2)* [153].

Cette translocation est détectée seulement avec des techniques de FISH, le caryotype conventionnel paraît normal.

Plusieurs sondes peuvent être utilisées: peinture chromosomique, combinaison de sondes de peinture et YAC, multicolore-FISH avec des sondes adéquates (Figure 20) [154].

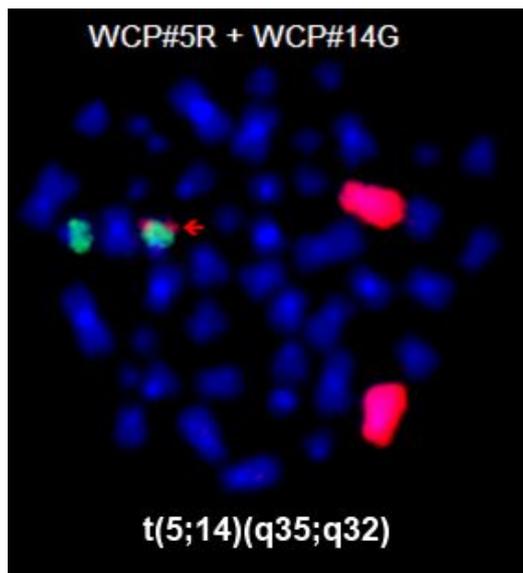


Figure 20 : Image de FISH de la t(5;14)(q35;q32)[154]

La conséquence de la translocation est l'expression ectopique de la *HOX11L2*, un gène situé à 5q35, il n'est pas normalement exprimé dans les LAL sans réarrangement le 5q. La «dérégulation» de l'expression du HOX11L2 est considérée comme le résultat d'un contrôle anormal du gène par le *CTPI2*, un gène fortement exprimé lors de la différenciation lymphoïde T, situé à 14q32, comme une conséquence du réarrangement chromosomique [155]. Le point de cassure du chromosome 5 est généralement situé dans le locus d'un autre gène, *RanBP17*, souvent perturbé par le réarrangement chromosomique. Le point de cassure sur le chromosome 5 est par conséquent éloigné du gène anormalement exprimé (HOX11L2) [156].

Cette anomalie est associée à un pronostic défavorable [157].

2.2.3. LES ANOMALIES DE STRUCTURE NON SPECIFIQUES D'UN PHENOTYPE B OU T

Il s'agit le plus souvent d'anomalies secondaires à des types de délétions partielles du bras long du 6 (6q-), du bras court du 9 (9p-) ou du 12 (12p-) (Figure 21).

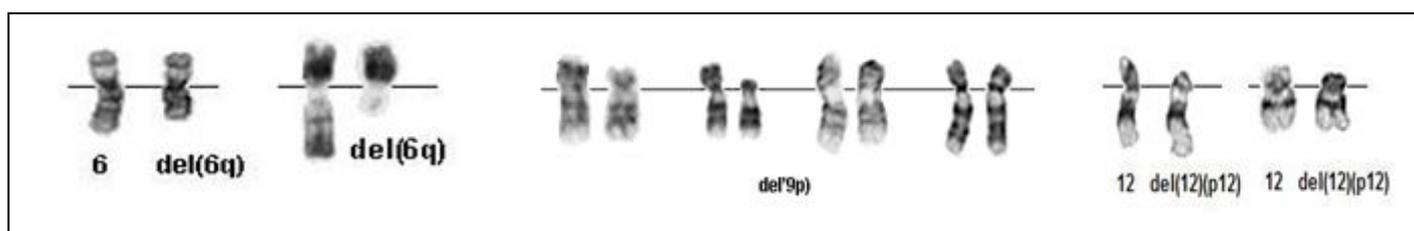


Figure 21 : Délétion du 6q-, du 9p- et du 12p- (de gauche à droite)

➤ **Tableau récapitulatif des anomalies chromosomiques étudiées (Tableau VI)**

Anomalie chromosomique	Gènes impliqués	Type de LAL	Incidence chez l'enfant	Pronostic
t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL	LAL-B (L1 ou L2)	2-5%	Défavorable
t(4;11)(q21;q23)	AF4(AFF1) - MLL	LAL-B (L1 ou L2)	2-5%	Défavorable
t(11;19)(q23;p13.3)	MLL - ENL	LAL-B (L1 ou L2) +Biphénotypique	1%	Défavorable
t(1;19)(q23;p13)	E2A(TCF3) - PBX1	LAL-B (L1 ou L2)	5 %	Intermédiaire
t(12;21)(p13;q22)	TEL(ETV6)- AML(RUNX1)	LAL-B (L1 ou L2)	15 - 35%	Favorable
Amplification intrachromosomique du chromosome 21	RUNX1	LAL-B (L1 ou L2)	1-2%	Défavorable
t(8;14)(q24;q32)	C-MYC - IGH	LAL 3 Type Burkitt	2%	Défavorable
t(11;14)(p13;q11) t(7;11)(q35;p13)	RBTN2 (LMO2) - TRA/D RBTN2 (LMO2) - TRB	LAL-T	5 à 10%	Défavorable
t(1;14)(p32;q11.2)	TAL1 (TCL/SCL) - TRA/D	LAL-T	3%	Défavorable
t(10;14)(q24;q11)	TLX1 (HOX11) - TRA/D	LAL-T	5 to 10%	Défavorable
t(5;14)(q35;q32)	HOX11L2 - CTPI2	LAL-T	20%	Défavorable
Haute Hyperdiploïdie 51 à 65 chromosomes	-	LAL	20 et 30%	Favorable
Hypodiploïdie sévère	-	LAL	3-4%	Défavorable
Hyperdiploïdie 47 à 50 chromosomes	-	LAL B et T	15 %	Intermédiaire

Tableau VI : Liste des anomalies chromosomiques rapportées [75][96][150]

3- L'INTERET DE L'ANALYSE CYTOGENETIQUE

3.1. INTERET DANS LA RECHERCHE FONDAMENTALE DE LA LEUCEMOGENESE

L'impact de la cytogénétique est très important dans la recherche de base des tumeurs hématologiques.

L'identification des points de cassures chromosomiques impliqués dans les aberrations chromosomiques spécifiques est très importante dans l'étude de la leucémogénèse, car elle permet l'indication de la position des gènes à la suite des réarrangements chromosomiques. Ainsi, l'analyse cytogénétique est souvent la première étape vers l'identification des gènes associés à la leucémie, et doit être suivie par des approches de gènes candidats, ou des stratégies de clonage positionnel. Cette connaissance scientifique est utilisée dans le diagnostic et le suivi des patients. La recherche fondamentale des réarrangements récurrents prévoit en outre des indices fascinants sur les événements moléculaires qui sous-tendent la leucémogénèse. Le clonage et l'analyse fonctionnelle des gènes dont la structure ou l'expression est modifiée à la suite de réarrangements chromosomiques donnent des idées sans précédent sur les mécanismes de la transformation néoplasique et la fonction cellulaire normale et leur développement.

3.2. INTERET CLINIQUE DANS LE DIAGNOSTIC, LE PRONOSTIC ET LE TRAITEMENT DES LAL

3.2.1. Au niveau du diagnostic :

Les anomalies chromosomiques observées dans l'analyse cytogénétique conventionnelle représentent un critère majeur du classement des leucémies. Certaines anomalies cytogénétiques sont associées à un sous-type spécifique de LAL et peuvent donc être utilisés pour confirmer le diagnostic. Par exemple, la $t(12;21)(p13;q22)$ et la $t(4;11)(q21;q23)$, confirment le diagnostic de LAL de **type B** [116][102], tandis que la $t(10;14)(p13;q11)$ et la $t(5;14)(q35;q32)$ sont plutôt retrouvées dans les LAL de **type T** qui sont caractérisées par des réarrangements de gènes récepteurs des cellules T [158].

Cependant, les techniques de FISH et de biologie moléculaire sont parfois indispensables lorsqu'il s'agit d'anomalies chromosomiques cryptiques, comme dans le cas de la $t(5;14)(q35;q32)$ et la $t(12;21)(p13;q22)$ [106].

3.2.2. Pronostic et traitement :

Les anomalies chromosomiques récurrentes jouent un rôle critique dans la pathogenèse de la leucémie aiguë, et de nombreuses translocations ont une grande signification pronostique. Certes, de nombreux sous-types leucémiques sont associés à des changements cytogénétiques spécifiques. Comme un nombre croissant de patients atteints de leucémie font l'objet d'une analyse cytogénétique, il est devenu évident que les anomalies chromosomiques sont des indicateurs diagnostiques et pronostiques.

Ces informations sont de plus en plus utilisées pour la stratification des patients pour une thérapie plus ciblée et plus efficace. Les schémas thérapeutiques intensifs sont retenus chez les patients avec un bon pronostic, une chimiothérapie moins agressive est indiquée, alors que les patients avec un mauvais pronostic peuvent être traités de manière plus intensive, par exemple avec la transplantation de moelle osseuse [105][159].

Dans le cas des leucémies aiguës lymphoblastiques pédiatriques de type B (LAL-B), la fusion TEL/AML1 résultante de la t(12;21)(p13;q22) et l'hyperdiploïdie sont associés à un pronostic favorable [123], tandis que l'hypodiploïdie, les formes associées à un chromosome Philadelphie, et les réarrangement impliquant le gène MLL (11q23) sont associées à un mauvais pronostic avec une potentialité de rechute élevée et un espoir de curabilité faible [76][131].

Les patients atteints de LAL-B avec la t(1;19)(q23;p13) / E2A-PBX1 ont d'abord été classés dans la catégorie à haut risque d'échec thérapeutique. L'application de combinaisons plus agressives de la chimiothérapie a entraîné des taux de guérison à long terme comparables à ceux des enfants atteints de LAL à risque standard. Cette thérapie a conduit à une amélioration du pronostic de ces patients avec une survie globale de plus de 85%.

Pour certaines translocations, les conséquences fonctionnelles sont bien comprises permettant de d'utiliser les approches thérapeutiques ciblés et pertinentes lorsque ce réarrangement particulier se trouve chez un patient [160].

D- ASPECT THERAPEUTIQUE

Les protocoles thérapeutiques modernes ont révolutionné le pronostic des leucémies en général et plus particulièrement celui de la LAL de l'enfant.

Des progrès énormes ont été acquis durant les deux dernières décennies dans le traitement des LAL pédiatriques (Figure 1). Aujourd'hui, les taux de survie dépassent les 80%. En effet, dans les données rapportées par le programme SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results*) du « *National Cancer Institute* » et celles du « *National Journal of Oncology* », le taux de survie est passé de **83.7%** en 1990-1994 à **87.7%** en 1995-1999 et à **90.4%** en 2000-2005 (Figure 22). [161][162]

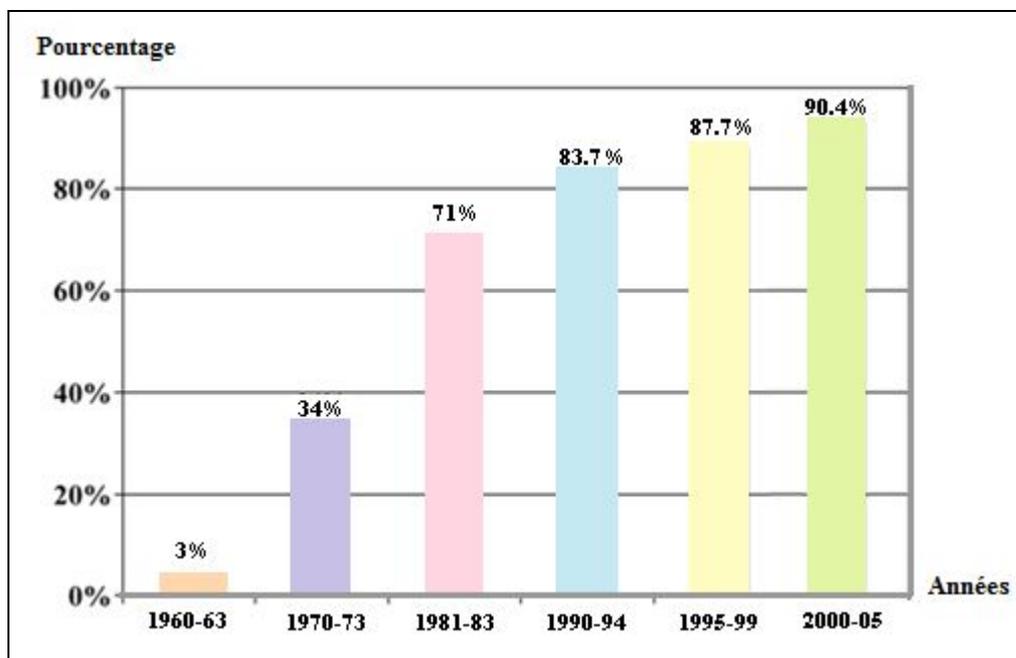


Figure 22 : Amélioration de la survie des enfants atteints de leucémie lymphoblastique aiguë entre les années 1960 et 2005 [161]

La prise en charge classique comporte : un traitement symptomatique et un traitement de fond.

1. LE TRAITEMENT SYMPTOMATIQUE :

Le traitement symptomatique revêt une grande importance et en particulier durant la phase initiale. Il consiste à pallier aux syndromes d'insuffisance médullaire en s'attaquant à la pancytopenie par des transfusions, ainsi qu'aux complications infectieuses par une antibiothérapie appropriée. Ces patients doivent être pris en charge dans des unités

spécialisées en oncologie pédiatrique avec possibilité d'admission dans une unité de soins intensifs.

2. LE TRAITEMENT DE FOND :

Qui est basé sur une polychimiothérapie lourde dont la nature et le protocole dépendent de l'identification précise de la maladie et de ses facteurs pronostiques. Les drogues utilisées dites cytostatiques se répartissent entre antimétaboliques directs (6-mercaptopurine, méthotrexate, cytosine arabinoside) et indirects (asparaginase), alkylants (cyclophosphamide), antibiotiques (rubidomycine, adriamycine), poisons du fuseau (alcaloïdes de la pervenche, vincristine, vinblastine), hormonaux (prednisone). Tous les médicaments utilisés sont toxiques (à part la prednisone et dans une moindre mesure la vincristine, sont aplasants).

2.1 Traitement d'induction

La première phase du traitement est l'induction. Le but de l'induction de la LAL est de détruire toutes les cellules leucémiques présentes dans le sang, la moelle osseuse et le liquide céphalorachidien et de parvenir à la rémission. L'induction comporte habituellement un traitement intensif qui peut durer de 4 à 6 semaines. On fait une ponction de la moelle osseuse à la fin de cette phase. Lorsqu'il n'y a plus de signes cytologiques, cliniques et génétiques de leucémie, on dit que l'enfant est en rémission.

L'induction fait appel aux corticoïdes (prednisone ou dexaméthasone), la vincristine, la L-Asparaginase et selon les cas une anthracycline (Daunorubicine ou doxorubicine) et dure 4 à 6 semaines. L'évaluation de la réponse au traitement durant cette phase revêt une grande importance pour la suite du traitement et obéit à des critères précis (Tableau III). La réponse à une semaine de corticothérapie seule, à la chimiothérapie d'induction par myélogramme ou mieux par une étude de la maladie résiduelle sont utilisés pour compléter l'évaluation du pronostic. Dans 98% des cas une rémission complète est obtenue lors de cette phase du traitement [163].

2.2 Traitement de consolidation

La consolidation est la deuxième phase du traitement. Elle dure de 4 à 6 semaines. Le but de la consolidation de la LAL est de traiter toutes les cellules leucémiques encore présentes dans le sang et la moelle osseuse une fois qu'on est parvenu à une rémission complète.

La chimiothérapie de consolidation comprend des médicaments différents de ceux qu'on utilise lors de la phase d'induction.

Elle fait appel à des doses de glucocorticoïdes (prednisone, prednisolone, ou dexaméthasone), vincristine, et au moins un autre agent (d'habitude l'asparaginase, l'anthracycline, ou tous les deux) [164].

2.2.1 Traitement d'intensification différée

L'intensification différée est constituée de cycles répétitifs de chimiothérapie. La chimiothérapie est souvent plus agressive lors de cette phase. Les agents chimiothérapeutiques employés peuvent être les mêmes que ceux qu'on a administrés lors des phases d'induction et de consolidation. L'intensification différée aide à prévenir la réapparition de la leucémie. L'horaire exact d'administration des doses et les médicaments spécifiquement employés peuvent être différents pour chaque enfant.

Une intensification tardive à 12-24 semaines de traitement s'est toujours montrée bénéfique pour tous les groupes de risques.

2.2.2 Traitement d'entretien

La dernière phase du traitement est l'entretien. Une fois que les 3 premières phases ont réduit le nombre de cellules leucémiques, on commence la chimiothérapie d'entretien. L'entretien dure de 2 à 3 ans. En général, la phase d'entretien est plus longue chez les garçons (3 ans) que chez les filles (2 ans) puisqu'il est possible que des cellules leucémiques se soient propagées aux testicules. L'entretien est beaucoup moins intensif que les autres phases. Elle comporte surtout la prise quotidienne à la maison d'un médicament par voie orale. On administre également de façon intermittente une chimiothérapie intraveineuse et intrathécale lors de cette phase. Les enfants peuvent habituellement prendre part à leurs activités quotidiennes normales dès qu'ils s'en sentent capables et la plupart retournent à l'école [165].

2.2.3 Traitement du système nerveux central (SNC)

La prophylaxie méningée est systématique à toutes les phases du traitement.

En effet, le système nerveux central est considéré comme un sanctuaire pour les cellules blastiques du fait de la barrière physiologique hémato-méningée limitant la pénétration des

antimitotiques donnée par voie générale. Cette prophylaxie associe le méthotrexate, la cytarabine et l'hydrocortisone par voie intrathécale et dans les formes à haut risque, le méthotrexate à hautes doses [166].

Historiquement, elle reposait sur une irradiation encéphalique à 18 Gy, cette irradiation n'est plus utilisée que dans les traitements curatifs d'atteintes méningées ou dans les formes à haut risque de localisation méningée, elle a été abandonnée dans la majorité des protocoles du fait des séquelles neurocognitives tardives et du risque de cancer secondaire [167].

Par ailleurs, c'est l'utilisation d'une chimio intrathécale par Métotrèxate ou, dans les groupes à risque, d'une trithérapie par Méthotrèxate, Aracytine et corticoïdes intrathécale qui est réalisée durant le traitement d'induction [168].

2.2.4 Transplantation allogénique de moelle osseuse

La greffe allogénique des cellules de moelle osseuse, à partir d'un donneur HLA (human leukocyte antigen) identique familial ou non apparenté, est un traitement standard pour les patients leucémiques à haut risque. Elle est alors réalisée en première rémission complète. La greffe est aussi utilisée comme traitement de rattrapage chez des patients réfractaires au traitement d'induction ou chez des patients à bas risque en deuxième rémission après une rechute [169].

Dans les formes à haut risque avec une mauvaise réponse initiale, l'allogreffe des cellules souches hématopoïétiques est préconisée. Par ailleurs, chez les patients présentant une translocation t(9;22), le traitement par Imatinib, inhibiteur de tyrosine kinase BCR/ABL est recommandé.

Celle-ci est associée à une meilleure survie que la chimiothérapie standard [170]. La survie, selon que le donneur soit compatible apparenté ou non-apparenté, est similaire [171].

L'imatinib mesylate, auparavant connu sous le nom de STI571 est un inhibiteur de la protéine kinase BCR-ABL1 résultant de la translocation (9;22).

Par conséquent, une meilleure survie semble être obtenue par administration d'imatinib avant ou après la transplantation de moelle osseuse allogénique (Tableau VII) [172][173].

Réponse au traitement	Méthode d'évaluation
Bonne réponse à la corticothérapie	Moins de 1000 blastes /mm ³ sur la numération/formule sanguine à J8 du traitement par prédnisone.
Rémission complète	Disparition de tous les signes cliniques et biologiques de la maladie (hémogramme normal et moins de 5% de blastes
Rémission incomplète	Persistance d'une infiltration médullaire par des blastes
Echec	Persistance de plus de 25% de blastes au myélogramme
Maladie résiduelle (MRD)	Introduction de méthodes très sensibles de détection des cellules leucémiques ; cytogénétiques, immunologiques et moléculaires. Le seuil de détection est de 5% par morphologie, 2% par cytogénétique, 1/1000 par FISH, 1/100000 par cytométrie en flux et 1/10000 par PCR.

Tableau VII : Evaluation de la réponse au traitement

Cependant, malgré les énormes progrès dans le traitement des leucémies pédiatriques aiguës, le taux de rechute dans le cas des LAL est de 15-20%. Le problème majeur dans le traitement des leucémies pédiatriques est la mortalité liée à la toxicité des traitements et les effets secondaires à long terme dus aux fortes doses des traitements. L'identification de nouveaux facteurs pronostiques et de nouvelles stratégies thérapeutiques sont nécessaires, afin d'améliorer les taux de survie et réduire la toxicité. Une meilleure compréhension des processus biologiques de la maladie contribuera aussi au progrès dans le traitement en identifiant de nouvelles cibles thérapeutiques [174][175].

CHAPITRE II :
MATERIELS ET
METHODES

APPROCHE EXPÉRIMENTALE

Nous avons réalisé une analyse rétrospective de 155 patients adressés par l'hôpital d'enfant de Rabat (service d'hématologie et d'oncologie pédiatrique SHOP) au laboratoire d'analyses médicales et de cytogénétique BIOLAB sur une période de 4 ans (2012-2016). Ce qui a permis d'établir un profil épidémiologique de LAL de l'enfant au Maroc et de mettre en évidence les différents réarrangements chromosomiques retrouvés dans ce type d'hémopathie. Il s'agit pour tous les patients d'une étude cytogénétique standard afin de détecter des anomalies chromosomiques par analyse du caryotype conventionnel.

Le caryotype a été réalisé pour les patients atteints de LAL au diagnostic, pour lesquels une étude cytologique quantitative et qualitative a été effectuée à travers la réalisation de l'hémogramme, du frottis sanguin et médullaire, le myélogramme et l'immunophénotypage. Par la suite, un panel de sondes pour la technique FISH a été établi et appliqué pour certains patients selon les recommandations des sociétés savantes en hématologie. L'analyse combinée du caryotype et de la FISH a permis de mettre en évidence des réarrangements récurrents rapportés dans la littérature.

La technique de cytogénétique conventionnelle a été pratiquée au niveau du laboratoire BIOLAB. Elle a permis d'obtenir les caryotypes, l'identification des chromosomes et la détection d'aberrations chromosomiques clonales de nombre et de structure, à un seuil de résolution minimal de 5 millions paires de bases.

Le caryotype a été considéré contributif chez les patients ayant un minimum de 20 mitoses analysables. Les critères utilisés pour décrire les caryotypes ont été ceux du Système International de Nomenclature en Cytogénétique humaine (ISCN) 2009 - 2013.

La méthodologie de travail ainsi que les critères d'inclusion des patients dans cette étude ont été vus et validés par le comité d'éthique pour la recherche biomédicale – Université Mohammed V – Faculté de Médecine et de Pharmacie – Rabat. Dossier N° 39/18.

1. PATIENTS

1.1 Provenance

Les patients inclus dans cette étude sont ceux appartenant au groupe des LAL des enfants (de 1 à 17 ans) hospitalisés dans le service d'oncologie de l'hôpital d'enfant de Rabat et adressés

au laboratoire BIOLAB pour caryotype onco-hématologique. L'analyse cytogénétique de l'ensemble des patients inclus dans notre étude a été prise en charge gracieusement par l'association St-Jude.

1.2 Critères d'études

- Critères d'inclusion

Les patients inclus dans cette étude sont ceux appartenant au groupe des LAL au diagnostic, âgés de moins de 17 ans, des deux sexes.

- Critères d'exclusion: Sont éliminés du protocole:

- les sujets atteints d'une leucémie chronique, leucémie aigue myéloblastique et autres hémopathies malignes en dehors des LAL.

- les patients sous chimiothérapie préalable.

- enfants âgés de plus de 17 ans.

2. Prélèvement pour l'étude cytogénétique :

Les prélèvements destinés pour le caryotype hématologique sont effectués selon une procédure précisant les conditions pré analytiques à savoir : le prélèvement de moelle en milieu hospitalier, le recueil stérile et le conditionnement des échantillons.

Un accord préalable doit être passé entre le biologiste du laboratoire BIOLAB et le médecin oncologue pour décider du moment du prélèvement, s'enquérir d'éventuelles prises médicamenteuses et d'analyses faites au préalable afin d'optimiser les conditions de travail, assurer un meilleur rendu du résultat et minimiser les échecs.

- 1 à 2 ml de moelle seront prélevés stérilement sur tube hépariné (l'héparinate de lithium est l'anticoagulant exigé).

- A l'arrivée au laboratoire, on doit vérifier l'aspect de l'échantillon, quantitativement et qualitativement (prélèvement hémolysé, aspect laqué, dilué, présence de caillots, volume insuffisant...).

Le prélèvement doit être conservé à +4°C pour une durée maximale de 24h à 48h pour une éventuelle remise en culture en fonction du type de LAL (après résultat de l'immunophénotypage).

N.B : Dans de rares cas, le caryotype hématologique peut également être effectué sur sang périphérique si le prélèvement de moelle est impossible et que le nombre de blastes au niveau du sang périphérique le permet (supérieur à 20%). Cependant, le prélèvement de moelle est toujours privilégié.

3. Matériel et réactifs :

3.1 Matériel :

- Hotte à flux laminaire vertical avec panneau de commande et de visualisation des heures d'exploitation, de la vitesse de l'air circulant et du mode de désinfection par les UVs.
- Hotte chimique avec filtres carbone.
- Incubateur pour culture cellulaire (étuve) avec une pression de CO₂ modulable.
- Microscope optique inversé.
- Microscope optique équipé d'un système d'acquisition d'image, relié à un ordinateur muni d'un système de traitement d'image, avec capture semi automatisée.
- Dispositif pour l'aspiration sous vide.
- Bain marie thermostaté à 100° C. Capacité de 7 litres, précision de lecture et d'affichage de 0.1°C.
- Réfrigérateurs à 4°C, un congélateur à – 20° C médicaux avec affichage LED stable et contrôle HACCP avancé de la température d'exercice et de l'enregistrement des anomalies éventuelles dues à des coupures secteur ou à des élévations de la température
- Centrifugeuse à grande vitesse.
- Cellule de Malassez.
- Vortex
- Plaque chauffante / Agitateur caractérisé par une excellente résistance à la chaleur, un corps en aluminium anticorrosif et un contrôle de vitesse précis de 60 à 1500 tours par minute
- Thermo-Hygromètre.
- Bac en porcelaine pour la dénaturation
- Bac pour coloration au GIEMSA
- Portoir pour les tubes de prélèvements.
- Portoir pour les tubes de culture.
- Plateau en inox.

3.2 Consommables :

- Flasks stérile de 25 cm² pour culture cellulaire.
- Tubes de 15 ml en polypropylène à bouchons bleus, à fond conique stériles ;
- Micropipettes de 1000 et 100 µl (réglable).
- Cônes stériles jaunes et bleus en plastique (sinon les autoclaver).
- Liquipettes de 3 ml en plastique
- Pipettes stériles de 10 ml
- Distributeur électrique
- Pipettes Pasteur en verre (15 cm) pour l'étalement.
- Lames en verre lavées et dégraissées avec plage dépolie
- Lamelles de 60*24 mm.

3.3 Réactifs :

- Solution de lyse des globules rouges : LYSE S III DIFF
- RPMI 1640 sans bicarbonate, sans L-Glutamine.
- Péni-Streptomycine 10,000 UI/ml
- L-Glutamine (200 mM).
- Sérum de vœu fœtal.
- Colchicine à 20 mg / l.
- Kcl (chlorure de potassium) à 0.075M
- Tampon phosphate : sodium di-Hydrogen Phosphate 1-hydrate (Na₂HPO₄.H₂O).
M=137,90
- Colorant de Giemsa R liquide.
- Tampon pH=7 pour hématologie (5-chloro-2-methyl-2H-isothiasol-3-one/2-methyl-2H-isothiasol-3-one)
- Méthanol CH₃OH. M=32.04 g/mol
- Acide acétique C₂H₄O₂. M=60.05 g/mol
- Huile à immersion pour l'examen de préparations microscopiques. Indice de réfraction :
1,513 ± 0,005 à 25°C. Viscosité : 1000 mPa/s à 25°C.
- Produit de désinfection : Anios en Amphospray.
- Ou Alcool à 70%.
- Baume d'inclusion Eukitt. Indice de réfraction : 1,492. Point éclair : +27°C

4. Mode opératoire: Techniques autres que la cytogénétique

4.1 Hémogramme :

L'hémogramme est un examen automatisé qui informe sur la numération érythrocytaire (RBC: Red Blood Count), leucocytaire globale (WBC: White Blood Count), plaquettaire (PLT) et la formule leucocytaire qui indique la représentativité de chaque lignée. Il permet de préciser le degré d'envahissement du sang par des cellules médullaires immatures : blastémie et myélémie.

L'hémogramme donne d'autres indications permettant de définir un globule rouge par : son volume (MCV : Volume globulaire moyen), sa teneur en poids d'hémoglobine (MCH : Mean Corpuscular Hemoglobin – contenu moyen du GR en Hb) et la concentration en hémoglobine du globules rouges (MCHC : Mean Corpuscular Hemoglobin concentration – concentration moyenne Hb des GR), ainsi que l'hématocrite (Hct) qui exprime le rapport volume globules rouges/volume du sang total et le taux d'hémoglobine (Hb) en g/dl.

4.2 Cytologie et frottis sanguin :

L'examen du frottis de sang au microscope optique constitue un complément essentiel du comptage par automates. L'étude morphologique des éléments figurés du sang est réalisée par l'étalement d'une goutte de sang sur une lame de verre, suivi d'une fixation et coloration au May-Grünwald (Figure 23). La technique est réalisée comme suit :

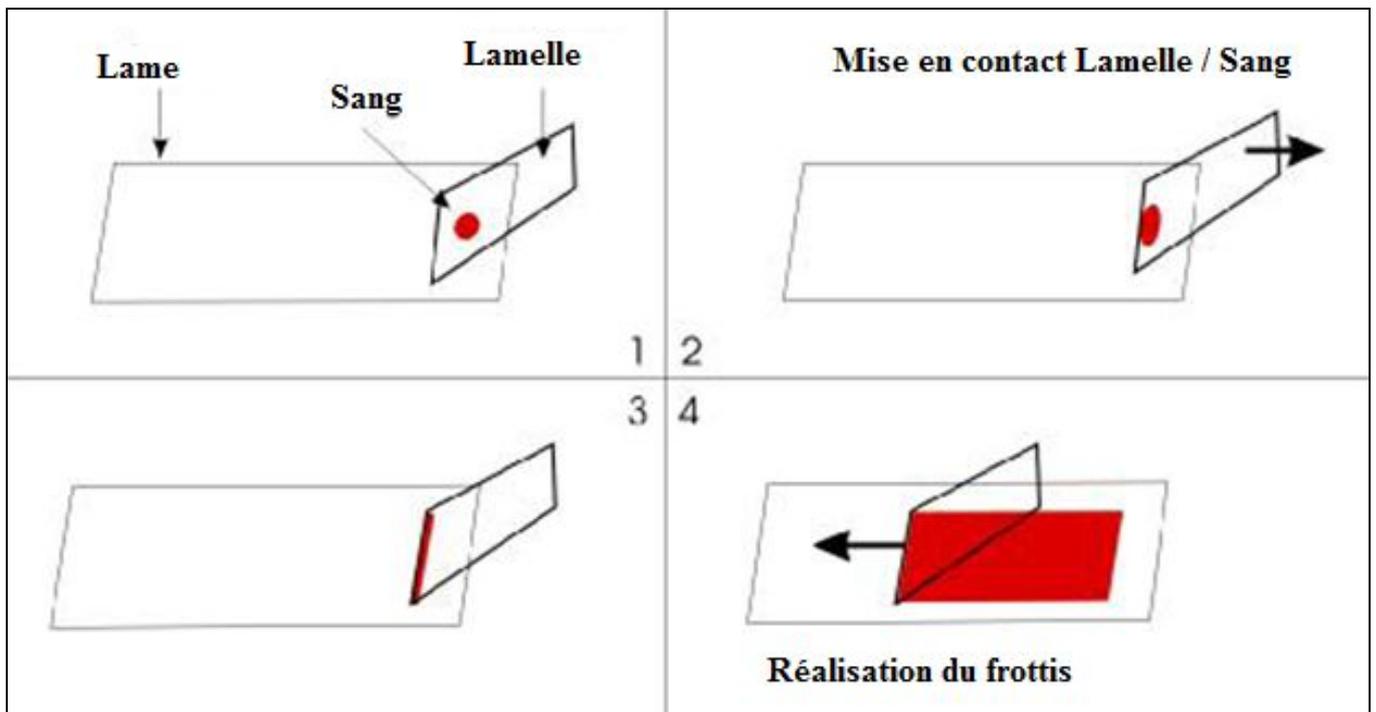


Figure 23 : La réalisation du frottis sanguin

- **Fixation** : La lame du frottis est placée sur un support horizontal au-dessus d'un bac de coloration. On verse sur la lame 15 gouttes de colorant May-Grünwald pur de façon à recouvrir complètement le frottis. On laisse agir 3 minutes.

- **Coloration au May-Grünwald** : On ajoute autant des gouttes d'eau neutre que de gouttes du colorant, le mélange est rapide, on laisse agir pendant 2 minutes. Pendant ce temps, on doit préparer la dilution du Giemsa, préparation extemporanée de 3 minutes auparavant. Pour cela, il faut introduire 20 cm³ d'eau neutre dans une éprouvette graduée, et ajouter 30 gouttes de colorant de telle manière que celui-ci reste à la surface de l'eau neutre. On rejette ensuite le colorant par un jet d'eau neutre.

- **Coloration au Giemsa** : On verse le contenu de l'éprouvette dans une boîte de Laveran. Dès que la lame est prête, on mélange en agitant doucement (le pouvoir colorant est maximum au moment du mélange). On dépose ensuite la lame (frottis en dessous) dans la boîte, on laisse agir pendant 20 minutes et on rince après sous un jet d'eau neutre.

- **Séchage** : On laisse sécher la lame à l'air, en position inclinée, après avoir essuyé la face inférieure de la lame avec du papier filtre. On attend au moins 5 minutes avant l'examen microscopique du frottis.

4.3 Réaction cytochimique par la Myéloperoxydase:

Les réactions cytochimiques avec certains colorants spécifiques permettent de définir, le plus souvent, les sous-types de LAM et LAL : myéloperoxydase (MPO) et estérase, des colorants spécifiques pour les cellules des lignées myéloïdes et lymphoïdes, respectivement.

C'est l'une des bases de la classification FAB (en complément de la cytomorphologie).

4.4 Myélogramme :

Le myélogramme est une analyse de la morphologie et de l'équilibre des différentes cellules présentes dans la moelle osseuse. Cette étude permet de diagnostiquer des cytopénies, des leucémies et des métastases au niveau de la moelle osseuses.

Pour réaliser un myélogramme, les cellules sont prélevées à l'hôpital par ponction-aspiration de la moelle au niveau du sternum ou au niveau des ailes iliaques, à l'aide d'une seringue spéciale appelée trocart.

Le prélèvement est réalisé sous anesthésie générale chez l'enfant. Après aspiration de l'échantillon de moelle osseuse, celui-ci est étalé sur des lames de microscope (frottis médullaire) puis examiné au microscope après coloration.

L'analyse du myélogramme nécessite d'avoir également les résultats d'un hémogramme (analyse sanguine) récent ayant mis en évidence des anomalies des éléments figurés du sang.

Il fournit plusieurs renseignements sur les cellules de la moelle osseuse, notamment :

- richesse en cellules et pourcentage de chacun des types de cellules ;
- aspect des cellules (cellules anormales ou en amas, anomalies morphologiques) ;
- détection de cellules anormales, comme des « blastes leucémiques » ;
- décompte des cellules médullaires.

Le compte rendu d'un myélogramme comporte un comptage des différentes lignées médullaires, ainsi qu'une conclusion décrivant les éventuelles anomalies observées.

Le médecin se base sur ce compte-rendu pour poser un diagnostic. Le cas échéant, il peut demander d'autres examens, notamment l'immunophénotypage et le caryotype médullaire.

4.5 Immunophénotypage :

L'immunophénotypage est une technique de cytométrie en flux qui permet de confirmer la nature blastique des cellules par l'expression de marqueurs d'immaturation, et de déterminer leur lignée : lymphoïde B, T, ou myéloïde, dont va dépendre la prise en charge thérapeutique. C'est également une technique cruciale pour le diagnostic de certaines entités rares (leucémie à cellules dendritiques, biphénotypique, peu différenciée...).

L'immunophénotypage est réalisé sur un prélèvement de moelle osseuse, qui est mis en contact avec un panel d'anticorps adapté à la pathologie recherchée, marqués par des fluorochromes. Différentes étapes de lyse des hématies, de perméabilisation peuvent être mises en œuvre. Le cytomètre dispose d'un système de fluidique permettant l'alignement des cellules dans un liquide de gaine, et leur passage une par une devant des lasers et des détecteurs de fluorescence (photomultiplicateurs). Classiquement, quelques dizaines à quelques centaines de milliers de cellules sont analysées pour chaque échantillon. Les cytomètres actuels de routine permettent de détecter jusqu'à 10 fluorescences ou « couleurs » différentes, auxquelles s'ajoutent la taille et la structure pour chaque cellule analysée. Des logiciels permettent l'exploitation de ces nombreuses données sous formes de graphiques ou cytogrammes représentant l'intensité de fluorescence des cellules pour chaque paramètre. Les profils d'expressions permettent l'identification des sous-populations cellulaires d'intérêt.

5. Étude cytogénétique : obtention du carvotype en bandes R:

Afin d'obtenir des chromosomes en métaphase avec des bandes distinctes, une série d'étapes est nécessaire, incluant la culture cellulaire, l'arrêt des cellules en métaphase, la récolte, la dénaturation en bandes R pour le marquage des chromosomes, et la coloration.

Les étapes de la réalisation du caryotype conventionnel sont schématisées ci-dessous (Figure 24) puis détaillées par la suite.

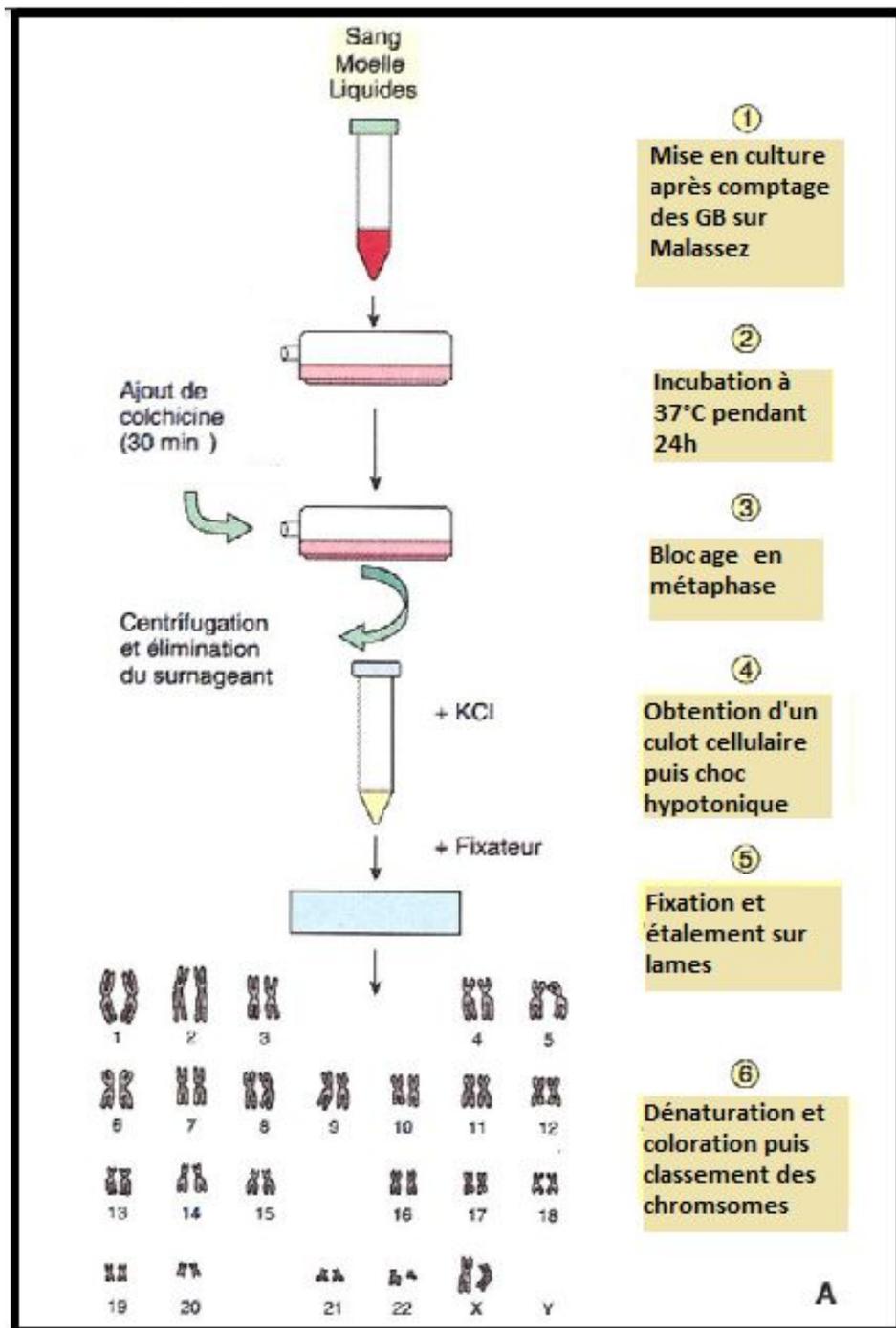


Figure 24: Étapes de la réalisation de la technique du caryotype

5.1 La culture cellulaire

La mise en culture est effectuée stérilement suite à une numération des globules blancs par millilitre (ml) de l'échantillon à l'aide d'un comptage au microscope d'une cellule de MALASSEZ (Figure 25).

Le milieu de culture utilisé pour la culture de cellules de moelle osseuse est un milieu RPMI de base enrichi en sérum de veau fœtal, auquel on rajoute la pénicilline et la L-glutamine.

La culture cellulaire est effectuée dans une étuve à CO₂ à 5% à 37°C pour une durée de 17 à 24h.

5.1.1 Comptage sur cellule de Malassez

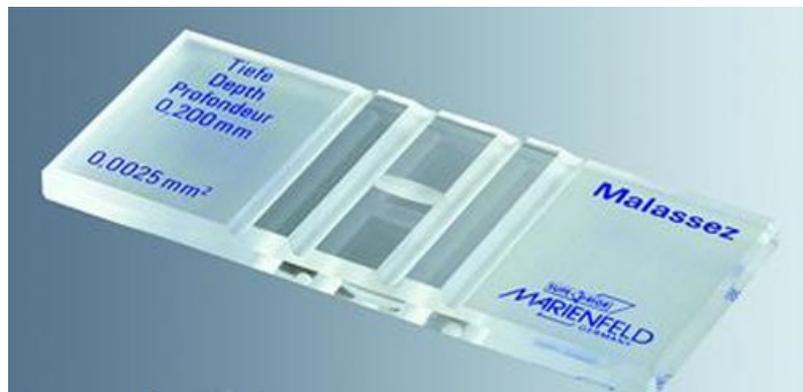


Figure 25 : Lame de Malassez en verre

La cellule de Malassez est un hématimètre qui permet de compter le nombre de cellules en suspension dans une solution. Cette méthode de dénombrement ne permet de compter que les cellules (vivantes ou non) dans une solution, et non d'autres organismes tels que les Bactéries. Il s'agit d'une lame de verre sur laquelle un quadrillage a été gravé de 25 rectangles contenant eux-mêmes 20 petits carrés.

Pour remplir la cellule de comptage, humecter les deux plateaux latéraux, homogénéiser la suspension cellulaire -constituée de 10 µl de la moelle + 990 µl de la solution de lyse des globules rouges- agitée préalablement au vortex, et prélever celle-ci à l'aide d'une pipette Pasteur. Remplir la chambre de comptage par capillarité : on dépose entre 10 et 15 µl de cellules en suspension en plaçant la pointe de la pipette légèrement inclinée près de la lamelle sur la plate-forme centrale quadrillée. Le remplissage doit être fait en une seule fois, sans bulles d'air, et sans faire déborder le liquide dans les rigoles. Laisser sédimenter les cellules sur le quadrillage quelques minutes, et passer à la numération.

Pour dénombrer les cellules (globules blancs), on compte les cellules au grossissement 10 en fermant légèrement le diaphragme pour baisser la lumière. On compte les cellules comme indiqué sur le schéma ci-dessous (Figure 26).

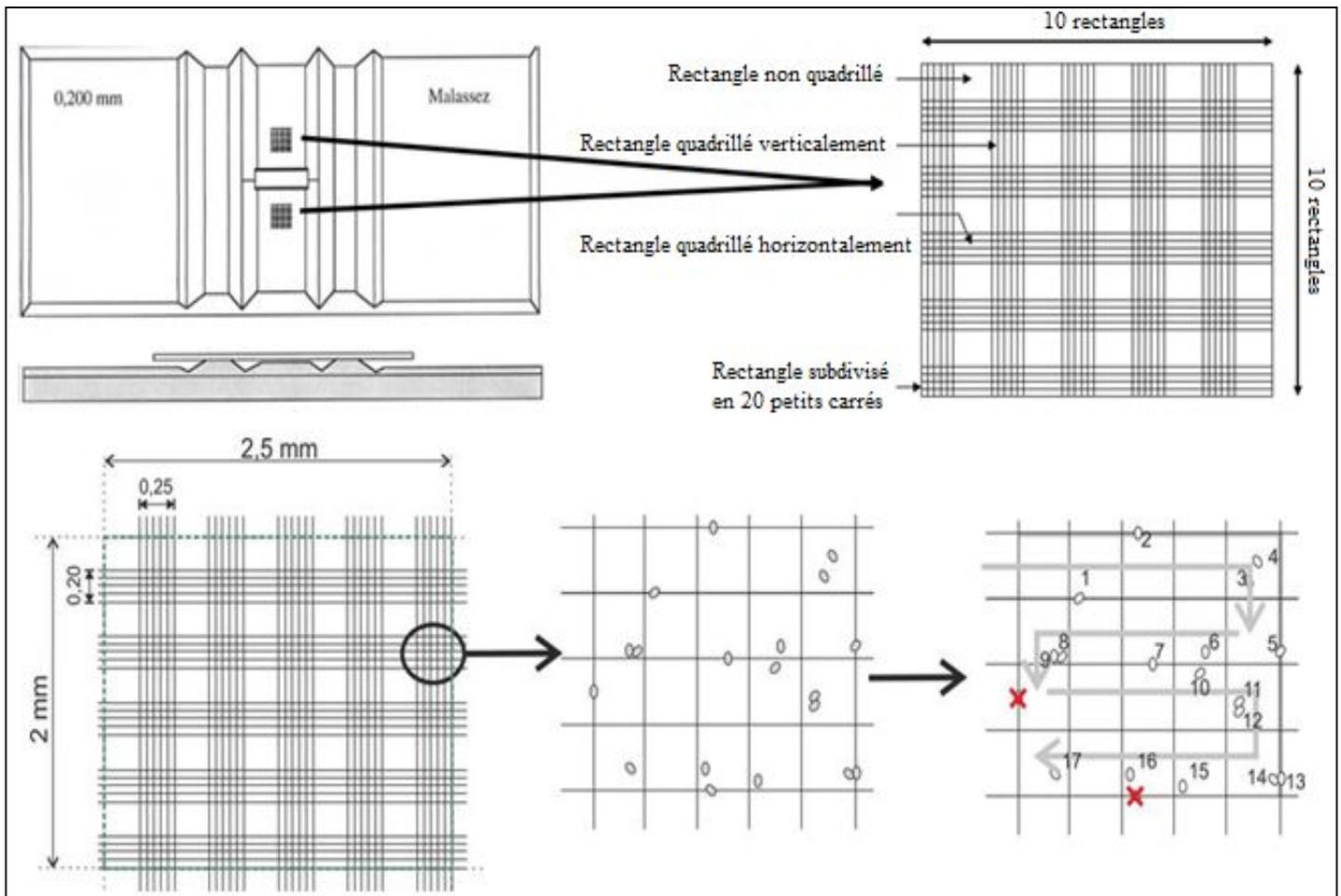


Figure 26 : Comptage sur cellule de MALASSEZ

Pour les cellules chevauchant les lignes de quadrillage, compter seulement celles qui chevauchent 2 arêtes du rectangle sur 4 (en pratique, on choisit de prendre en compte les cellules chevauchant la ligne horizontale supérieure, et la ligne verticale droite).

On compte les 25 rectangles (5 rectangles par lignes sur 5 lignes) = valeur X

On calcule la moyenne $M = X/5$.

N.B : Si l'échantillon est très riche, on peut compter 2 à 3 lignes de la cellule de Malassez.

Dans ce cas $M = X / 2$ (2 lignes) ou $M = X / 3$ (3lignes).

- Le nombre de cellules par mm³ = $M \times 10$ (la totalité de la grille) $\times 100$ (dilution)
= $M \times 10^3$.

- Le nombre de cellules par ml = $M \times 10^3 \times 10^3$ (conversion en ml).
- Calculer le volume nécessaire pour mettre 10^7 cellules par culture :

$$\frac{1 \times 10^7}{M \times 10^6}$$

Exemple :

- Le nombre de cellules comptées $M = 25$
- Le nombre de cellules par mm³ = $25 \times 10 \times 100 = 25 \times 10^3$.
- Le nombre de cellules par ml = $25 \times 10^3 \times 10^3 = 25 \times 10^6$.
- Le volume pour mettre 10^7 de cellules : $1 \times 10^7 = 0,4 \text{ ml}$
 25×10^6

Cas particulier d'un échantillon trop riche :

Si le nombre de cellule est trop important pour pouvoir être compté dans les carrés, diluer l'échantillon dans du RPMI reconstitué et refaire une numération.

5.1.2 Milieu de culture RPMI :



Figure 27: Flacon de 500ml du milieu de culture RPMI

Le milieu de culture généralement utilisé est le RPMI (Voir Annexe 1 : composition) (Figure 27), complété par des nutriments et des additifs nécessaires pour la croissance cellulaire, comme :

- le sérum de veau fœtal à 20% (à raison de 100 ml dans 500ml du RPMI)
- la L-Glutamine à 1% (à raison de 5 ml dans 500 ml du RPMI)
- la pénicilline-streptomycine à 0,8% (à raison de 4 ml dans 500 ml du RPMI)

NB : le milieu ainsi préparé est aliquoté dans des tubes en polypropylène stériles, conservé à -20° et décongelé et réchauffé à 37°C le jour de son utilisation.

5.1.3 Mise en culture



Figure 28 : Hotte à flux laminaire vertical

La mise en culture est effectuée sous la hotte à flux laminaire (figure 28) dans des flasks stériles de 25cm^2 , en ajustant la concentration cellulaire à 10^7 cellules par culture.

→ La quantité de moelle osseuse à mettre en culture dépend du nombre de globules blancs présents dans le prélèvement obtenu par comptage sur cellule de Malassez.

Le flask de culture est ensuite incubé dans l'incubateur à CO_2 à 37°C pendant 24 heures en position horizontale (Figure 29).

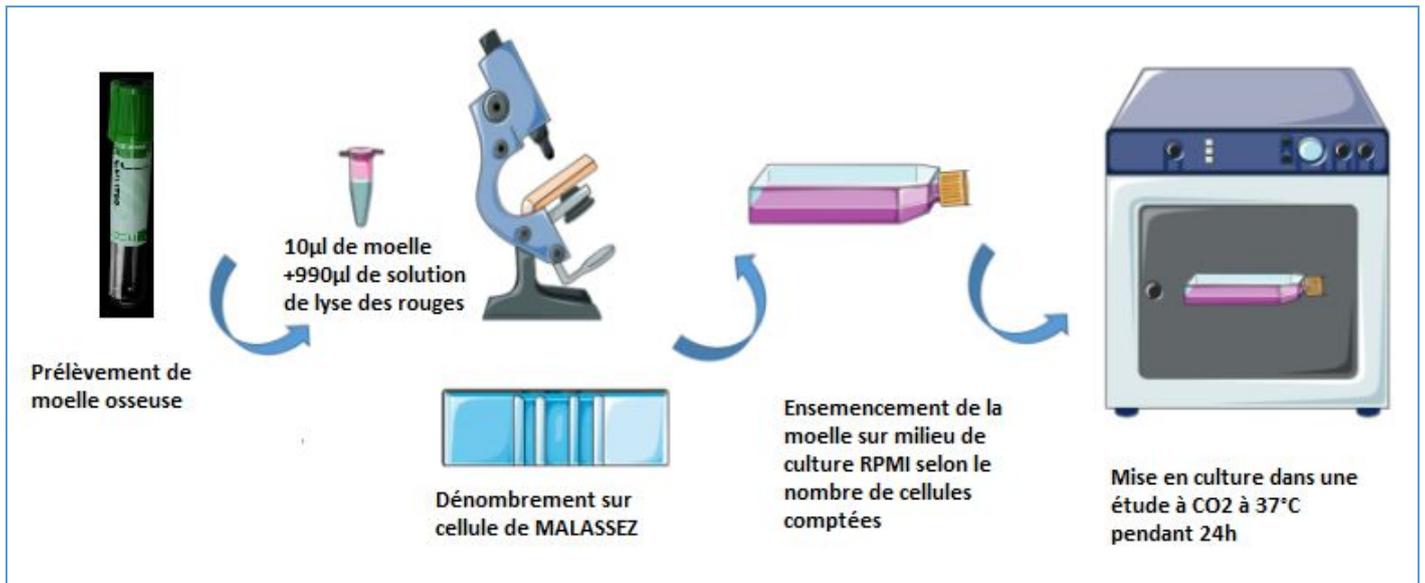


Figure 29 : Etapes de mise en culture de la moelle osseuse pour étude cytogénétique

5.1.4 Culture avec mitogènes

L'étude cytogénétique conventionnelle des LAL reste limitée par la faible activité mitotique des cellules tumorales in vitro. L'utilisation d'agents mitogènes est des fois nécessaire pour augmenter le nombre de métaphases dans ces pathologies.

L'utilisation du DSP30 (oligonucléotide CpG immunostimulant) induit l'entrée en cycle cellulaire des cellules et cette prolifération est augmentée par l'IL-2.

Méthode :

- Préchauffer les solutions de travail AmpliB-DSP30 et IL-2.
- Préchauffer le milieu RPMI reconstitué préalablement préparé et aliquoté en 8 ml (tube en PP).
- Sous la hotte à flux laminaire, transvaser le milieu RPMI contenu dans le tube en PP dans le Flask de culture (récupérer la totalité du volume par micropipette).
- Ajouter dans le Flask de culture 10 µl du AmpliB-DSP30 + 1 ml du IL-2 (500 IU) par 10ml de la préparation cellulaire (10^6 cellules / ml ; Sang ou Moelle)
- Ajouter le volume nécessaire de l'échantillon selon le nombre de cellules comptées.
- Mettre le flask à plat sur le plateau en inox (bouchon vers le haut), homogénéiser le flask par des mouvements circulaires et dévisser légèrement le bouchon (1/4 de tour).
- Le temps de culture avec mitogènes est de 72h (Figure 30)

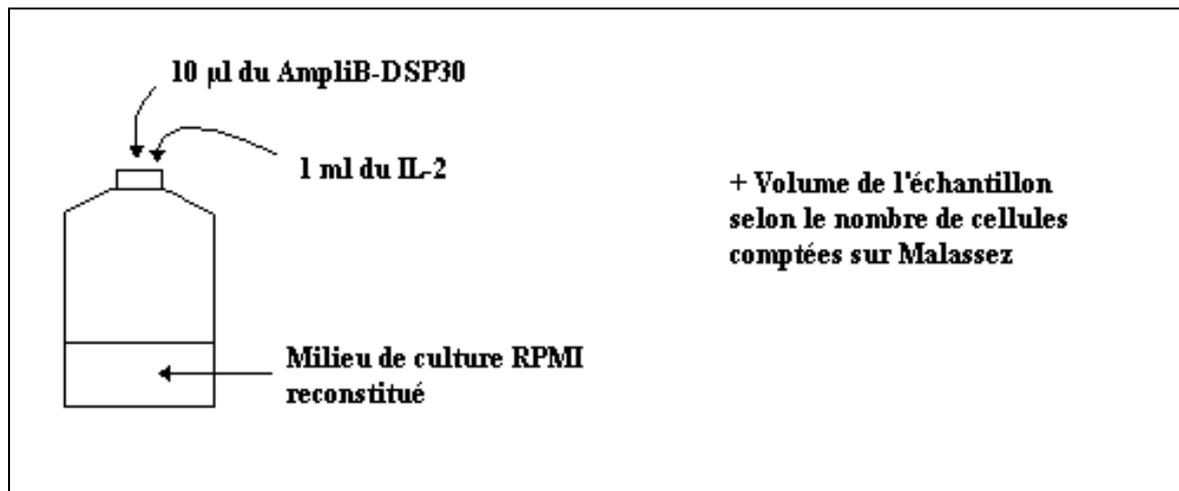


Figure 30 : Culture avec mitogènes

5.1.5 Technique de la culture synchronisée

L'étude des cellules en prométaphase (fin de prophase ou début de métaphase) par synchronisation des cultures associée à l'incorporation d'analogues de bases (bromodésoxyuridine ou BrdU) qui modifient les propriétés tinctoriales des bandes chromosomiques, permet d'améliorer la résolution du caryotype et d'observer 600 à 800 bandes par lot haploïde de chromosomes. Des remaniements chromosomiques plus fins peuvent être observés mais l'interprétation est délicate et plus efficace si elle est focalisée sur un chromosome ou une région chromosomique donnée.

Méthode :

Après 72h de culture, rajouter 0,2 ml de la solution A du Synchronet (REF EKAMTS-008) dans 10 ml de la culture cellulaire.

Après une nuit d'incubation, ajouter 0,2 ml de la solution B du Synchronet (REF EKAMTS-008), sans changer le milieu de culture et incuber pendant 5 heures supplémentaires.

Ajouter 100µl de la colchicine (20 µg/ml) et incuber pendant 60 minutes.

Si le Synchronet est utilisé pour la première fois, des temps variés d'incubation avec la colchicine doivent être essayés. Ex : 30 min, 45 min, 1h.

Suivre la technique standard de la préparation des métaphases

5.1.6 Cas particulier :

Laver l'échantillon de sang ou de moelle si :

- Le patient a subi un traitement (indiqué sur la feuille de renseignements),
- Si le prélèvement a été réalisé il y a plus de 2 jours.
- Si le flacon de transport est non conforme (tube EDTA, milieu de transport périmé, moelle dans un tube de sang hépariné, etc.).

Pour cela, mettre dans un tube conique stérile contenant 3 ml de RPMI reconstitué, centrifuger, ôter le surnageant sous la hotte. Faire le comptage des cellules à ensemercer à partir du culot.

Si nécessaire, centrifuger une deuxième fois, puis mettre en culture.

De façon générale :

Coller une étiquette code barre du patient sur chaque Falcon. Sur cette étiquette noter :

- Le code du dossier génétique du patient
- Le temps de culture
- Les mitogènes s'ils sont utilisés
- La nature de l'échantillon

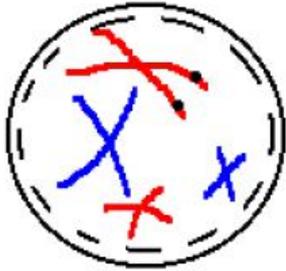
5.2 La récolte :

Cette étape permet de recueillir des cellules en mitose. Pour cela, les cellules en culture sont bloquées en métaphase, traitées avec une solution hypotonique, fixées et étalées sur des lames pour analyse.

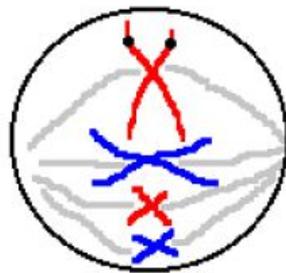
5.2.1 Traitement à la colchicine

L'établissement de la carte chromosomique se fait au stade du cycle cellulaire où les chromosomes sont le plus condensés. On bloque la division cellulaire en inhibant la formation du fuseau par la colchicine (Figure 31).

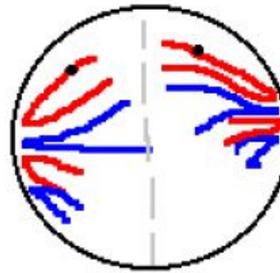
La mitose



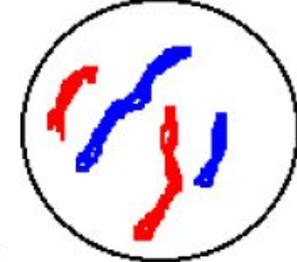
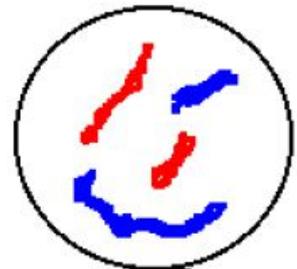
Prophase : condensation de la chromatine. En fin de prophase, l'enveloppe nucléaire disparaît.



Métaphase : les chromosomes dupliqués s'alignent sur la "plaque équatoriale".



Anaphase : séparation des 2 chromatides de chaque chromosome qui migrent vers les pôles cellulaires



Télophase : constitution des deux cellules filles, un nouveau cycle commence.

Figure 31 : Les phases de la mitose

La colchicine est un inhibiteur du fuseau mitotique qui permet de bloquer les cellules en métaphase afin de pouvoir observer les chromosomes. Pour cela, on utilise un poison du fuseau de division (classiquement c'est la Colchicine qui est utilisée ou son équivalent synthétique la Colcémide) qui empêche la progression de la mitose vers l'anaphase en bloquant la polymérisation des tubulines dans les microtubules.

La colchicine est ajoutée à une concentration finale de 10µg/ml à 37°C pendant une durée de 30 minutes.

5.2.2 Choc hypotonique

Suite à une centrifugation (1500 tours pendant 5 minutes), les cellules sont exposées à un choc hypotonique d'une solution préchauffée à 37°C de chlorure de potassium (KCL) à 0.075M.

Cette étape, indispensable pour avoir un étalement correct, entraîne le gonflement des cellules par différence de pression osmotique. Les membranes cytoplasmique et nucléaire sont fragilisées.

➤ **Préparation du choc KCL :**

Préparation du KCl solution mère :

- 27,96g de KCl.
- qsp 500 ml d'eau osmosée fraîche.

Préparer le KCl solution fille à partir de la solution mère :

- 10 ml de KCl solution mère.
- qsp 100 ml d'eau osmosée fraîche.

Le choc doit être à la fois mécanique et thermique : on jette le surnageant et on ajoute 0,5 ml de KCl pour réaliser le choc hypotonique, par des agitations tout d'abord doucement jusqu'à dissolution totale du culot, puis vigoureusement et on termine cette étape en complétant en qsp jusqu'à 12 ml.

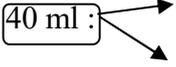
On remet les tubes dans l'incubateur à 37° pendant 20 minutes en position inclinée à 30°. Pendant ce temps, on prépare la solution de fixation.

5.2.3 Fixation

La solution de fixation : le Carnoy est constituée d'un mélange de méthanol et d'acide acétique, avec des proportions de 3 volumes de méthanol et 1 volume d'acide acétique. Cette solution peut être gardée pendant 8h après sa préparation.

La quantité du fixateur à préparer dépendra du nombre de tubes à traiter.

Exemple : On effectue 3 fixations par tube à raison de 10 ml par fixation = 30ml :

Pour 1 tube : On prépare 40 ml :  10 ml d'acide acétique.
30 ml de méthanol.

Après centrifugation et décantation suite à l'étape du choc, les cellules sont fixées à l'aide d'une solution de Carnoy. Cette acidification (préfixation) du milieu permet l'arrêt du choc cellulaire en éliminant le reste du KCl.

La répétition des fixations élimine les débris cellulaire avec un bon lavage des lymphocytes. On procède à plusieurs fixations jusqu'à ce que le culot devienne propre:

Pour la préfixation: on ajoute 1 ml du fixateur sur le mélange choc (après remise en suspension de ce dernier par retournement du tube) de façon progressive et on centrifuge à 1500 t/mn pendant 5 mn.

On jette le surnageant toute en laissant 2 mm au-dessus du culot.

- **1ère fixation** : on aspire le surnageant, on ajoute quelques gouttes du fixateur, on mélange doucement puis on rajoute 10 ml du fixateur sur le culot de façon progressive en aspirant et refoulant le mélange. On centrifuge à 1500 tours/minute pendant 5 minutes et on verse le surnageant.

- **2ère fixation** : on aspire le surnageant, on ajoute quelques gouttes du fixateur, on mélange doucement puis on rajoute 10 ml du fixateur sur le culot de façon progressive en aspirant et refoulant le mélange. On centrifuge à 1500 tours/minute pendant 5 minutes et on verse le surnageant.

- La **3ème fixation** se fait en ajoutant 0,5 ml de la solution de fixation puis on mélange tout d'abord doucement, jusqu'à dissolution totale du culot, et on complète ensuite jusqu'à un volume en qsp de 10 ml. On centrifuge à 1500tours/minute pendant 5 minutes et on retire le surnageant avec une pipette en laissant de 0,5 à 2 ml : un volume proportionnel avec la quantité du culot cellulaire. Ce paramètre aura son importance par la suite sur la détermination de la densité des lames en noyaux. On laisse les tubes reposer pendant 30 minutes.

N.B : Si l'aspect du culot cellulaire reste sale, on peut rajouter d'autres lavages jusqu'à obtention d'un culot cellulaire propre (Figure 32).



Figure 32 : Culot de culture cellulaire

À l'issue de ces étapes, les cellules sont prêtes pour l'étalement.

On prépare l'étalement en mettant un bécher rempli d'eau distillée sur la plaque chauffante pour étaler à la vapeur, on prépare également une pipette pasteur en verre pour chaque patient (numérotée et munie d'une poire d'aspiration).

5.2.4 Étalement des lames

La mise des cellules sur lames s'effectue dans une salle de technique où les conditions d'humidité et de température sont contrôlées, de façon à obtenir une température entre 22°C et 24°C et une hygrométrie entre 45 et 55% idéalement.

À l'aide d'une pipette pasteur, on dépose deux gouttes de la suspension cellulaire en élevant la main à 10cm de hauteur de la vapeur et en inclinant légèrement la lame pour faire glisser les gouttes.

La qualité de l'étalement est vérifiée à l'aide d'un microscope inversé après séchage des lames. Celle-ci peut alors être améliorée en ajustant la concentration du culot cellulaire en fonction de l'indice mitotique, ou en laissant les lames plus de temps sur la vapeur si l'aspect des noyaux et des mitoses paraît foncé et réfringent et moins de temps si leur aspect paraît trop clair.

Dans un premier temps, on réalise l'étalement d'une seule lame par tube et par malade et on apprécie au microscope la présence et la qualité des mitoses.

Dans un deuxième temps on décide la réalisation d'autres lames qu'on identifie par le code patient, la date et le numéro de lame.

Suite au vieillissement des lames à 37°C pendant 30 minutes, on procède à la dénaturation en bandes R par la chaleur.

5.3 Dénaturation des chromosomes

Lorsque l'on colore des préparations chromosomiques avec du Giemsa, les chromosomes prennent un aspect rose violacé à peu près homogène sur toute leur longueur. On ne peut donc les distinguer les uns des autres que par leur taille et leur forme. Cependant, ces critères sont insuffisants pour assurer la reconnaissance et l'interprétation correcte des anomalies chromosomiques.

Pour reconnaître spécifiquement chaque paire chromosomique, on utilise donc des techniques de marquage particulières qui permettent d'obtenir une coloration alternée des chromosomes par le Giemsa et l'apparition de bandes. C'est la succession de bandes sombres et claires le long d'un chromosome, identique chez tous les individus pour un chromosome donné, qui en permet l'identification précise, selon le même principe qu'un code à barres.

Il existe deux principales techniques de marquage en bandes des chromosomes (banding), utilisées en routine :

Les bandes G, obtenues par digestion trypsinique modérée des chromosomes. Cette technique est la plus utilisée par les anglophones.

Les bandes R, obtenues par dénaturation chimique et thermique ménagée à l'aide du tampon phosphate. Cette technique est la plus utilisée par les francophones.

Dans les deux cas, les bandes ne deviennent visibles qu'après une coloration avec le Giemsa. Ces deux techniques donnent un marquage réciproque, c'est-à dire que là où l'on obtient une bande sombre avec l'une des deux techniques, on observe une bande claire avec l'autre.

Dans notre travail nous avons utilisé la technique de banding chromosomique classique obtenue après dénaturation par la chaleur et par le tampon phosphate (bandes R : RHG).

Agiter à l'aide d'un agitateur magnétique jusqu'à dissolution complète (2 à 3 heures).

Il s'agit d'une dénaturation thermique ménagée en milieu ionique à 87,5°C en un temps de dénaturation préalablement défini suivant les conditions du laboratoire (température et humidité) suivie d'une coloration au Giemsa.

Cette technique de marquage permet la mise en évidence des bandes sur les chromosomes mitotiques.

➤ ***Préparation du tampon phosphate :***

La masse molaire du NaH_2PO_4 est $M=137,90$, d'où :

- Peser 137,99g de du $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ sur la balance de précision
- qsp 1 litre d'eau osmosée fraîche.

Remplir de la solution préparée.

Préchauffer la solution du tampon phosphate (préalablement préparée) au bain marie dans un bac en porcelaine de 125ml pendant 1 heure minimum.

Réaliser un premier essai de dénaturation en plongeant une lame d'essai dans le bac de dénaturation.

Le temps de dénaturation est très important et de lui va dépendre la qualité du banding chromosomique.

Ce temps est aléatoire et dépend de l'hygrométrie et de la température ambiante, il doit être adapté à chaque nouvelle dénaturation.

Nous testons quelques lames initiales avec des temps de dénaturation compris entre 13 et 16 minutes et après appréciation de la qualité de la dénaturation au microscope, nous ajustons ce temps suivant le stade de dénaturation obtenue.

5.4 Coloration des lames :

A la fin de la dénaturation on l'arrête en plongeant les lames rapidement dans un bain d'eau distillée et ensuite mises dans un autre bac contenant la solution de coloration : Giemsa tamponnée à 4%.

➤ *Préparation de la solution de coloration :*

Dans un bac en verre entouré par du papier aluminium :

- Verser 100 ml de l'eau osmosée (mesurée par une éprouvette)
- Ajouter 4 ml du tampon pH=7 (par une liquipette)
- Ajouter 4 ml du colorant Giemsa (par une autre liquipette)
- Bien mélanger la solution par aspiration et refoulement.
- Couvrir le bac en verre par un couvercle entouré d'aluminium également (solution à l'abri de la lumière).
- Conserver la solution à température ambiante pendant 8 heures au maximum.

Des techniques introduites dès le début des années 1970, ont permis de déterminer sur les chromosomes une alternance de bandes claires et de bandes sombres transversales caractéristiques. Chaque chromosome est divisé en régions comprenant elles-mêmes des bandes qui sont divisées en sous bandes.

Ainsi, chaque paire de chromosome peut être parfaitement identifiée.

Plusieurs techniques de coloration chromosomique en bandes sont utilisées. La technique de bande G est la plus fréquemment employée. Elle définit la coloration des chromosomes au moyen du colorant GIEMSA, après dénaturation de l'ADN à l'aide de la Trypsine.

La technique de bande R fait intervenir un prétraitement par la chaleur avant la coloration au GIEMSA et montre une distribution de bandes inverse à celle des bandes G (Figure 33). Elle est utilisée comme méthode de routine dans beaucoup de laboratoires Européens et au Maroc.

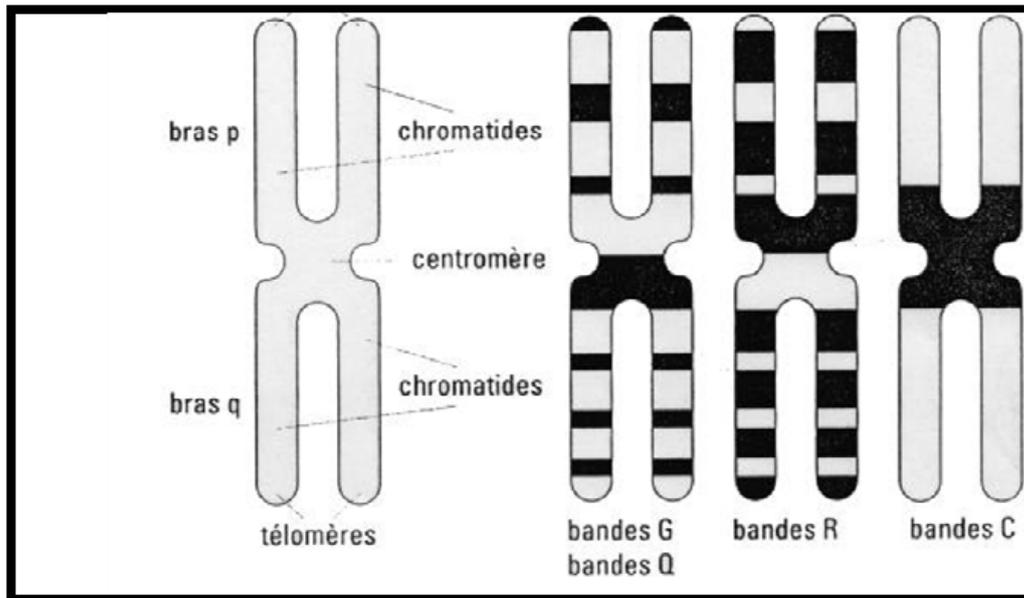


Figure 33 : Structure des chromosomes : bandes

Le temps de coloration varie entre 2 et 5 minutes selon la concentration de la lame en cellules et l'aspect des mitoses vérifié auparavant au microscope optique après l'étalement.

Après leur coloration, les lames sont rincées à l'eau distillée, égouttées et séchées.

5.5 Observation au microscope

Les lames sont ainsi prêtes pour être examinées pour établir un caryotype et rechercher d'éventuelles aberrations chromosomiques.

Un logiciel semi-automatique est relié au microscope par une caméra et permet de capturer les métaphases à partir des lames. Le système comprend un microscope et un réseau informatique permettant une lecture manuelle des lames pour l'établissement du caryotype d'un patient.

Les images des mitoses sont capturées par le système, les chromosomes sont séparés en partie manuellement. Le classement semi-automatique des chromosomes nécessite l'intervention de l'observateur pour corriger les erreurs de la machine et ne dispense donc pas d'une connaissance approfondie des chromosomes.

La validation de la classification chromosomique est assurée par le médecin cytogénéticien du laboratoire.

5.6. Interprétation du caryotype

5.6.1 Classification des chromosomes :

La classification des chromosomes est fondée sur leurs caractères morphologiques (taille, indice centromérique, répartition des différentes bandes) (Figure 31).

Leur nomenclature a évolué parallèlement à l'amélioration des techniques et son établissement a fait l'objet de plusieurs réunions internationales de standardisation. Les chromosomes sont classés par paire, en fonction de leurs tailles et de la position du centromère (schéma). Les bras chromosomiques sont désignés respectivement par p pour le bras court et q pour le bras long.

Ces paramètres d'identification permettent de déterminer des groupes chromosomiques (de A à G) (Figure 34). Les 46 chromosomes humains sont répartis en 23 paires : 22 paires de chromosomes sont identiques chez l'homme et la femme et sont nommés autosomes, la paire restante est représentée par les chromosomes sexuels nommés gonosomes. Ces gonosomes sont les chromosomes XX chez la femme et XY chez l'homme.

Le classement des paires de chromosomes aboutit ainsi au caryotype de l'individu, dont il est possible de déduire la formule chromosomique, selon une nomenclature définie.

Il est indiqué successivement, le nombre total de chromosomes suivi d'une virgule, les chromosomes sexuels, et l'anomalie chromosomique quand elle existe (Tableau VIII).

Pour exploiter nos résultats, nous avons fait appel à la nomenclature cytogénétique internationale (ISCN 2009-2013) qu'on rappelle brièvement :

* caryotype normal : 46, XX ou 46, XY

* point de cassure sur un chromosome désigné successivement par :

- P ou q : bras court ou bras long.
- Les n° région, n° bande, n° sous bande.

* Anomalies numériques établies à partir caryotype normal diploïde (2n) à 46 chromosomes :

- Perte ou gain (monosomie ou trisomie).
- Degré de ploïdie (diploïde 2n, hypodiploïde <46 ou hyperdiploïdes >46 chromosomes, haploïde n, triploïde 3n).

* Anomalies structurales :

- Portant sur un chromosome (délétion, inversion, insertion, chromosome en anneau, duplication, iso chromosome).

- Portant sur deux ou plusieurs chromosomes (translocation simple ou complexe).

Nomenclature génétique	Signification
p	Bras court
q	Bras long
q2	Deuxième région du bras long
q23	Troisième bande de la deuxième région du bras long
11q23	Troisième bande de la deuxième région du bras long du chromosome 11
t	Translocation : échange de matériel entre 2 chromosomes
inv	Inversion : remaniement impliquant une double cassure sur un chromosome et recollement après inversion.
add	Addition : rajout de matériel chromosomique d'origine inconnue
del	Délétion : perte d'un segment chromosomique
mar	Marqueur chromosomique non identifié
r	Ring : chromosome en anneau
der	Dérivé : marqueur partiellement identifié portant le centromère du chromosome reconnu

Tableau VIII : Nomenclature cytogénétique

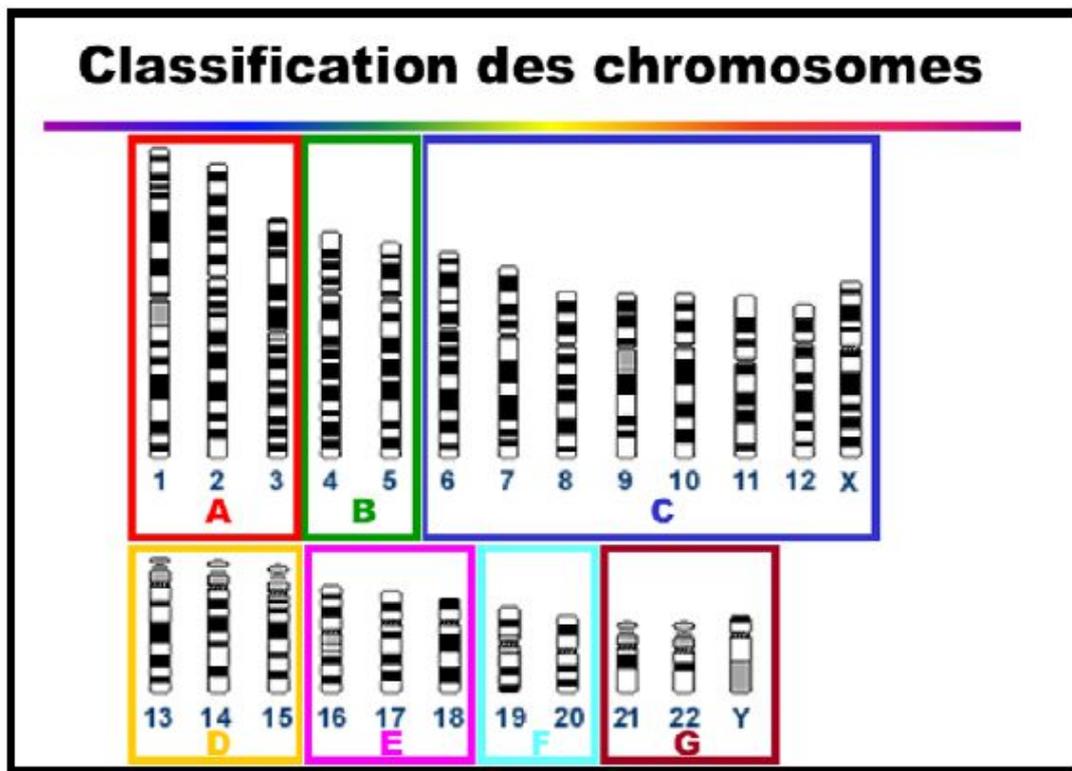


Figure 34 : Classification des chromosomes

5.6.2 Interprétation :

Pour interpréter nos résultats, il convient d'avoir en théorie 20 mitoses analysables par malade. On commence la formule chromosomique par le clone pathologique avec des anomalies chromosomiques clonales en tenant compte des critères de clonalité :

Un clone est défini par deux cellules au moins, possédant le même chromosome surnuméraire ou la même anomalie de structure, ou trois cellules au moins lorsqu'il y a la perte d'un même chromosome.

On considère qu'une anomalie est primaire si elle est présente dans toutes les cellules du clone leucémique et secondaire si elle est surajoutée à l'anomalie primaire.

En ce qui concerne les caryotypes dont la qualité était médiocre et le culot cellulaire disponible, l'étalement et le marquage sont répétés afin de permettre une analyse plus précise.

La nature des cellules leucémiques ne permet pas d'obtenir des résolutions élevées d'où les réarrangements cryptiques pourraient être manqués. Pour compléter cette technique de détection d'anomalies chromosomiques, la FISH est effectuée pour certains cas. La nature des sondes demandées dépend de l'indication première et du type d'anomalies retrouvées au niveau du caryotype (Figure 35 et 36).



Figure 35 : Image d'une métaphase au grossissement 100

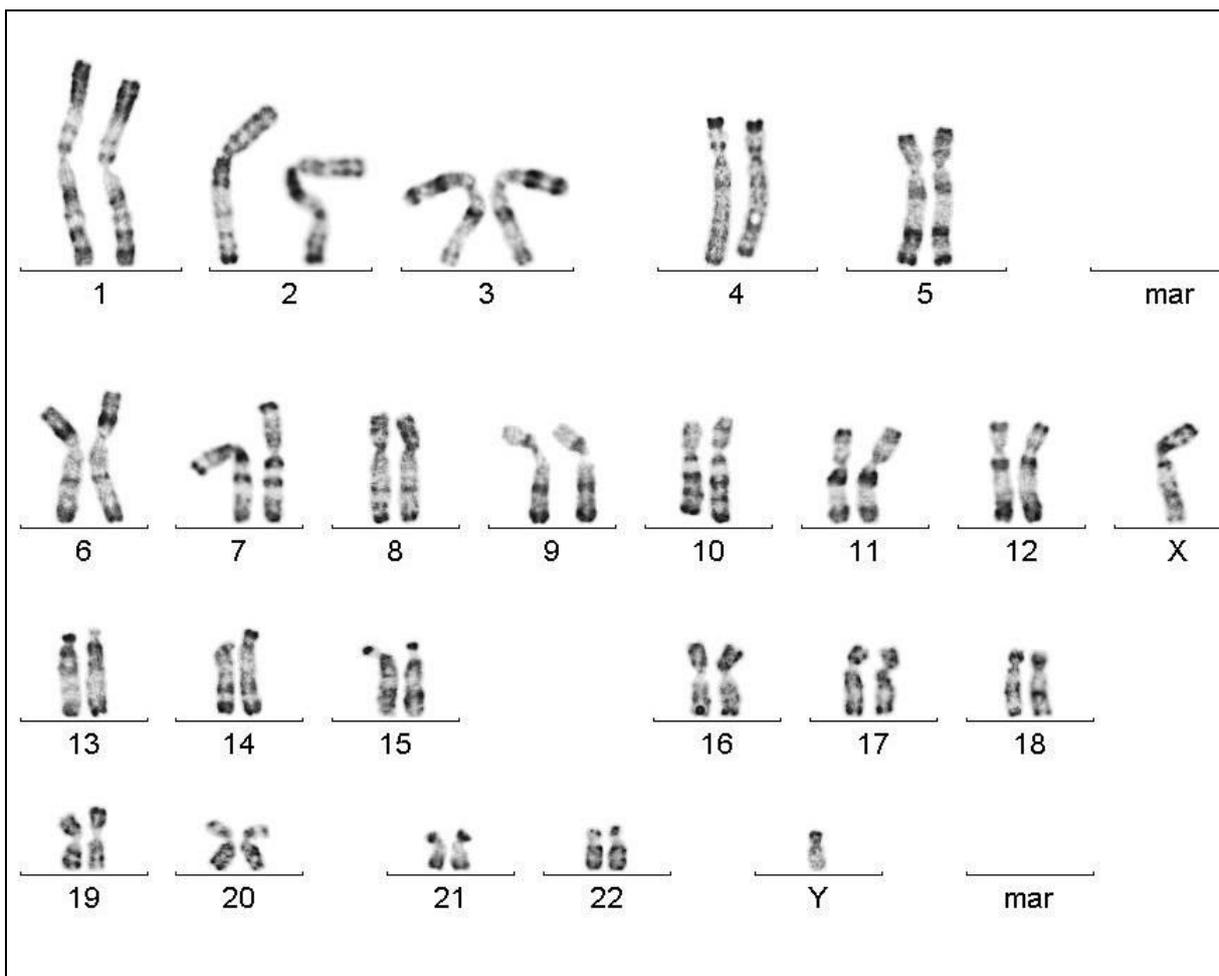


Figure 36 : Exemple de caryotype masculin normal en bandes R

5.6.3 Nombre de mitoses à examiner :

Le nombre de mitoses à analyser peut varier en fonction du stade de la maladie.

- Au diagnostic, il est nécessaire, en l'absence d'anomalie détectée, d'analyser au moins **20 mitoses** et de classer **4 à 5 caryotypes**. En cas d'anomalie, il est également recommandé d'analyser **20 mitoses** et de classer **4 à 5 caryotypes**, voire plus selon les pathologies et les anomalies détectées.
- Pour la recherche d'une anomalie préalablement décelée au diagnostic, il est recommandé soit d'analyser **au moins 30 mitoses** quand l'analyse ne peut être faite qu'en cytogénétique conventionnelle, soit de réaliser une analyse ciblée en cytogénétique moléculaire, d'emblée ou en complément d'une analyse conventionnelle de 20 mitoses qui n'a pas mis en évidence l'anomalie recherchée.

5.6.4 Conservation des échantillons :

- Après la mise en culture les tubes de prélèvements sont conservés jusqu'au rendu du résultat à +4°C.
- A la fin de la technique, la dénaturation et la vérification du succès de la culture, les tubes de prélèvement sont jetés dans des containers destinés aux les déchets infectieux et/ou souillés par des liquides biologiques.
- Les culots de culture cellulaires sont transvasés dans des cryotubes et conservés à -18°C.

Remise en culture :

- Si échec de la culture, remettre en culture le plus rapidement possible en considérant les causes possibles d'échec.
- Essayer d'identifier la cause de l'échec :
 - quantité insuffisante : rectifier le volume.
 - prise médicamenteuse : faire des lavages.
- Editer les étiquettes code-barres pour les nouveaux flasks de culture.
- Noter le motif et la date de remise en culture.
- Si on n'a pas suffisamment d'échantillon, on demande un autre prélèvement avant toute prise médicamenteuse.

5.7 La FISH : hybridation in situ par fluorescence :

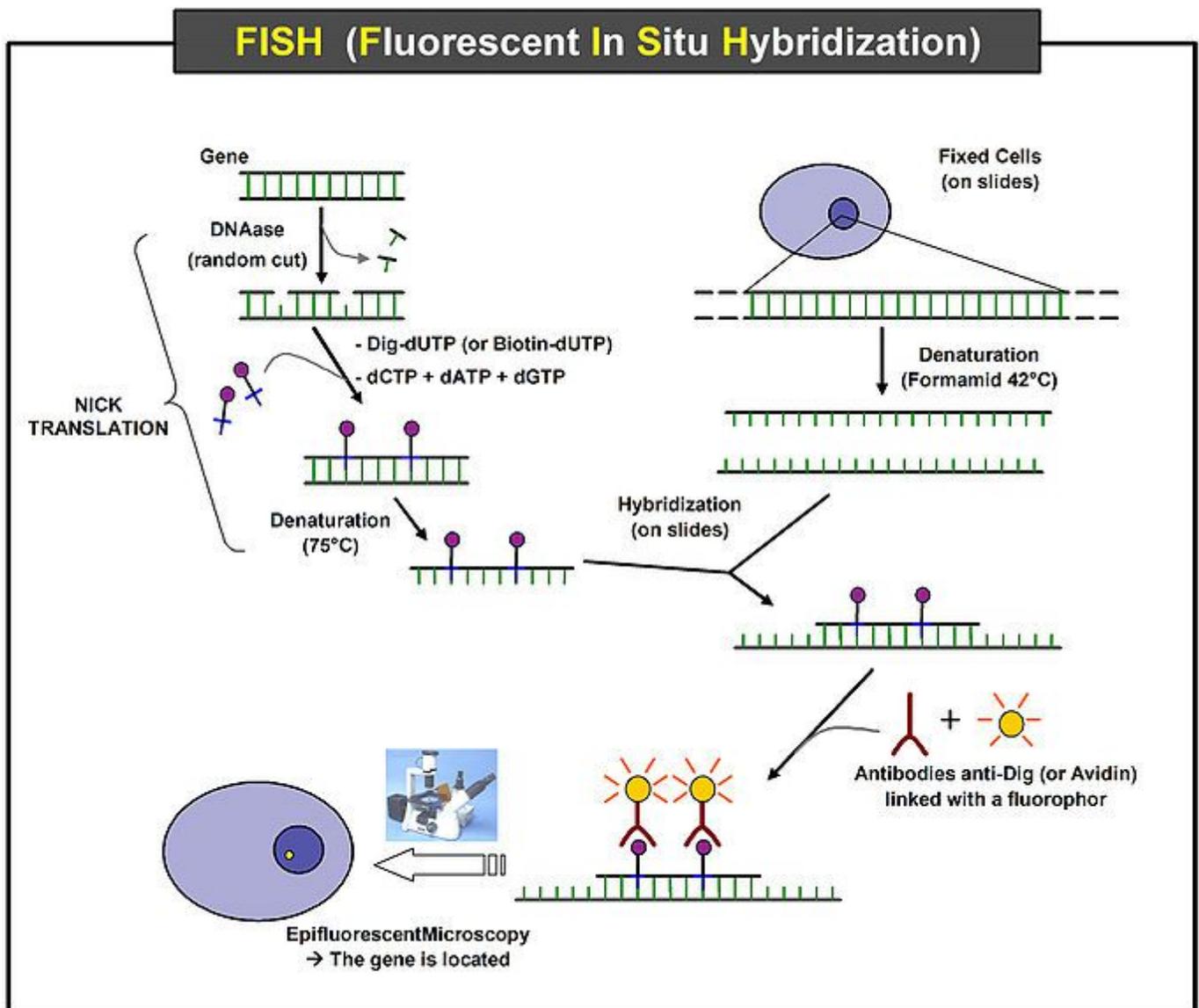


Figure 37 : Étapes de la réalisation de la technique de FISH

Le principe de la technique FISH repose sur les propriétés de dénaturation et de renaturation de la molécule d'ADN. Dans certaines conditions de température, de Ph ou de salinité, les deux brins d'une molécule d'ADN peuvent se séparer (phénomène appelé dénaturation). Une sonde d'acide nucléique contenant une séquence complémentaire au simple brin d'ADN, peut alors former un hybride spécifique avec l'ADN simple brin et s'y réassocier de façon spécifique : étape appelée renaturation ou hybridation (Figure 37).

La sonde est marquée directement ou indirectement avec un ou plusieurs fluorochromes. Différents procédés sont utilisés pour incorporer le fluorochrome dans le fragment d'ADN.

Grâce au microscope à fluorescence on visualise directement sur les chromosomes la localisation de la sonde. Ainsi la technique FISH permettant l'observation de loci sur des métaphases ou des noyaux, d'où le terme *in situ*. L'utilisation de plusieurs fluorochromes ainsi que le développement de système de numérisation des signaux fluorescents ont permis d'hybrider plusieurs sondes de façon concomitante. Actuellement, il est possible d'étudier de façon simultanée plus de 20 loci sur des chromosomes.

Il existe plusieurs types de sondes à ADN :

- Centromérique : permet de mettre en évidence les centromères des chromosomes. Sonde avec séquence répétée satellite.
- Chromosomique : permet de mettre en évidence les chromosomes individuellement par processus "peinture chromosomique".
- Locus/loci particuliers : permet de mettre en évidence un ou plusieurs gènes particuliers (Figure 38)

Les sondes utilisées dans cette étude sont détaillées dans le tableau ci-dessous (Tableau) :

Type de sonde	Localisation chromosomique	Anomalies détectées
TEL/AML1 (ETV6-RUNX1): Double couleurs, Double fusions	12p12 / 21q22	t(12 ;21)
BCR/ ABL : Double couleurs, Double fusions	22q11 / 9q34	t(9 ;22)
MLL : Double couleurs, Break Apart	11q23	t(v ;11q23)
CDKN2A(p16)/CEP9	9p21	del(9)(p23)
MYC : Double couleurs, Break Apart	8q24	t(v ;8q24)
P53 : Séquence unique	17p13	del(17)(p13), aneuploidie
IgH : Double couleurs, Break Apart	14q32	t(14 ;21)

Tableau IV : Types de sondes utilisées

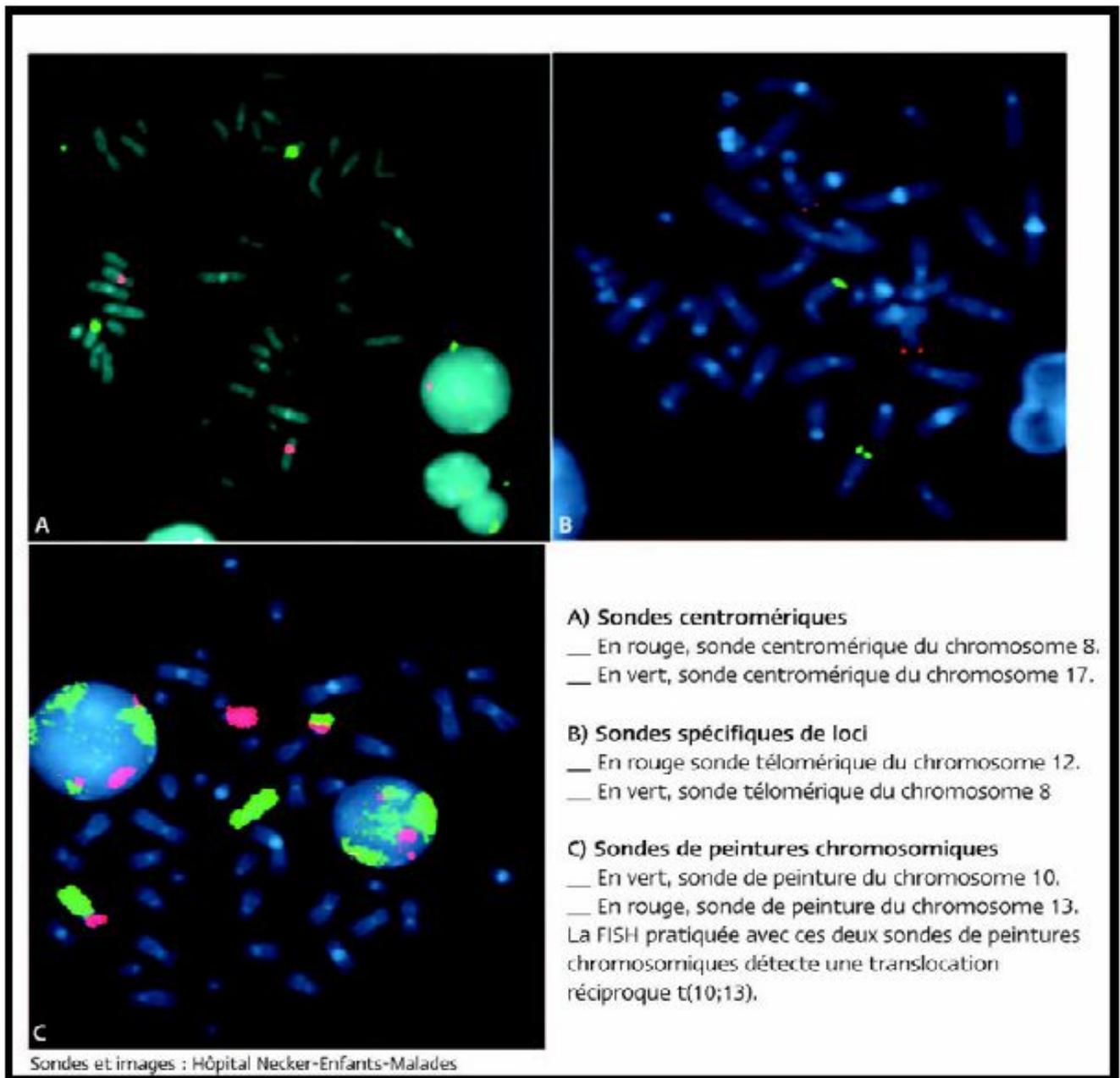


Figure 38 : Les différents types de sondes

RESULTATS

I- ARTICLE N°1:

Cytogenetic profile of Moroccan pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of 155 cases with review of literature

La leucémie lymphoblastique aiguë (LAL) est la tumeur maligne la plus répandue chez les enfants, avec une incidence maximale à l'âge de 2 à 3 ans et représentant près de 30% de tous les cancers de ce groupe d'âge.

Il est bien établi que l'identification des anomalies cytogénétiques est très pertinente pour le pronostic et les décisions thérapeutiques en LAL.

La présente étude rapportée dans cet article a pour objectifs de :

- Etudier les anomalies chromosomiques associées aux leucémies aiguës lymphoblastiques de l'enfant.
- Définir la fréquence des anomalies chromosomiques récurrentes de la LAL chez les patients marocains.
- Comparer la fréquence des anomalies chromosomiques retrouvées aux données de la littérature.
- Définir les valeurs diagnostiques et pronostiques de chaque anomalie.
- Etablir la corrélation entre les différentes anomalies chromosomiques et la classification FAB.
- Etablir les corrélations entre les résultats du caryotype et le pronostic des LAL.
- Rechercher les gènes impliqués dans l'oncogenèse hématologique et comprendre leur mécanisme d'action.

Dans la présente étude nous avons réalisé une étude cytogénétique onco-hématologique de 155 enfants hospitalisés dans le service d'oncologie de l'hôpital d'enfant de Rabat adressés au laboratoire BIOLAB sur une période de 4 ans.

Pour les 155 cas étudiés, nous avons pu rendre un résultat avec succès chez 146 patients : 94%.

Le résultat chez 9 patients (6%) n'était pas informatif pour cette étude en raison du manque de métaphases (insuffisance de l'échantillon de moelle osseuse).

Le caryotype était normal dans 28% des cas, dont 25% appartenait à la lignée B et 3% à la lignée T.

En accord avec les données rapportées dans la littérature, la plupart des patients (56%) de la présente étude étaient âgés de 1 à 5 ans, avec une prédominance masculine et la LAL de type B était le phénotype le plus prépondérant (85%).

Nous avons identifié des anomalies chromosomiques dans 66% du total des cas étudiés. En revanche 44 cas (28%) ont présenté un caryotype normal sans anomalies chromosomiques décelées dans la limite de la résolution du caryotype métaphasique (voir Annexes Fig.1 et Fig.2).

Parmi les remaniements chromosomiques identifiées, 70% ont révélé d'importantes anomalies récurrentes non aléatoires de grande valeur pronostique, telles que

- l'hyperdiploïdie (voir Annexes Fig.3),
- l'hypodiploïdie (voir Annexes Fig.4),
- la t(9;22)(q34;q11) (voir Annexes Fig.5).
- la t(1;19)(q23;p13) (voir Annexes Fig.6);
- la del(6)(q16q23) (voir Annexes Fig.7),
- les anomalies impliquant le réarrangement MLL dont la del(11)(q) et la t(4 ;11) (3%) (voir Annexes Fig.8),;
- la t(8;14) (2%) (voir Annexes Fig.9).
- l'i(9)(q) (2%) (voir Annexes Fig.10);

La fréquence de la plupart des réarrangements chromosomiques identifiés avec succès dans notre étude est en corrélation avec celles rapportées dans publications internationales.

L'hyperdiploïdie de 50 à 60 chromosomes (comprenant généralement gains de 4, 6, 10, 14, 17, 18, 21 et X) est l'anomalie cytogénétique la plus fréquente dans notre étude, conformément aux données rapportées, avec une incidence de 16% du nombre total de cas et de 25% des caryotypes anormaux.

Les fréquences d'autres aberrations chromosomiques ayant une grande valeur pronostique telles que l'hypodiploïdie, la t (9;22)(q34;q11), la t(8;14)(q24;q32) et i(9)(q10) sont également

significativement compatibles avec celles rapportés dans la littérature, avec une incidence de 2%, 5%, 2%, et 2% respectivement.

La fréquence de la $t(1;19)(q23;p13)$ et la $del(6)(q16q23)$, est légèrement plus basse que ce qui a été rapporté dans la littérature avec une incidence de 4% chacune.

Nous avons également mis en évidence deux anomalies chromosomiques avec une valeur pronostique très importante impliquant le réarrangement du gène MLL en 11q23 notamment la $del(11)(q)$ et la $t(4;11)$. Cependant, leur taux d'incidence était significativement faible par rapport aux données de la littérature.

Dans la présente étude, nous avons trouvé $t(12; 21)$ dans 3 cas (2%), qui étaient détecté par cytogénétique moléculaire après identification d'une $del(12p)$ dans le caryotype conventionnel, mettant en évidence le réarrangement ETV6 / RUNX1, l'équivalent moléculaire de $t(12; 21)$.

En théorie, la $t(12;21)(p13;q22)$ est le réarrangement chromosomique le plus fréquent dans les LAL pédiatriques (25 % des LAL-B de l'enfant). Cette différence de fréquence est due au fait que la FISH n'a pas été effectué systématiquement en raison des contraintes financières des patients. En conséquence, pour tous les patients sans translocations spécifiques, nous recommandons l'utilisation d'autres méthodes telles que FISH ou RT-PCR comme techniques complémentaires pour la mise en évidence de ces anomalies cryptiques.

Les résultats de notre étude sont détaillés ci-dessous dans l'article N°1 intitulé : « Cytogenetic profile of Moroccan pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of 155 cases with review of literature ».

Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia, Vol. 18, No. 6, e241-8^a 2018 Elsevier Inc.

Cytogenetic profile of Moroccan pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of 155 cases with review of literature

Z.Takki Chebihi^{a,b*}, A. Belkhat^b, E. Chadli^b, L. Hilal^a, H. Skhoun^a, L. Hessissen^c, M. El Khorassani^c,
M. El Kababri^c, A.Kili^c, M.Khattab^c, Y. Bakri^a, N. Dakka^a

- ^{a.} Laboratory of Human Pathologies Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Mohammed V University, Rabat, Morocco
- ^{b.} BIOLAB Laboratory, Rabat, Morocco
- ^{c.} Department of Pediatric Hemato-Oncology, Children's Hospital of Rabat, Morocco

II- ARTICLE N°2:

The rare translocation t(14;21)(q11;q22) detected in a Moroccan patient with T-cell acute lymphoblastic leukemia

La leucémie lymphoblastique aiguë à cellules T (LAL-T) est une hémopathie maligne relativement rare chez les enfants, représentant 15% des cas de LAL pédiatrique et 25% des LAL adultes.

Les anomalies cytogénétiques les plus récurrentes dans ce groupe sont les translocations impliquant les locus α et δ des récepteurs des cellules T (TCR) en 14q11.2, le locus β en 7q35 et le locus γ en 7p14-15 avec une liste étendue de partenaires. Ces translocations entraînent la surexpression des gènes partenaires, majoritairement des facteurs de transcription notamment HOX11, TAL1, TAL2, LYL1, BHLHB1, LMO1 et LMO2.

Parmi ces réarrangements chromosomiques, la translocation rare : t(14,21) (q11,2; q22) a été décrite dans la LAL-T pédiatrique dans un seul cas jusqu'à présent en 2000.

Elle a été trouvée chez un enfant de 7 ans présentant un nombre élevé de globules blancs et des lymphoblastes positifs pour les antigènes des cellules T et la masse médiastinale supérieure. La patiente a atteint une rémission complète avec une chimiothérapie standard, mais a rechuté et est décédé après 4 mois de traitement.

Dans cet article, nous décrivons les caractéristiques cliniques et cytogénétiques de la t(14; 21) que nous avons identifiée dans un seul cas lors de l'analyse des 70 premiers cas de LAL d'enfants adressés à notre laboratoire par l'hôpital d'enfants de Rabat, représentant 1,4% du total et 2,4% des caryotypes anormaux étudiés.

Le caryotype a été interprété comme suit : 46,XY,t(14; 21)(q11; q22)[22]/46, XY

Nous avons complété ce caryotype par l'analyse FISH qui a été confirmée la t(14;21) dans 17 mitoses sur 20 analysées.

C'était le cas d'un enfant marocain âgé de 13 ans. L'apparition des symptômes remonte à deux mois avec l'installation progressive d'une faiblesse majeure avec une pâleur cutano-muqueuse et une perte de poids, évoluant dans un contexte d'apexie. La cytométrie en flux était positive pour les antigènes des cellules T: cCD3, sCD3 partiel, CD7, CD8, CD34, HLA-DR et TdT. Le patient a été traité par une chimiothérapie standard, mais a récidivé et est décédé après un an et demi de traitement.

The rare translocation t(14;21)(q11;q22) detected in a Moroccan patient with T-cell acute lymphoblastic leukemia

Z. Takki Chebihi^{a,b*}, A. Belkhat^b, E. Chadli^b, L. Hessissen^c, M. El Khorassani^c, M. El Kababri^c, A. Kili^c, M. Khattab^c, Y. Bakri^a, N. Dakka^a

- ^{a.} Laboratory of Human Pathologies Biology, Department of Biology, Faculty of Sciences, Mohammed V University, Rabat, Morocco
- ^{b.} BIOLAB Laboratory, Rabat, Morocco
- ^{c.} Department of Pediatric Hemato-Oncology, Children's Hospital of Rabat, Morocco

DISCUSSION

Les résultats de notre étude fournissent des preuves convaincantes de l'importance de l'analyse cytogénétique dans l'établissement du diagnostic et la prédiction du pronostic de la LAL pédiatrique. Il est bien connu que les anomalies chromosomiques de nombre et de structure ont une valeur pronostique indépendante dans la leucémie aigüe infantile [176].

Par le biais de l'analyse cytogénétique conventionnelle, 66% de nos cas étudiés ont présenté des anomalies chromosomiques, numériques ou de structure, ou les deux. En revanche 44 cas (28%) ont présenté un caryotype normal sans anomalies chromosomiques décelées dans la limite de la résolution du caryotype métaphasique (voir Annexes Fig.1 et Fig.2).

Hyperdiploïdie (51 à 65 chromosomes) : Parmi toutes les anomalies chromosomiques identifiées dans la LAL de l'enfant, l'hyperdiploïdie ($2n > 50$; comprenant habituellement des gains de 4, 6, 10, 14, 17, 18, 21 et X) a été associée au pronostic le plus favorable par rapport aux autres groupes cytogénétiques.

En appliquant l'analyse cytogénétique conventionnelle, une proportion significativement plus grande de patients (25% des caryotypes anormaux) était hyperdiploïde (voir Annexes Fig.3).

Une hyperdiploïdie élevée (chromosomes de 51 à 67) est l'anomalie cytogénétique la plus fréquente rapportée dans la LAL B de l'enfant, survenant dans 25% à 30% des cas, ce qui est similaire à nos résultats [176][177].

L'entité OMS « hyperdiploïdie » correspond à l'hyperdiploïdie élevée, de 51 à 65 chromosomes. Ce nombre modal peut s'étendre jusqu'à 67. En revanche, l'hyperdiploïdie de 47 à 50 chromosomes n'est pas répertoriée par l'OMS car elle est souvent associée à des anomalies de structure et n'a pas de valeur pronostique [178]. Le nombre modal le plus fréquent est à 54-55 chromosomes. Les trisomies observées ne sont pas aléatoires et touchent préférentiellement les chromosomes 4, 6, 10, 14, 17, 18 et 21 ainsi que le chromosome X [179].

Le pronostic associé à cette hyperdiploïdie est très favorable avec, chez l'enfant, un taux de guérison supérieur à 90 %, en particulier si le nombre modal est supérieur ou égal à 54. La sensibilité particulière des blastes de cette entité au méthotrexate (antifolique utilisé dans la chimiothérapie des LAL) est l'une des explications de ce bon pronostic [180].

Il peut exister des anomalies clonales additionnelles (ACA), anomalies de structure au sein d'un caryotype hyperdiploïde : il convient d'éliminer la présence d'un chromosome

Philadelphie, caractéristique de l'entité LAL Ph. En dehors du Ph, la valeur pronostique des ACA n'a pas été démontrée. Toutefois, la présence d'un isochromosome 17q à la rechute a été décrite comme un facteur pronostique défavorable [180].

Dans notre étude, nous avons identifié des ACA dans 8 des 25 cas d'hyperdiploïdie dont : 3 cas avec t(9;22), 2 cas avec trp(1)(q21q32), 1 cas avec t(1;19), 1 cas avec dup(1)(q25q32), et 1 cas avec del(7)(p11).

En revanche, un pronostic mauvais est associé à une diminution du nombre de chromosomes : hypodiploïdie (voir Annexes Fig.4).

L'hypodiploïdie s'applique à tout caryotype comportant moins de 46 chromosomes. Cependant, l'OMS ne considère l'hypodiploïdie qu'à partir de 43 chromosomes car elle est associée à un pronostic très défavorable, alors que l'hypodiploïdie 44-45 chromosomes n'a pas de valeur pronostique, sauf s'il existe une monosomie 7, facteur associé à un pronostic défavorable chez l'enfant [76].

Les cas avec 24 à 28 chromosomes (near haploïdie) auront le pronostic le plus péjoratif en comparaison avec ceux avec <44 chromosomes dans leurs cellules leucémiques [79].

Parmi les cas étudiés, une hypodiploïdie a été observée dans 3 cas (3% des caryotypes anormaux) et une near diploïdie a été observée dans 3 cas (3% des cas anormaux caryotypes), conformément aux données de la littérature (1 à 5 % des patients enfants).

Le mécanisme possible de l'hypodiploïdie et de l'hyperdiploïdie est un domaine de recherche. La cause la plus plausible du gain ou la perte d'un chromosome entier est «une non-disjonction à la mitose».

Il a été postulé que la perte chromosomique étendue dans l'hypodiploïdie peut survenir par le développement d'un caryotype haploïde avec le gain de certains chromosomes ou des pertes multiples par non disjonction [181].

Parmi les anomalies de structure (49% des cas anormaux), les anomalies récurrentes les plus décrites dans les LAL pédiatriques sont :

- la t(9 ;22) était la plus fréquente (5%) (voir Annexes Fig.5), suivie par :
- la del(6)(q16q23) (4%) (voir Annexes Fig.6),
- la t(1;19)(q23 ;p13) (4%) (voir Annexes Fig.7);

- les anomalies impliquant le réarrangement MLL dont la del(11)(q) et la t(4 ;11) (3%) (voir Annexes Fig.8);

- l'i(9)(q) (2%) (voir Annexes Fig.9);

- et la t(8; 14) (2%) (voir Annexes Fig.10).

En corrélation avec les données de la littérature, la t (9;22)(q34 ;q11) a été observée dans 8 cas; à 5% du total des cas. Le phénotype associé, selon le Groupe européen d'immunophénotypage des leucémies (EGIL), est le plus souvent BII (CD10+), avec expression de marqueurs de la lignée myéloïde comme CD13 ou CD33. Cette translocation entraîne la création d'un gène de fusion impliquant le gène BCR sur le chromosome 22 et le gène ABL1 sur le chromosome 9. ABL1 est une enzyme à activité tyrosine kinase ; le réarrangement BCR-ABL1 conduit à une dérégulation de cette activité, qui devient constitutive. Le pronostic était très défavorable avant l'arrivée d'inhibiteurs d'activité tyrosine kinase (ITK) comme l'imatinib, le dasatinib ou le nilotinib qui sont combinés à d'autres chimiothérapies. Le diagnostic cytogénétique et/ou moléculaire doit donc être très rapide (délai maximum 1 semaine) [182]. À noter l'existence très fréquente, dès le diagnostic, d'événements secondaires surajoutés : anomalies chromosomiques additionnelles (ACA) dans 60 % des cas - hyperdiploïdie (qui ne doit pas être confondue avec l'entité LAL hyperdiploïde de bon, duplication du chromosome Ph, trisomie 8, délétions 7p ou 9p, monosomie 7 et, dans 80 % des cas délétion du gène IKZF1(7p12) [183].

Pour nos cas étudiés, tous les 8 patients présentaient des ACA, en plus du chromosome de Philadelphie, telles que l'hyperdiploïdie (3 cas), t (7;11) (q11,2; q13), del (4) (p), del (7)(p), add(17) (p), inv(7)(p14q22), del(19)(p), trisomie 8, monosomie X et le Phi dupliqué.

La translocation t(12;21)(p13;q22) a été signalée comme étant présente chez l'enfant à une fréquence élevée (25 % des LAL-B de l'enfant) conférant un pronostic favorable, avec cependant l'existence de rechutes tardives mais qui répondent bien à la chimiothérapie [184].

Cette translocation est passée très longtemps inaperçue, malgré sa grande fréquence, du fait de son caractère cryptique, c'est-à-dire indétectable par le caryotype. Le diagnostic nécessite donc des techniques moléculaires avancées, soit par FISH, soit par RT-PCR, qui met en évidence la fusion entre les gènes ETV6 (TEL) et RUNX1 (AML1) [184].

La présence d'anomalies cytogénétiques ou moléculaires surajoutées ne modifie pas ce bon pronostic.

Dans la présente étude, nous avons trouvé $t(12; 21)$ dans 3 cas (2%), qui était détectée par cytogénétique moléculaire après identification d'une $del(12p)$ dans le caryotype conventionnel. Cette différence de fréquence est due au fait que la FISH n'a pas été effectué systématiquement en raison des contraintes financières des patients. En conséquence, pour tous les patients sans translocations spécifiques, nous recommandons l'utilisation d'autres méthodes telles que FISH ou RT-PCR comme techniques complémentaires.

Les anomalies impliquant le *remaniement du gène MLL* (mixed lineage leukemia), ont été également observées à une fréquence significativement inférieure à celle reportée dans les données de la littérature pour les mêmes raisons citées ci-dessus (3% des cas).

Le gène MLL est situé dans la bande chromosomique 11q23 impliquant plus de 120 partenaires identifiés jusqu'ici d'où le terme de v (variable) dans la nomenclature OMS de ces translocations : $t(v;11q23)$.

Le partenaire principal de MLL dans les LAL-B est le gène AFF1 (AF4), situé en 4q21 via la translocation $t(4;11)(q21;q23)$ également retrouvée dans notre série [185].

Les autres partenaires fréquents dans les LAL sont MLLT3 (AF9; $t(9;11)(p22;q23)$) et MLLT1 (ENL; $t(11;19)(q23;p13.3)$). Un réarrangement impliquant *MLL* est retrouvé dans 8 % des LAL-B de l'enfant, avec un pic de fréquence chez le nourrisson. Ces LAL ayant un réarrangement *MLL* n'expriment qu'exceptionnellement le marqueur CD10, marqueur très précoce de la différenciation B, démontrant le caractère extrêmement précoce du blocage de la différenciation lymphoïde B. Le pronostic, globalement défavorable, est dépendant de l'âge, et du partenaire du gène MLL en particulier très défavorable chez le nourrisson de moins de 6 mois. MLL code pour une enzyme méthylant l'histone H3 (H3K4), qui se fixe sur l'ADN et conduit ainsi à une activation transcriptionnelle. Les fusions impliquant MLL coupent le gène en deux, séparant le domaine de liaison à l'ADN du domaine enzymatique. Certains partenaires de fusion de MLL (dont AFF1, MLLT3 et MLLT1) participent à la méthylation de l'histone H3 sur un autre acide aminé (H3K79) via le recrutement de hDOT1L. Ces modifications conduisent à une surexpression d'oncogènes comme HOXA9 [186].

Translocation $t(1;19)(q23;p13)$. Cette translocation se trouve sous 2 formes cytogénétiques : soit équilibrée (présence des deux chromosomes dérivés, $t(1;19)(q23;p13)$), soit, le plus souvent, déséquilibrée avec uniquement présence du chromosome dérivé 19 : $(der(19)t(1;19)(q23;p13))$. Elle est retrouvée dans 5 % des LAL de l'enfant et implique dans

90% des cas les gènes *TCF3* (*E2A*) et *PBX1* [187]. Dans ce cas elle est associée à un phénotype pré-B (CD10+, chaîne μ intracytoplasmique) et à un pronostic favorable à intermédiaire avec les protocoles actuels de chimiothérapie, avec un risque préférentiel de rechute dans le système nerveux central. *TCF3* code pour les facteurs de transcription de la famille bHLH, E12 et E47, par épissage alternatif. Ces protéines jouent un rôle essentiel dans le développement des lymphocytes T et B. *PBX1* est un gène de la famille Homeobox jouant un rôle critique dans la myélopoïèse. La fusion *TCF3-PBX1* est une anomalie qualitative qui aboutit à la perte du domaine de liaison à l'ADN, remplacé par celui de PBX1 (homéodomaine) [188]. Le domaine de transactivation de TCF3 est indispensable à la transformation. Les événements secondaires sont principalement constitués par la délétion de *PAX5*, dans 42 % des cas. Dans 10 % des cas, le gène *TCF3* n'est pas réarrangé en FISH, il s'agit alors le plus souvent d'une anomalie de type secondaire dans une LAL avec grande hyperdiploïdie ou t(9;22) [189].

Dans notre série, la translocation t (1; 19) (q23; p13) était présente dans 4% des cas étudiés (6 cas) et était toujours associée à des anomalies chromosomiques telles que l'hyperdiploïdie, i (17) (q), i (9) (q), trp (1) (q21q32) et les trisomies 4 et 8. Cependant, 3 des 6 cas a montré une forme dérivée de cette anomalie récurrente: der (19)t (1; 19).

La présente étude a également démontré des anomalies chromosomiques secondaires non spécifiques de la LAL. Le mécanisme exact à l'origine de ces anomalies dans les cellules leucémiques n'est toujours pas connu. Ces aberrations sont pour la plupart instables, entraînant une perte de matériel génétique, et leur fréquence semble augmenter avec la progression de la maladie. Les anomalies tant numériques que structurelles résultent des erreurs génétiques accumulées lors de la perpétuation répétée de la mitose des cellules leucémiques ou des effets des produits des cellules transformées [190].

CONCLUSION

Les leucémies aigües, sont des hémopathies malignes dues à la prolifération dans la moelle osseuse d'un clone cellulaire immature (blastes) de la lignée lymphoïde pour les leucémies aigües lymphoblastiques (LAL) ou de la lignée myéloïde pour les leucémies aigües myéloblastiques (LAM).

Le diagnostic des LAL ou LAM est fait sur les critères cytologiques et immunologiques et parfois cytogénétiques des blastes.

L'évolution des techniques de la cytogénétique conventionnelle et moléculaire a facilité la caractérisation moléculaire des anomalies chromosomiques présentes dans les leucémies aigües et la compréhension des processus qui les induisent.

Dans notre travail, l'étude cytogénétique des est révélée être un outil de premier choix, vue la haute spécificité existante entre certaines hémopathies malignes, plus particulièrement des leucémies, d'une part, et de certaines anomalies cytogénétiques récurrentes, de nombre ou de structure, d'autre part.

En effet, la cytogénétique est actuellement le facteur pronostique le plus discriminant, prédictif des chances d'obtention d'une RC mais aussi du risque de rechute. Les anomalies clonales acquises détectées dans les cellules blastiques comportent des pertes ou des gains de chromosomes, des translocations chromosomiques aboutissant à la création de gènes de fusion ou à la dérégulation de l'expression de gènes, des délétions (del) ou une inactivation fonctionnelle de gènes suppresseurs de tumeur. La connaissance du caryotype revêt ainsi un intérêt pronostic certain mis en évidence par les différentes études internationales.

La stratification des malades en trois groupes pronostiques basés sur les anomalies cytogénétiques permet de prédire la réponse au traitement et la survie à long terme. On distingue ainsi un groupe de bon pronostic dont la survie est significativement améliorée par une chimiothérapie intensive, un groupe de pronostic défavorable et un groupe intermédiaire hétérogène. Cependant ces groupes ne sont pas des entités fixes. Ainsi, de nouvelles approches, notamment avec la biologie moléculaire, ont permis de mettre en évidence des anomalies moléculaire également prédictives de bon ou mauvais pronostic qui peuvent correspondre ou pas aux groupes pronostics actuellement définis.

Les outils de la cytogénétique moléculaire, de plus en plus performants, sont, ainsi venus s'ajouter aux outils de cytogénétique conventionnelle, et le recours raisonné à cet ensemble de techniques permet aujourd'hui une meilleure compréhension des mécanismes de la

leucémogénèse et, donc, une prise en charge thérapeutique spécifique et ciblée des personnes atteintes de leucémies aigües.

De même, la biologie moléculaire a fait aujourd'hui son entrée dans l'évaluation des leucémies, notamment pour la mise en évidence des translocations cryptiques et l'analyse des échecs du caryotype et surtout son intérêt majeur pour l'évaluation de la maladie résiduelle.

A lumière de ce travail, on voit comme perspectives :

- L'amélioration de la technique du R-banding, surtout en ce qui concerne la reproductibilité.
- L'utilisation de la cytogénétique moléculaire représentée par les techniques de FISH et de CGH, en complément de la cytogénétique conventionnelle pour LAL au-delà des limites imposées par la résolution du banding et de révéler des anomalies cryptiques.
- L'utilisation de la biologie moléculaire, dont essentiellement, la technique de RTPCR qui étudie le produit même de l'anomalie cytogénétique et place donc la détection à un niveau moléculaire.

ANNEXES

Composition du milieu de culture RPMI 1640 [191]

Composants	Poids moléculaire	Concentration (mg/L)	mM
Acides aminés			
Glycine	75.0	10.0	0.13333334
L-Alanine	89.0	8.9	0.099999994
L-Arginine	174.0	200.0	1.1494253
L-Asparagine	132.0	50.0	0.37878788
L-Aspartic acid	133.0	20.0	0.15037593
L-Cystine 2HCl	313.0	65.0	0.20766774
L-Glutamic Acid	147.0	20.0	0.13605443
L-Histidine	155.0	15.0	0.09677419
L-Hydroxyproline	131.0	20.0	0.15267175
L-Isoleucine	131.0	50.0	0.3816794
L-Leucine	131.0	50.0	0.3816794
L-Lysine hydrochloride	146.0	40.0	0.2739726
L-Methionine	149.0	15.0	0.10067114
L-Phenylalanine	165.0	15.0	0.09090909
L-Proline	115.0	20.0	0.17391305
L-Serine	105.0	30.0	0.2857143

Composants	Poids moléculaire	Concentration (mg/L)	mM
L-Threonine	119.0	20.0	0.16806723
L-Tryptophan	204.0	5.0	0.024509804
L-Tyrosine disodium salt	225.0	29.0	0.12888889
L-Valine	117.0	20.0	0.17094018
Vitamins			
Ascorbic Acid phosphate	289.54	2.5	0.008634386
Biotin	244.0	0.2	8.1967213E-4
Choline chloride	140.0	3.0	0.021428572
D-Calcium pantothenate	477.0	0.25	5.24109E-4
Folic Acid	441.0	1.0	0.0022675737
Niacinamide	122.0	1.0	0.008196721
Para-Aminobenzoic Acid	137.0	1.0	0.00729927
Pyridoxine hydrochloride	206.0	1.0	0.004854369
Riboflavin	376.0	0.2	5.319149E-4
Thiamine hydrochloride	337.0	1.0	0.002967359
Vitamin B12	1355.0	0.005	3.690037E-6
i-Inositol	180.0	35.0	0.19444445
Inorganic Salts			

Composants	Poids moléculaire	Concentration (mg/L)	mM
Calcium nitrate (Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O)	236.0	100.0	0.42372882
Magnesium Sulfate (MgSO ₄) (anhyd.)	120.0	48.84	0.407
Potassium Chloride (KCl)	75.0	400.0	5.3333335
Sodium Bicarbonate (NaHCO ₃)	84.0	2000.0	23.809525
Sodium Chloride (NaCl)	58.0	6000.0	103.44827
Sodium Phosphate dibasic (Na ₂ HPO ₄)	142.0	800.0	5.633803
Zinc sulfate (ZnSO ₄ -7H ₂ O)	288.0	0.874	0.0030347223
Proteins			
AlbuMAX® II		400.0	Infinity
Human Transferrin (Holo)		7.5	Infinity
Insulin Recombinant Full Chain		10.0	Infinity
Trace Elements			
Ammonium Metavanadate	116.98	3.0E-4	2.564541E-6
Cupric Sulfate	250.0	0.00125	5.0E-6
Manganous Chloride	198.0	5.0E-5	2.5252524E-7
Sodium Selenite	173.0	0.005	2.8901733E-5
Other Components			
D-Glucose (Dextrose)	180.0	2000.0	11.111111

Composants	Poids moléculaire	Concentration (mg/L)	mM
Ethanolamine	97.54	1.9	0.019479187
Glutathione (reduced)	307.0	1.0	0.0032573289
Phenol Red	376.4	5.0	0.013283741
Sodium Pyruvate	110.0	110.0	1.0

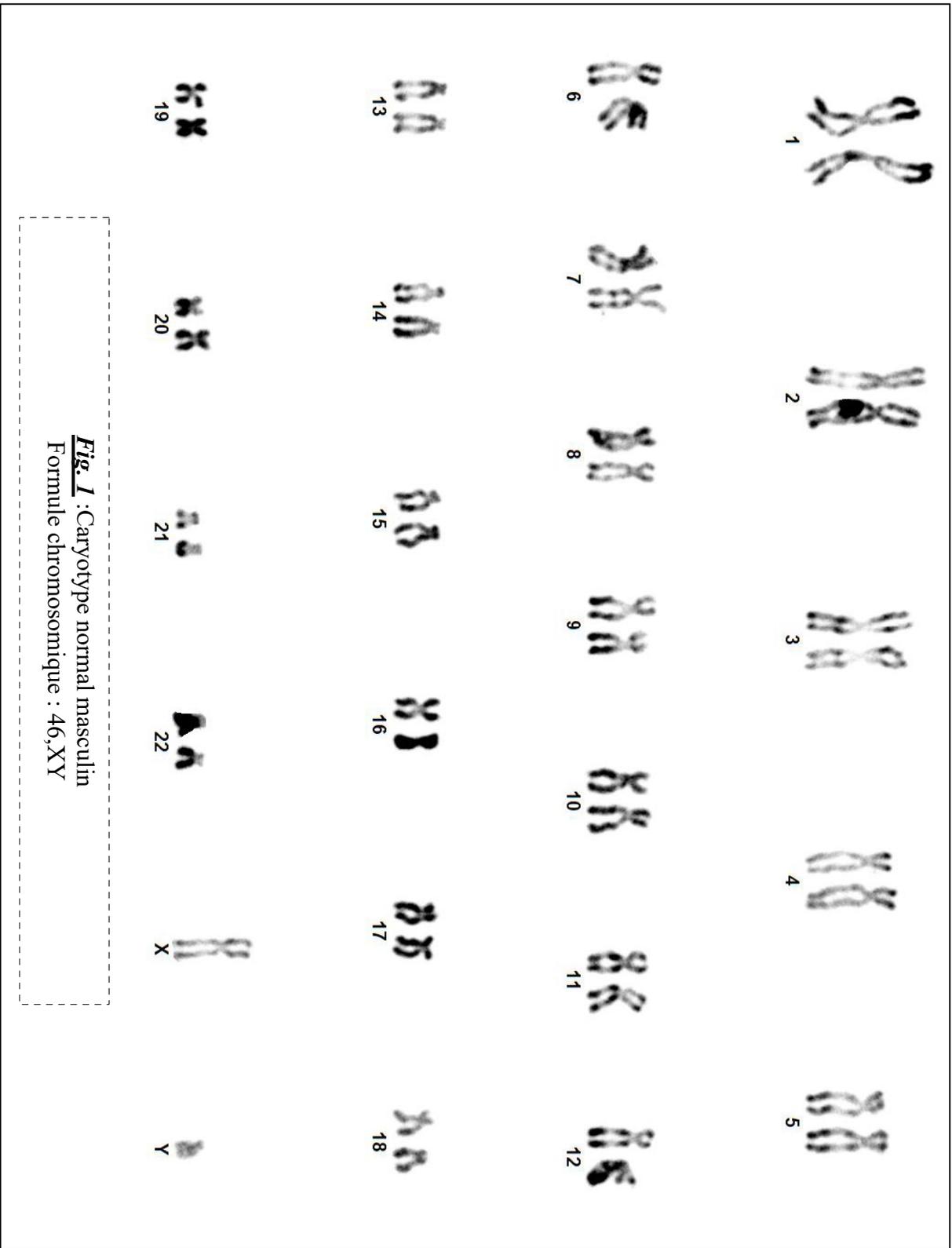


Fig. 1 : Caryotype normal masculin
 Formule chromosomique : 46,XY

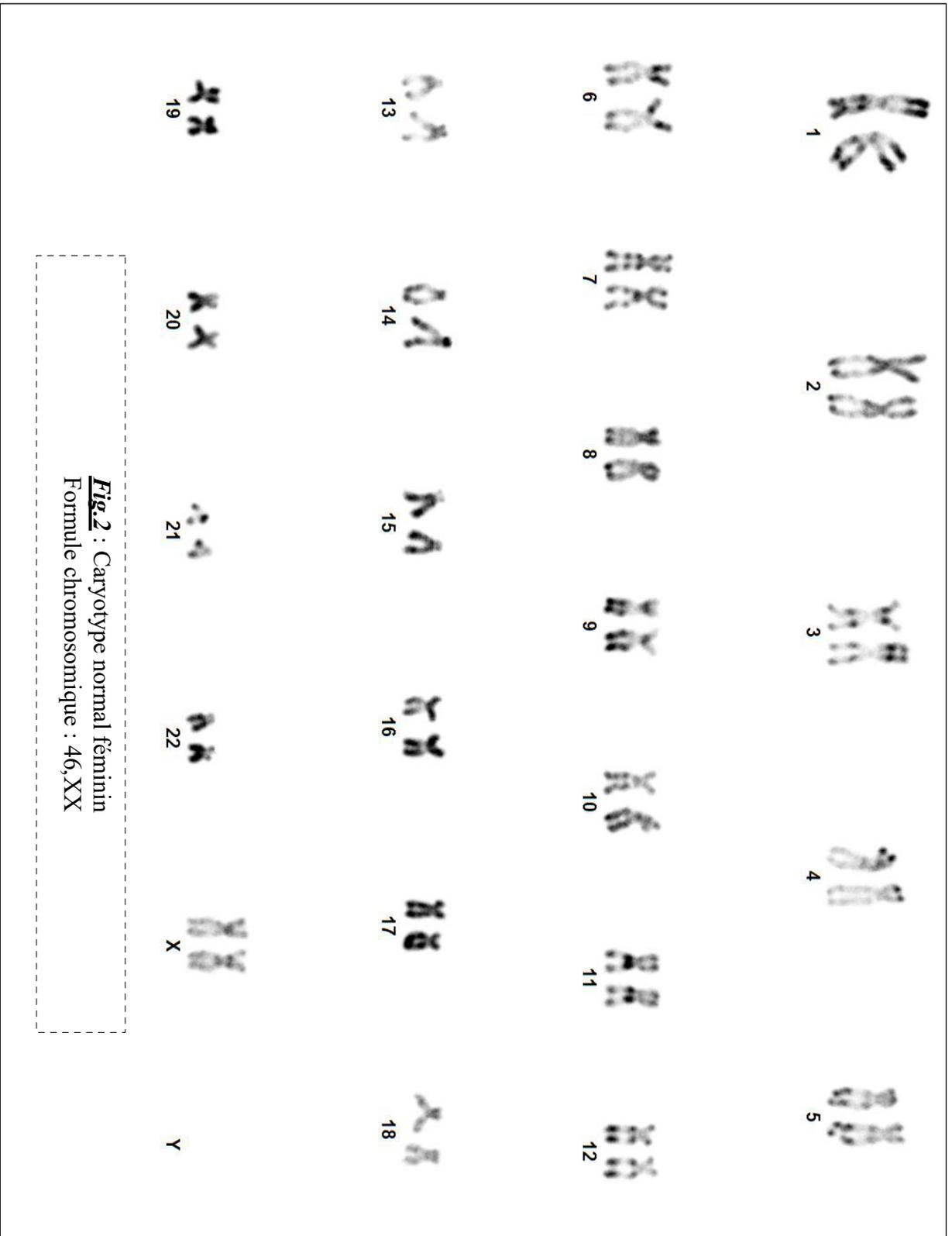


Fig.2 : Caryotype normal féminin
Formule chromosomique : 46,XX

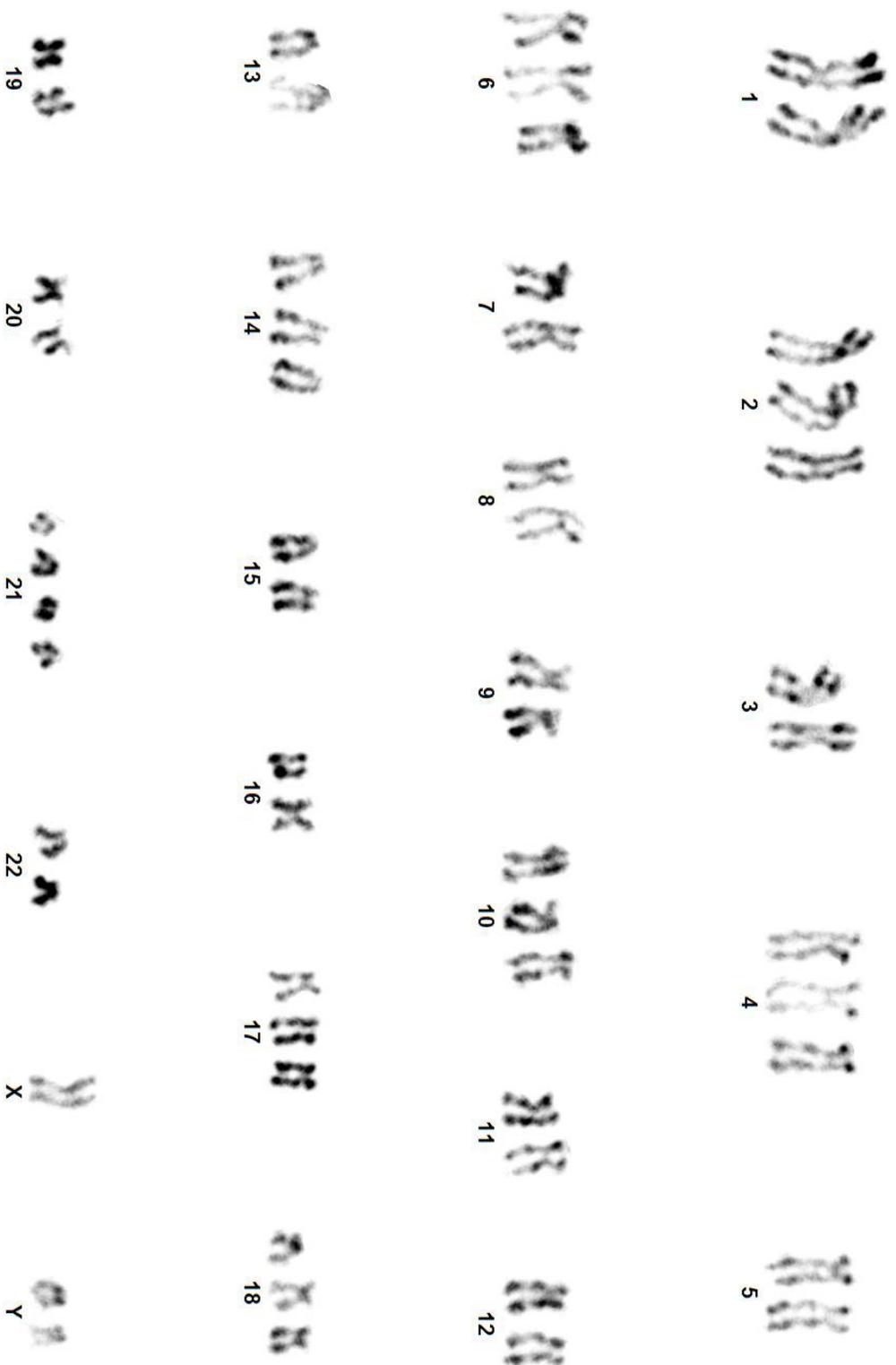
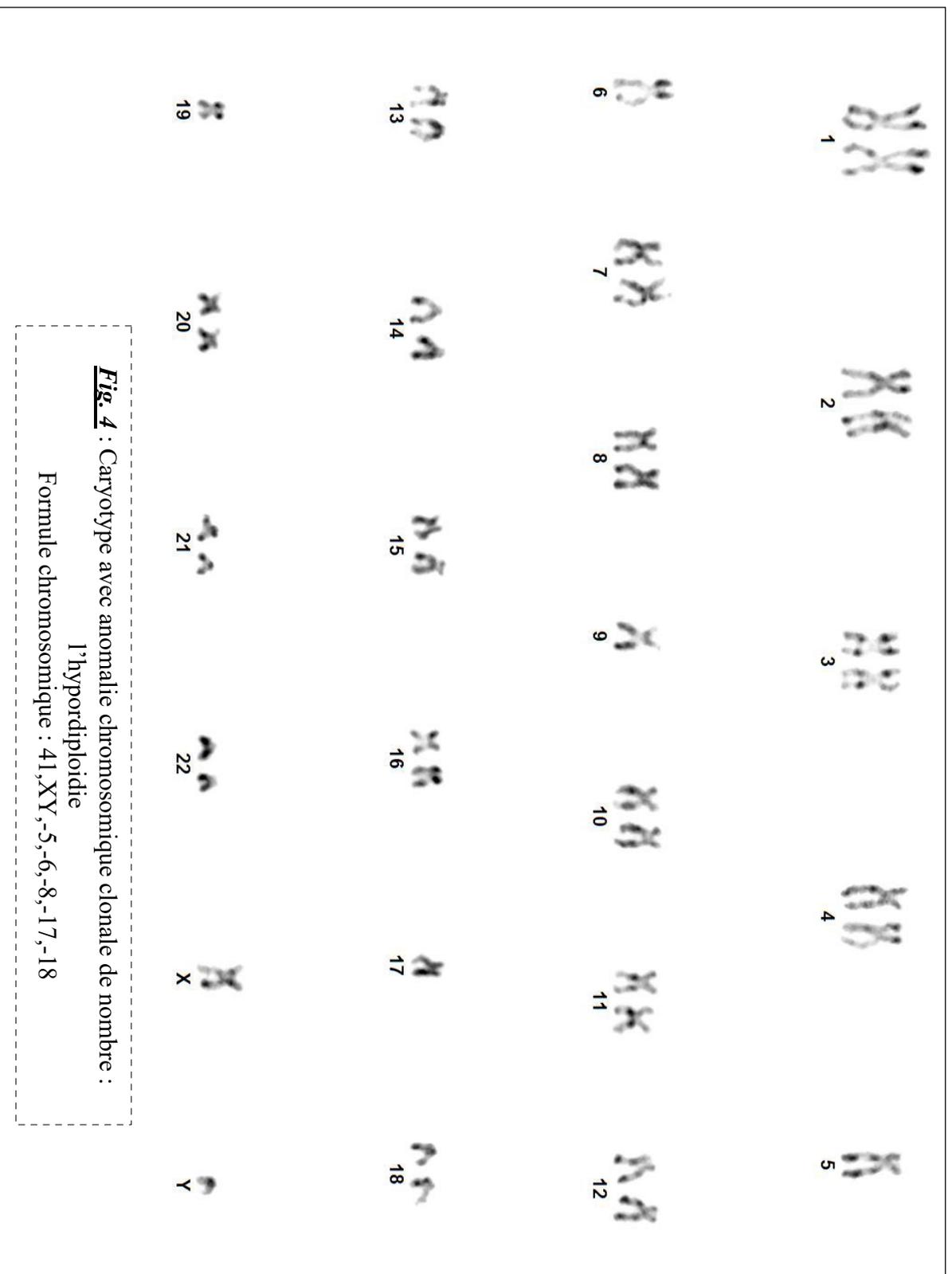


Fig. 3 : Caryotype avec anomalie chromosomique clonale de nombre :
 l'hyperdiploidie

Formule chromosomique : 56,XY,+Y,+2,+4,+6,+10,+14,+17,+18,+21,+21



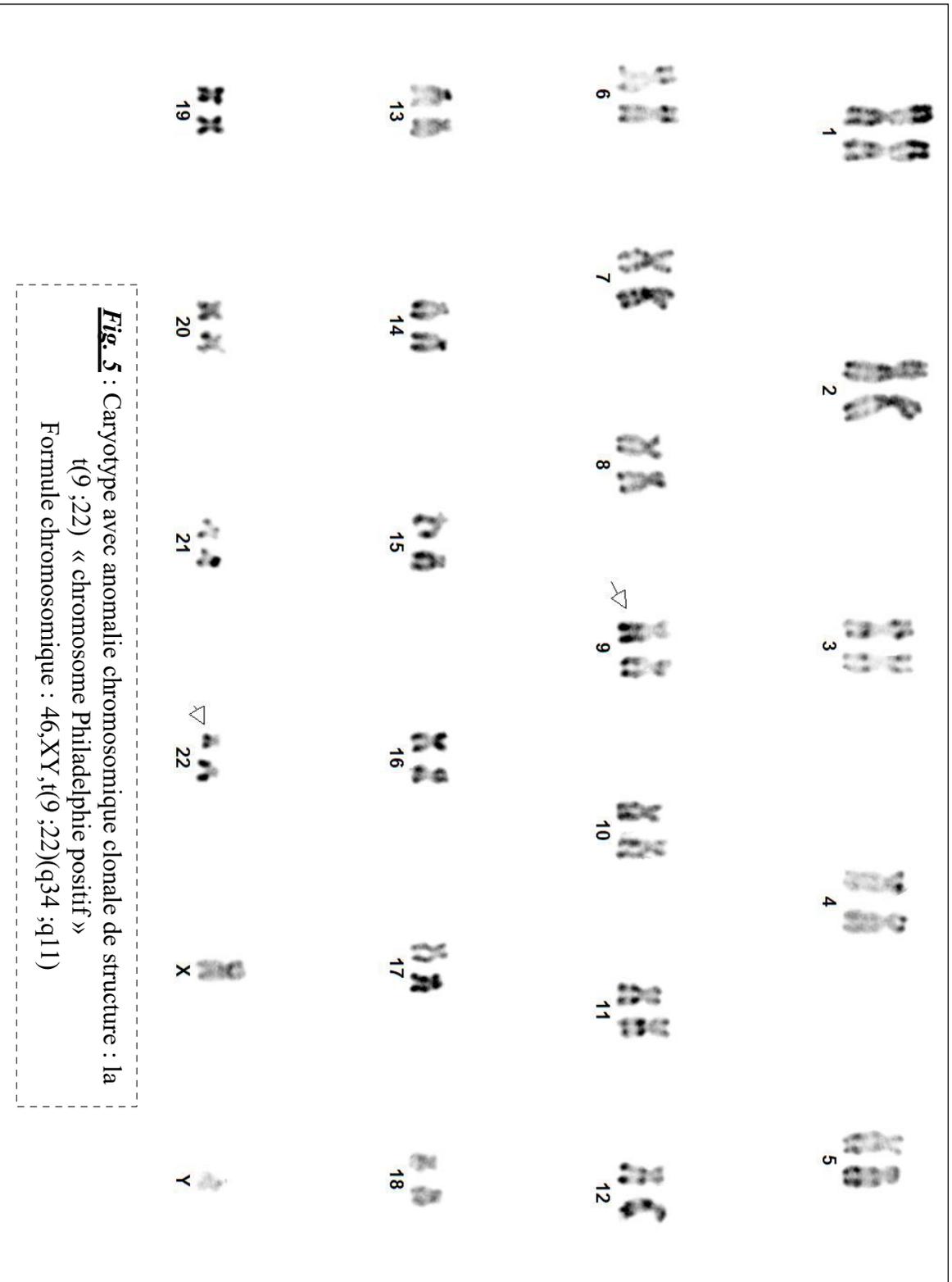


Fig. 5 : Caryotype avec anomalie chromosomique clonale de structure : la $t(9;22)$ « chromosome Philadelphie positif »
 Formule chromosomique : $46,XY,t(9;22)(q34;q11)$

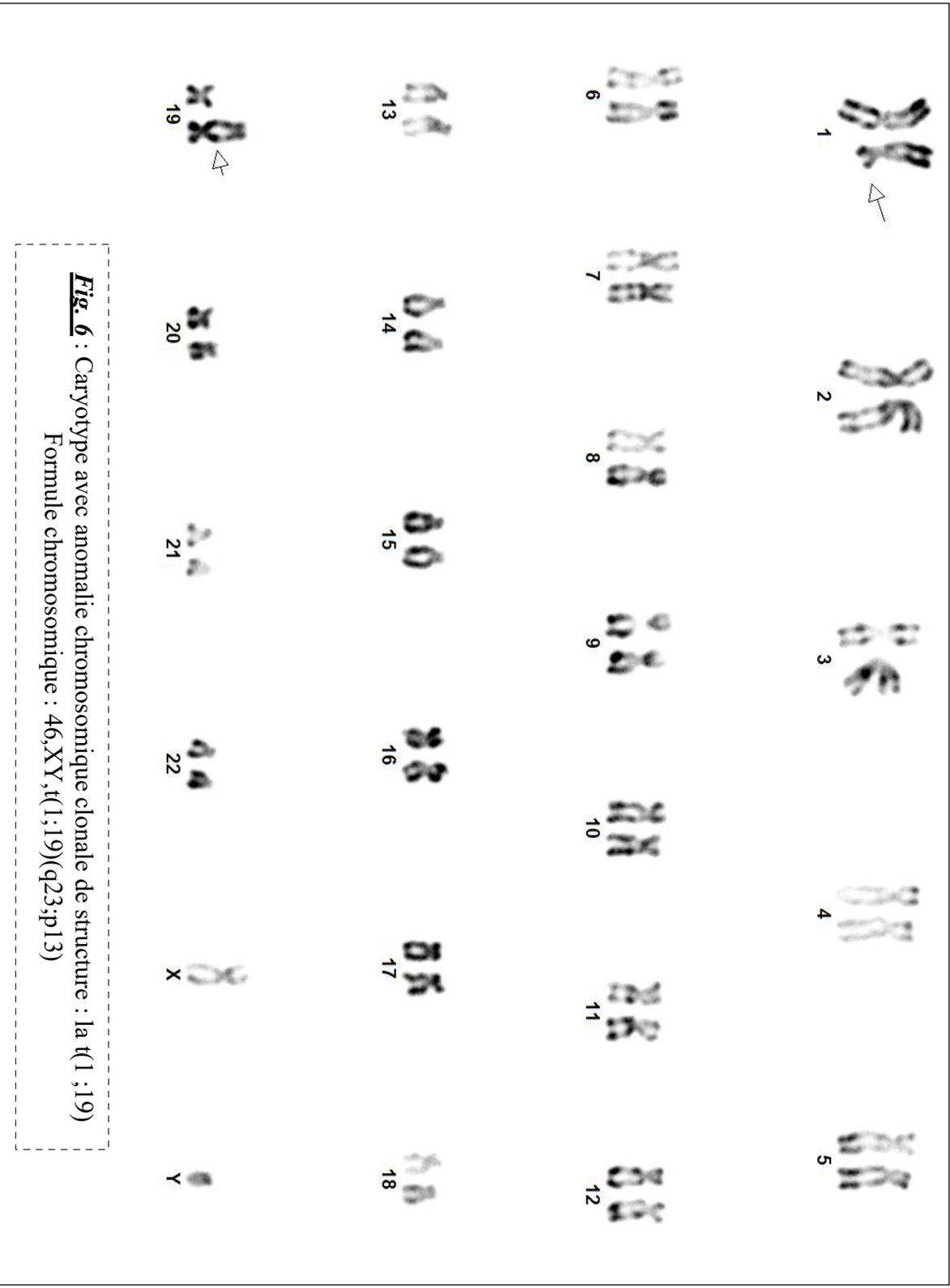


Fig. 6 : Caryotype avec anomalie chromosomique clonale de structure : la t(1 ;19)
 Formule chromosomique : 46,XY,t(1;19)(q23;p13)

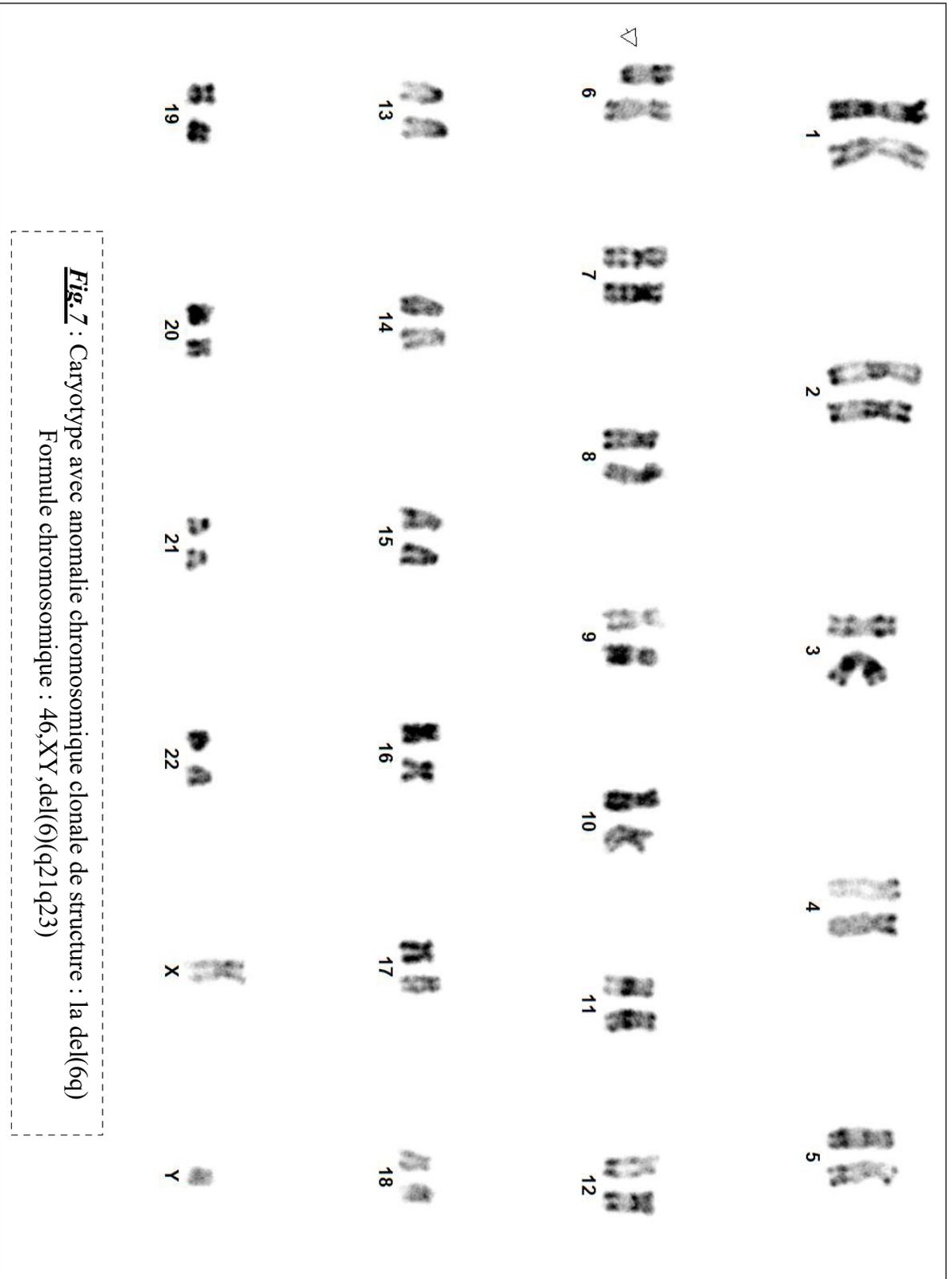


Fig.7 : Caryotype avec anomalie chromosomique clonale de structure : la del(6q)
 Formule chromosomique : 46,XY,del(6)(q21q23)



Fig. 8 : Caryotype avec anomalie chromosomique clonale de structure : la t(4 ;11)
 Formule chromosomique : 46,XX,t(4 ;11)(q21;q23)

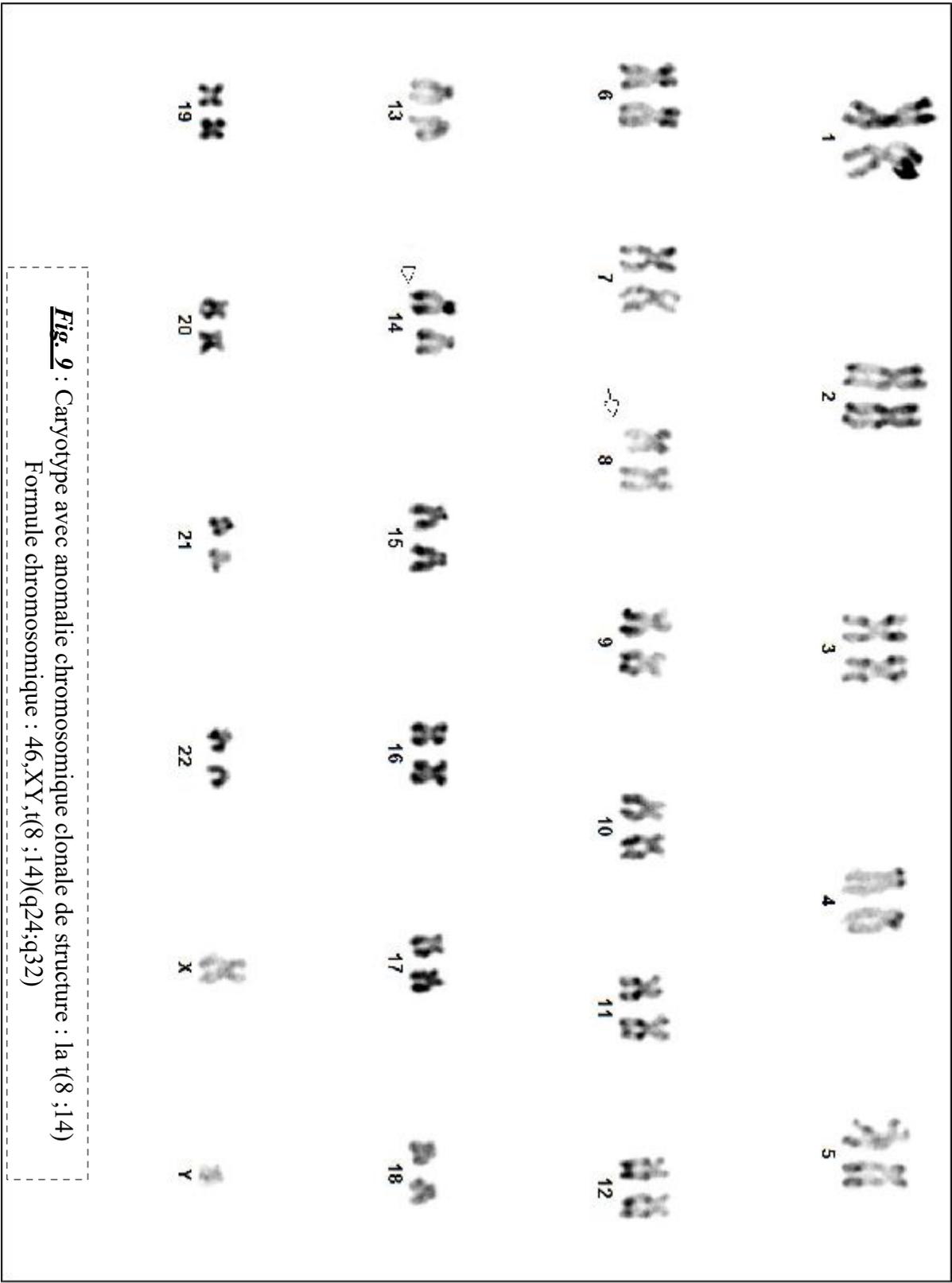


Fig. 9 : Caryotype avec anomalie chromosomique clonale de structure : la t(8 ;14)
 Formule chromosomique : 46,XY,t(8 ;14)(q24;q32)

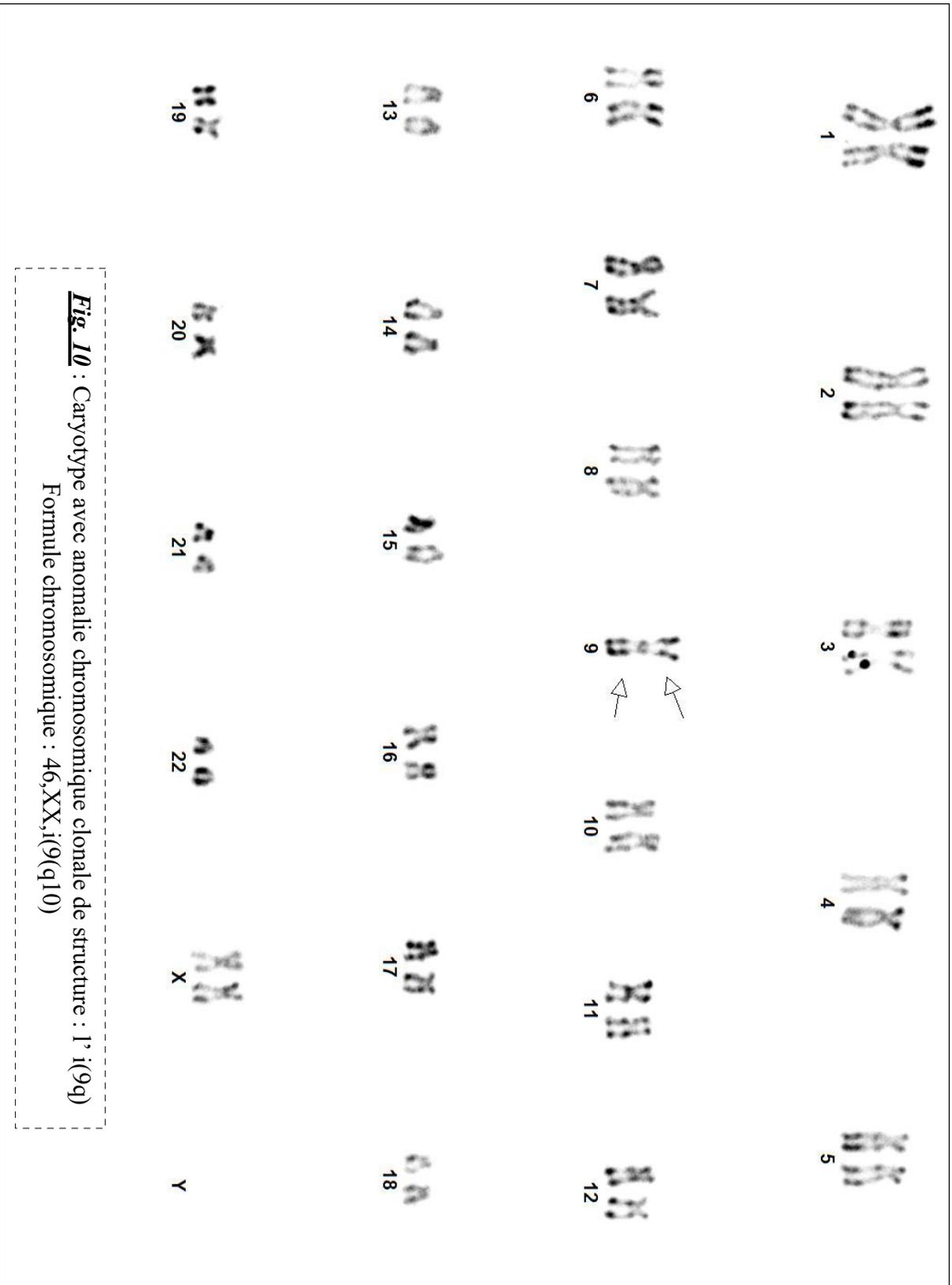


Fig. 10 : Caryotype avec anomalie chromosomique clonale de structure : 1' i(9q)
 Formule chromosomique : 46,XX,i(9(q10))

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Cheung A., Kwong L., Liang R. and col. Stem Cell Model of Hematopoiesis. *Current Stem Cell Research & Therapy*. 2006; 1(3): 305-315.
- [2] Fey MF. Normal and malignant hematopoiesis. *Ann Oncol*. 2007 Jan;18 Suppl 1:i9-i13.
- [3] Lacombe C. D1 – Hématologie 2005 – 2006.
- [4] Pommier Y., Kohn K. Cycle cellulaire et points de contrôle en oncologie : nouvelles cibles thérapeutiques. *Médecine Sciences*. 2003;19(2):173-186
- [5] Orkin S. and Zon L. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology *Cell*. 2008.22; 132(4): 631–644.
- [6] Griffiths A. Analyse génétique moderne. De Boeck Université, 2001.
- [7] Passegué E., Weisman I. Leukemic stem cells: Where do they come from?. *Stem Cell Reviews*. 2005;1(3):181-188
- [8] Lightfoot, T. J. and E. Roman. "Causes of childhood leukaemia and lymphoma. " *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004;199(2): 104-117.
- [9] Piller G. Leukaemia - a brief historical review from ancient times to 1950. *Br J Haematol*. 2001; 112(2):282-92.
- [10] Rigal C. Contribution à l'histoire de la recherche médicale : autour des travaux de Jean Bernard et de ses collaborateurs sur la leucémie aiguë, 1940-1970. 2003
- [11] Bennett J., Catovsky D, Flandrin G, Galton DA and col. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976;33(4):451-8.
- [12] Harif M. Le cancer chez l'enfant : Aspects pratiques. 2012. p41-50
- [13] Pui C-H. Childhood Leukemias. Third edition. 2012. p49, 146-147, 383-392
- [14] Reaman G.H., Smith F.O. Childhood Leukemia: A Practical Handbook. *Pediatric Oncology*. 2011. p30-46
- [15] Morphologic, immunologic, and cytogenetic (MIC) working classification of acute lymphoblastic leukemias. Report of the workshop held in Leuven, Belgium, April 22-23, 1985. First MIC Cooperative Study Group. *Cancer Genet Cytogenet*. 1986;23(3):189-97.
- [16] Jaffe E.S., Harris N.L, Stein H., Vardiman J.W. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. *Ann Oncol*. 2002; 13 (3): 490-491
- [17] Vardiman JW. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chem Biol Interact*. 2010;184(1-2):16-20

- [18] Estey E., Faderl S.H., Kantarjian H.M. Hematologic Malignancies: Acute Leukemias. 2007:119-120
- [19] Tsieh S. Atlas of Hematologic Neoplasms. 2009. p3-7
- [20] VASSE M. Les leucémies aiguës. Université de ROUEN, 2007.
- [21] Bachir F., Bennani S., Lahjouji A, ,Harif M, Khattab M and col. Characterization of Acute Lymphoblastic Leukemia Subtypes in Moroccan Children. Volume 2009 (2009), Article ID 674801.
- [22] Cools J. Identification and characterization of novel oncogenes in chronic eosinophilic leukemia and T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Verh K AcadGeneesk Belg.* 2010;72(1-2):55-70.
- [23] Bartram C.,Schrauder A.,Köhler R, and Schrappe M. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *Dtsch Arztebl Int.* ; 109(40): 652–658.
- [24] Wiemels J. Perspectives on the causes of childhood leukemia. *ChemBiolInteract.* 2012;196(3): 59-67.
- [25] Howard SC, Metzger ML, Pui CH, and col. Childhood cancer epidemiology in low-income countries.*Cancer.* 2008;112(3):461-72.
- [26] Xavier A., Taub J. Acute leukemia in children with Down syndrome. *Haematol.* 2010; 95(7):1043-1045
- [27] Stiller CA. Epidemiology and genetics of childhood cancer.*Oncogene.* 2004;23(38):6429-44.
- [28] Machatschek JN, Schrauder A, Helm F, Schrappe M, Claviez A. Acute lymphoblastic leukemia and Klinefelter syndrome in children: two cases and review of the literature. *Pediatr Hematol Oncol.* 2004 Oct-Nov;21(7):621-6.
- [29] UNSCEAR. United nations scientific comitte on the effects of atomic Radiation. Sources and effects of ionising radiations.200
- [30] Preston DL, Pierce DA, Shimizu Yand col. Effect of recent changes in atomic bomb survivor dosimetry on cancer mortality risk estimates.*Radiat Res.* 2004;162(4):377-89.
- [31] Wakeford R., Little MP. Risk coefficients for childhood cancer after intrauterine irradiation: a review. *Int J Radiat Biol.*2003 ;79(5):293-309.
- [32] Doll R, Wakeford R. Risk of childhood cancer from fetal irradiation.*Br J Radiol.* 1997 Feb; 70:130-9.
- [33] Evrard AS, Hémon D, Billon S, Laurier D, Jouglu E, Tirmarche M, Clavel J. Childhood leukemia incidence and exposure to indoor radon, terrestrial and cosmic gamma radiation.*Health Phys.* 2006;90(6):569-79.
- [34] Reynolds P., Behren J., Gunier R. and col. Childhood cancer and agricultural pesticide use: an ecologic study in California.*Environ Health Perspect.* 2002; 110(3): 319–324.

- [35] Raaschou-Nielsen O, Hertel O, Thomsen BL, Olsen JH. Air pollution from traffic at the residence of children with cancer. *Am J Epidemiol*. 2001;153(5):433-43.
- [36] Knox E. Childhood cancers and atmospheric carcinogens. *J Epidemiol Community Health*. 2005;59:101-105
- [37] Menegaux F, Ripert M, Hémon D, Clavel J. Maternal alcohol and coffee drinking, parental smoking and childhood leukaemia: a French population-based case-control study. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2007;21(4):293-9.
- [38] Chang JS. Parental smoking and childhood leukemia. *Methods Mol Biol*. 2009;472:103-37.
- [39] Kebriaei P., Anastasi J., Larson R. Acute lymphoblastic leukaemia: diagnosis and classification. *Best PractResClinHaematol*. 2002;15(4):597-621.
- [40] Proytcheva M. *Diagnostic Pediatric Hematopathology*. 2011. p179, 345-346
- [41] Bauduer F. Aspects cliniques des leucémies aiguës. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale, Hématologie*, 13-018-G-10, 2002, 8 p.
- [42] Greer J., Foerster J, Rodgers G., Paraskevas F., Glader B., Arber D. and Means R. *Wintrobe's Clinical Hematology*, Volume 1. 2009. p-779
- [43] Berthou C. Leucémie aigue lymphoblastique. Item 162. C35 ECN. 2006.
- [44] Goldman L, Shafer A. *Goldman's Cecil Medicine Cancérologie*. 2013. p73-82
- [45] DeVita V., Lawrance T., Rosenberg S. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. 2008;2:2088-2089
- [46] Andrieu J-M, Colonna P. et Lévy Rafael. *Cancers : Guide pratique d'évaluation de traitement et de surveillance*. 1997. p411
- [47] Morère J-F, Mornex F., Soulière D. *Thérapeutique du cancer*. 2^{ème} Edition. 2011. p134.
- [48] Jmili B., Ben Abdelaziz A., Nagara M., Mahjoub T., Ghannem H. et Kortas M. Aspects cytologiques des leucémies aiguës : à propos de 193 cas colligés dans la région centrale de la Tunisie. *La Revue de Santé de la Méditerranée orientale*. 2004 ;10(4/5).
- [49] Passweg J., Chalandon Y., Matthes T. Les leucémies aiguës. *Rev Med Suisse* 2008;4:1272-1278
- [50] M. Imbert. Place du biologiste dans le diagnostic et le suivi des leucémies aiguës. *Revue Française des Laboratoires*. 2002 (344):67-70
- [51] Moix PA., Favre L., Monti M., Rosselet A. Ponction biopsie médullaire. *Rev Med Suisse*. 2008;4:2337-2342
- [52] Valensi F. Classification des leucémies aiguës. Apport des propositions de l'Organisation mondiale de la santé. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale, Hématologie*, 13-018-G-05, 2003, 7 p.
- [53] Krajcinovic M, Sinnett H, Richer C, Labuda D, Sinnett D. Role of NQO1, MPO and CYP2E1

genetic polymorphisms in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Cancer*. 2002 Jan 10;97(2):230-6.

[54] Feki S, El Omri H, Laatiri MA, Ennabli S, Boukef K, Jenhani F. Contribution of flow cytometry to acute leukemia classification in Tunisia. *Dis Markers*. 2000;16(3-4):131-3.

[55] Dakka N, Bellaoui H, Khattab M. and col. Immunologic profile and outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) in Morocco. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2007;29(8):574-80.

[56] Basso G., Veltroni M., Valsecchi M. and col. Risk of Relapse of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Is Predicted By Flow Cytometric Measurement of Residual Disease on Day 15 Bone Marrow. *Journal of clinical oncology*. 2009 Nov 1;27(31):5168-74.

[57] Mrózek K, Heerema N, Bloomfield C. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev*. 2004;18(2):115-36.

[58] Harrison CJ, Moorman AV, Harris RL, Robinson HM, and col. Interphase molecular cytogenetic screening for chromosomal abnormalities of prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a UK Cancer Cytogenetics Group Study. *Br J Haematol*. 2005;129(4):520-30.

[59] Volpi EV, Bridger JM. FISH glossary: an overview of the fluorescence in situ hybridization technique. *Biotechniques*. 2008;45(4):385-6, 388, 390

[60] Strefford JC, Moorman AV, Harrison CJ and col. Genome complexity in acute lymphoblastic leukemia is revealed by array-based comparative genomic hybridization. *Oncogene*. 2007;26(29):4306-18

[61] Lichter P, Joos S, Bentz M, Lampel S. Comparative genomic hybridization: uses and limitations. *Semin Hematol*. 2000;37(4):348-57.

[62] Cazzaniga G., Biondi A. Molecular monitoring of childhood acute lymphoblastic leukemia using antigen receptor gene rearrangements and quantitative polymerase chain reaction technology. *Haematologica*. 2005;90(3):382-90

[63] Neale GA, Coustan-Smith E, Stow P, Pan Q, Chen X, Pui CH, Campana D. Comparative analysis of flow cytometry and polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2004;18(5):934-8.

[64] Pui CH, Sandlund JT, Pei D, Campana D, and col. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIII B at St Jude Children's Research Hospital. *Blood*. 2004;104(9):2690-6.

[65] Tomlinson D., Kline N. *Pediatric Oncology Nursing: Advanced Clinical Handbook*. 2013. p3-19

[66] Thomas X, Saad H et Fièrè D. Pronostic et traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques de l'adulte. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale, Hématologie*, 13-018-G-40, 2000, 10 p.

- [67] Dahm R. Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Hum Genet.* 2008;122(6):565-81.
- [68] Bignold L., Coghlan B., Jersmann H. David Paul von Hansemann : Contributions to Oncology: Context, Comments and translations. 2007. p57-65
- [69] Rethoré O. Les maladies humaines par aberrations chromosomiques, autosomiques. *Bull. Acad. Natle Chir. Dent.*, 2001, 45-3.
- [70] Passarge E. Color atlas of genetics. Third Edition. 2006. p10-20,336.
- [71] Gersen S., Keagle M. The Principles of Clinical Cytogenetics. Third edition. 2013. p3-8
- [72] Fletcher J. Cytogenetics of Solid Tumors. Translocations in Solid Tumors, 2002.
- [73] Mertelsmann R, Engelhardt M, Berger D, Moreau P. Précis d'hématologie et d'oncologie. 2011.p39-40.
- [74] Reinhard Z., Zwicky C., and col. Leucémies aiguës de l'adulte. *Forum Med Suisse.* 2003;(29/30):684-692
- [75] Harrison CJ, Haas O, Harbott J, and col. Detection of prognostically relevant genetic abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: recommendations from the Biology and Diagnosis Committee of the International Berlin-Frankfurt-Münster study group. *Br J Haematol.* 2010;151(2):132-42.
- [76] Raimondi SC, Pui CH, Shurtleff SA, and col. Reassessment of the prognostic significance of hypodiploidy in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer.* 2003; 98 (12): 2715-22.
- [77] Lafage M., Charrin C. Anomalies cytogénétiques dans les leucémies aiguës lymphoblastiques. *Pathologie Biologie.* 2003;51(6): 329-336
- [78] Stark B, Jeison M, Gobuzov R, and col. Near haploid childhood acute lymphoblastic leukemia masked by hyperdiploid line: detection by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet.* 2001;128(2):108-13.
- [79] Gibbons, B. Near haploid acute lymphoblastic leukaemia. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 1999;3(3):150-150.
- [80] Harrison CJ, Moorman AV, Harris RL, and col. Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* 2004;125(5):552-9.
- [81] Nachman JB, Heerema NA, Sather H, and col. Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2007;110(4):1112-5.
- [82] Mrózek K, Harper DP, Aplan PD. Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2009;23(5):991-1010.

- [83] Gibbons, B. High hyperdiploid acute lymphoblastic leukaemia. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 1999;3(3):145-146.
- [84] Paulsson K, Johansson B. High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 2009;48(8):637-60.
- [85] Sensel MG, Heerema NA, Sather HN, and col. Prognostic impact of trisomies of chromosomes 10, 17, and 5 among children with acute lymphoblastic leukemia and high hyperdiploidy (> 50 chromosomes). *J Clin Oncol.* 2000;18(9):1876-87.
- [86] Sutcliffe MJ, Shuster JJ, Heerema NA and col. High concordance from independent studies by the Children's Cancer Group (CCG) and Pediatric Oncology Group (POG) associating favorable prognosis with combined trisomies 4, 10, and 17 in children with NCI Standard-Risk B-precursor Acute Lymphoblastic Leukemia: a Children's Oncology Group (COG) initiative. *Leukemia.* 2005;19(5):734-40.
- [87] Moorman AV, Richards SM, Harrison CJ, and col. Outcome heterogeneity in childhood high-hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2003;102(8):2756-62.
- [88] Zemanova Z, Michalova K, Sindelarova L, and col. Prognostic value of structural chromosomal rearrangements and small cell clones with high hyperdiploidy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res.* 2005;29(3):273-81.
- [89] Raimondi SC, Pui CH, Zhou Y, and col. Near-triploidy and near-tetraploidy in childhood acute lymphoblastic leukemia: association with B-lineage blast cells carrying the ETV6-RUNX1 fusion, T-lineage immunophenotype, and favorable outcome. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006;169(1):50-7.
- [90] Attarbaschi A, Mann G, König M, and col. Near-tetraploidy in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia is a highly specific feature of ETV6/RUNX1-positive leukemic cases. *Genes Chromosomes Cancer.* 2006;45(6):608-11.
- [91] Kurzrock R, Kantarjian HM, Druker BJ, Talpaz M. Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann Intern Med.* 2003;138(10):819-30.
- [92] Moorman AV, Harrison CJ, Buck GA, and col. Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of cytogenetic data from patients treated on the Medical Research Council (MRC) UKALLXII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 trial. *Blood.* 2007;109(8):3189-97.
- [93] Modi H., Chu S., Bhatia R and col. Role of BCR/ABL gene-expression levels in determining the phenotype and Imatinib sensitivity of transformed human hematopoietic cells. *Blood.* 2007;109(12):5411–5421.
- [94] Aricò M, Camitta B, Schrappe M, Pui CH, and col. Outcome of treatment in children with

Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2000;342(14):998-1006.

[95] Lee HJ, Thompson JE, Wang ES, Wetzler M. Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: current treatment and future perspectives. *Cancer.* 2011;117(8):1583-94.

[96] Huret, JL. t(9;22)(q34;q11) in ALL. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 1997;1(1):26-28.

[97] Behm FG, Raimondi SC, Frestedt JL, and col. Rearrangement of the MLL gene confers a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia, regardless of presenting age. *Blood.* 1996;87(7):2870-7.

[98] Pui CH, Gaynon PS, Boyett JM, and col. Outcome of treatment in childhood acute lymphoblastic leukaemia with rearrangements of the 11q23 chromosomal region. *Lancet.* 2002; 359 (9321): 1909-15.

[99] Pieters R, Schrappe M, De Lorenzo P, and col. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. *Lancet.* 2007;370(9583):240-50.

[100] Pui CH, Chessells JM, Camitta B, and col. Clinical heterogeneity in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 rearrangements. *Leukemia.* 2003;17(4):700-6.

[101] De Braekeleer E., Meyer C., Douet-Guilbert N., and col. Complex and cryptic chromosomal rearrangements involving the MLL gene in acute leukemia: a study of 7 patients and review of the literature. *Blood Cells Mol Dis.* 2010 Apr 15;44(4):268-74.

[102] Al-Rubeai M., Fussenegger M. *Systems Biology. Cell ingeneering* 5. 2007; p39

[103] Rawan Faramand, Samir Dalia. t(4;11)(q21;q23) KMT2A/AFF1. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 2018;22(1):30-33.

[104] Stam RW, Schneider P, de Lorenzo P, Pieters R and col. Gene expression profiling-based dissection of MLL translocated and MLL germline acute lymphoblastic leukemia in infants. *Blood.* 2010;115(14):2835-44.

[105] Cimino G, Cenfra N, Elia L, and col. The therapeutic response and clinical outcome of adults with ALL1(MLL)/AF4 fusion positive acute lymphoblastic leukemia according to the GIMEMA experience. *Haematologica.* 2010;95(5):837-40.

[106] Vey N, Thomas X, Picard C, Charin C and col. Allogeneic stem cell transplantation improves the outcome of adults with t(1;19)/E2A-PBX1 and t(4;11)/MLL-AF4 positive B-cell acute lymphoblastic leukemia: results of the prospective multicenter LALA-94 study. *Leukemia.* 2006;20(12):2155-61.

[107] Professional Guidelines For Clinical Cytogenetics Acute Lymphoblastic Leukaemia v1.00. 2011

- [108] Huret, JL. t(11;19)(q23;p13.3). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. 1999;3(1):34-35.
- [109] Yoo BJ, Nam MH, Sung HJ, and col. A case of therapy-related acute lymphoblastic leukemia with t(11;19)(q23;p13.3) and MLL/MLLT1 gene rearrangement. Korean J Lab Med. 2011;31(1):13-7.
- [110] Elia L, Grammatico S, Paoloni F, Di Raimondo F and col. Clinical outcome and monitoring of minimal residual disease in patients with acute lymphoblastic leukemia expressing the MLL/ENL fusion gene. Am J Hematol. 2011;86(12):993-7.
- [111] Wiemels J., Leonard B., Wang Y., and col. Site-specific translocation and evidence of postnatal origin of the t(1;19) E2A-PBX1 fusion in childhood acute lymphoblastic leukemia. PNAS. 2002;99(23):15101–15106
- [112] Raimondi SC, Behm FG, Pui CH, and col. Cytogenetics of pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia with emphasis on prognostic implications of the t(1;19). J Clin Oncol. 1990;8(8):1380-8.
- [113] Sykes DB, Kamps MP. E2a/Pbx1 induces the rapid proliferation of stem cell factor-dependent murine pro-T cells that cause acute T-lymphoid or myeloid leukemias in mice. Mol Cell Biol. 2004;24(3):1256-69.
- [114] Alonso, CN. t(1;19)(q23;p13) TCF3/PBX1. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. 2013;17(1):45-47.
- [115] Zhang R, Liao J, Li G, Sun HQ, Shi YJ, Yang JY. Real-time quantitative detection of E2A-PBX1 fusion gene in children with acute lymphoblastic leukemia and its clinical application in minimal residual disease monitoring. Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi. 2013;15(6):440-3.
- [116] Huret, JL ; Bernheim, A. t(12;21)(p12;q22). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. 1997;1(1):19-20.
- [117] Zelent A, Greaves M, Enver T. Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia. Oncogene. 2004;23(24):4275-83.
- [118] Al-Bahar S, Zámečníkova A, Pandita R. Frequency and type of chromosomal abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia patients in Kuwait: a six-year retrospective study. Med Princ Pract. 2010;19(3):176-81.
- [119] Sawińska M, Ładoń D. Mechanism, detection and clinical significance of the reciprocal translocation t(12;21)(p12;q22) in the children suffering from acute lymphoblastic leukaemia. Leuk Res. 2004;28(1):35-42.
- [120] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(1):44-84.
- [121] Kantner HP, Warsch W, Delogu A, and col. ETV6/RUNX1 Induces Reactive Oxygen Species and Drives the Accumulation of DNA Damage in B Cells. Neoplasia. 2013;15(11):1292-300.
- [122] Linka Y., Ginzl S., Krüger M., Novosel A., Gombert M., Landgraf P and col. The impact of

TEL-AML1 (ETV6-RUNX1) expression in precursor B cells and implications for leukaemia using three different genome-wide screening methods. *Blood Cancer J.* 2013; 3(10): e151.

[123] Loh ML, Rubnitz JE. TEL/AML1-positive pediatric leukemia: prognostic significance and therapeutic approaches. *Curr Opin Hematol.* 2002;9(4):345-52.

[124] Attarbaschi A, Mann G, König M, and col. Incidence and relevance of secondary chromosome abnormalities in childhood TEL/AML1+ acute lymphoblastic leukemia: an interphase FISH analysis. *Leukemia.* 2004;18(10):1611-6.

[124] Alvarez Y, Coll M., Ortega J., Bastida P and col. Genetic abnormalities associated with the t(12;21) and their impact in the outcome of 56 patients with B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005;162(1):21-9.

[125] Woo HY, Kim DW, Park H, and col. Molecular cytogenetic analysis of gene rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Korean Med Sci.* 2005;20(1):36-41.

[126] Jamil A, Theil K, Kahwash S, Ruymann F, Klopfenstein K. TEL/AML-1 fusion gene, its frequency and prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2000;122(2):73-8.

[128] Robinson HM, Harrison CJ, Moorman AV, Chudoba I, Strefford JC. Intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21) may arise from a breakage-fusion-bridge cycle. *Genes Chromosomes Cancer.* 2007;46(4):318-26.

[129] Strefford J., Van Delft F., Robinson H., and col. Complex genomic alterations and gene expression in acute lymphoblastic leukemia with intrachromosomal amplification of chromosome 21. *Medical Sciences* 2006; 103(21): 8167–8172

[130] Garcia DR, Arancibia AM, Ribeiro RC, Land MG, Silva ML. Intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21) detected by ETV6/RUNX1 FISH screening in childhood acute lymphoblastic leukemia: a case report. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2013;35(5):369-71.

[131] Moorman AV, Robinson HM, Harrison CJ, and col. Prognosis of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21). *Blood.* 2007;109(6):2327-30.

[132] Rand V, Russell LJ, Moorman AV, Strefford JC, Harrison CJ and col. Genomic characterization implicates iAMP21 as a likely primary genetic event in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2011 Jun 23;117(25):6848-55.

[133] Moorman, AV; Harrison, CJ. dup(21q) amplified (RUNX1). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.* 2006;10(2):112-113.

[134] Soulier J, Trakhtenbrot L, Raimondi SC, Raynaud SD, and col. Amplification of band q22 of

chromosome 21, including AML1, in older children with acute lymphoblastic leukemia: an emerging molecular cytogenetic subgroup. *Leukemia*. 2003;17(8):1679-82

[135] Kuriakose P, Perveen N, Maeda K, Wiktor A, Van Dyke DL. Translocation (8;14)(q24;q32) as the sole cytogenetic abnormality in B-cell prolymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2004;150(2):156-8.

[136] Eva van den Berg, Marian Stevens-Kroef. t(8;14)(q24;q32) / t(2;8)(p12;q24) / t(8;22)(q24;q11) Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. 2017;21(2):56-59

[137] Moore S, Suttle J, Bain S, Story C, Rice M. Acute lymphoblastic leukemia characterized by t(8;14)(q11.2;q32). *Cancer Genet Cytogenet*. 2003;141(1):1-4.

[138] Messinger Y., Higgins R., Devidas M., Hunger S., Carroll A. and Heerema N. Pediatric acute lymphoblastic leukemia with a t(8;14)(q11.2;q32): B-cell disease with a high proportion of Down syndrome: a Children's Oncology Group study. *Cancer Genet*. 2012;205(9):453-8.

[139] Goldberg JM, Silverman LB, Levy DE, Dalton VK, Gelber RD, and col. Childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: the Dana-Farber Cancer Institute acute lymphoblastic leukemia consortium experience. *J Clin Oncol*. 2003;21(19):3616-22.

[140] Harrison CJ. Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2009;144(2):147-56.

[141] Cauwelier B, Dastugue N, Cools J, and col. Molecular cytogenetic study of 126 unselected T-ALL cases reveals high incidence of TCRbeta locus rearrangements and putative new T-cell oncogenes. *Leukemia*. 2006;20(7):1238-44.

[142] Pieters R., van Grotel M, Lee C, and col. The cryptic chromosomal deletion del(11)(p12p13) as a new activation mechanism of LMO2 in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2006;108(10):3520-9.

[143] Bilhou-Nabera, C. t(11;14)(p13;q11) - t(7;11)(q35;p13). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. 1999;3(1):22-23.

[144] Schneider NR, Carroll AJ, Shuster JJ, Pullen DJ, and col. New recurring cytogenetic abnormalities and association of blast cell karyotypes with prognosis in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: a pediatric oncology group report of 343 cases. *Blood*. 2000;96(7):2543-9.

[145] Cavé H, Suciú S, Poppe B, Robert A and col. Clinical significance of HOX11L2 expression linked to t(5;14)(q35;q32), of HOX11 expression, and of SIL-TAL fusion in childhood T-cell malignancies: results of EORTC studies 58881 and 58951. *Blood*. 2004;103(2):442-50.

[146] Heim S., Mitelman F. *Cancer Cytogenetics: Chromosomal and Molecular Genetic Abberations of Tumor cells*. Third edition. 2011. p83-140

- [147] Grotel M, Meijerink JP, Pieters R and col. Prognostic significance of molecular-cytogenetic abnormalities in pediatric T-ALL is not explained by immunophenotypic differences. *Leukemia*. 2008;22(1):124-31. Epub 2007 Oct 11.
- [148] Bash RO, Crist WM, Shuster JJ. Clinical features and outcome of T-cell acute lymphoblastic leukemia in childhood with respect to alterations at the TAL1 locus: a Pediatric Oncology Group study. *Blood*. 1993;81(8):2110-2117.
- [149] Tatiana Gindina, Karolien Beel. t(10;14)(q24;q11) TLX1/TRD::t(7;10)(q34;q24) TRB/HOX11. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2018;22(9):388-397.
- [150] Anjali S., Hillard M. *Adult Acute Lymphocytic Leukemia: Biology and Treatment*. 2010. p71
- [151] Ferrando AA, Neuberg DS, Dodge RK, and col. Prognostic importance of TLX1 (HOX11) oncogene expression in adults with T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2004;363(9408):535-6.
- [152] Bergeron J, Clappier E, Radford I, Millien C, Ballerini P and col. Prognostic and oncogenic relevance of TLX1/HOX11 expression level in T-ALLs. *Blood*. 2007;110(7):2324-30.
- [153] Mauvieux L, Leymarie V, Helias C, Falkenrodt A and col. High incidence of Hox11L2 expression in children with T-ALL. *Leukemia*. 2002;16(12):2417-22.
- [154] Berger, R. t(5;14)(q35;q32). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2002;6(4):293-294.
- [155] Hélias C, Leymarie V, Cherif D, Lutz P, Lessard M and col. Translocation t(5;14)(q35;q32) in three cases of childhood T cell acute lymphoblastic leukemia: a new recurring and cryptic abnormality. *Leukemia*. 2002;16(1):7-12.
- [156] Bernard OA, Ballerini P, Mauchauffé M, Lessard M, Berger R and col. A new recurrent and specific cryptic translocation, t(5;14)(q35;q32), is associated with expression of the Hox11L2 gene in T acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2001;15(10):1495-504.
- [157] Ballerini P, Blaise A, Perot C, Pellegrino B, and col. HOX11L2 expression defines a clinical subtype of pediatric T-ALL associated with poor prognosis. *Blood*. 2002;100(3):991-7.
- [158] Karrman K, Forestier E, Heyman M, Blennow E, Heim S and col. Clinical and cytogenetic features of a population-based consecutive series of 285 pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemias: rare T-cell receptor gene rearrangements are associated with poor outcome. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009 Sep;48(9):795-805.
- [159] Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, and col. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell*. 2002;1(2):133-43.
- [160] Tourangeau M., Lemieux N. and Fetni R. Mise en évidence des facteurs cytogénétiques

influençant le pronostic et le choix thérapeutique dans les leucémies aiguës pédiatriques *Medecine Science Amerique*. 2011. Vol 1 N°1.

[161] Hunger SP, Lu X, Devidas M, Camitta BM and col. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. *J ClinOncol*. 2012 May 10;30(14):1663-9.

[162] Ries LAG, Smith MA, Gurney JG and col. Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States SEER Program 1975-1995, National Cancer Institute, SEER Program. No. 99-4649. 1999.

[163] Pieters R, Carroll WL. Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. *PediatrClin North Am*. 2008;55(1):1-20.

[164] Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2006;354(2):166-78.

[165] Seibel NL. Treatment of acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: peaks and pitfalls. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2008:374-80.

[166] Pui C-H, Campana D., Pei D., Bowman W, and col. Treatment of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Without Prophylactic Cranial Irradiation; *N Engl J Med*. 2009 June 25; 360(26): 2730–2741.

[167] Pui C-H., Cheng C., Leung W., and col. Extended follow-up of long-term survivors of childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2003;349(7):640-9

[168] Pui C-H. Toward Optimal Central Nervous System-Directed Treatment in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of clinical oncology*. 2003;21(2):179-181

[169] Huguet F. Leucémies aiguës lymphoblastiques. *Revue hématologique*. 2007;13:38-44.

[170] Mori T, Manabe A, Tsuchida M, Hanada R, Yabe H, Ohara A, Saito T. Allogeneic bone marrow transplantation in first remission rescues children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: Tokyo Children's Cancer Study Group (TCCSG) studies L89-12 and L92-13. *Med Pediatr Oncol*. 2001 Nov;37(5):426-31.

[171] Aricò M., Schrappe M., Hunger S. and col. Clinical outcome of children with newly diagnosed Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia treated between 1995 and 2005. *J Clin Oncol*. 2010;28(31):4755-61.

[172] Schultz K., Bowman W., Aledo A, and col. Improved early event-free survival with Imatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: a children's oncology group study. *J Clin Oncol*. 2009 Nov 1;27(31):5175-81.

[173] Burke MJ, Trotz B, Luo X, and col. Allo-hematopoietic cell transplantation for Ph chromosome-

positive ALL: impact of imatinib on relapse and survival. *Bone Marrow Transplant.* 2009;43(2):107-13.

[174] Nelken B. Leucémies aiguës lymphoblastiques de l'enfant : rechutes médullaires à haut risque. *Hématologie.* 2010 ; 16(2):29-32.

[175] Reismuller B, Attarbaschi A, Peters C, and col. Long-term outcome of initially homogenously treated and relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia in Austrian population-based report of the Austrian Berlin-Frankfurt-Munster (BFM) Study Group. *Br J Haematol* 2009; 144: 559-70.

[176] Whitlock JA, Gaynon PS. Acute lymphoblastic leukemia in children. In: Greer JP, Foerster J, Rodgers GM, et al, eds. *Wintrobe's Clinical Hematology.* 12th ed, vol. 2. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009:1889-910.

[177] Thompson MA. Molecular genetics of acute leukemia. In: Greer JP, Foerster J, Rodgers GM, et al, eds. *Wintrobe's Clinical Hematology.* 12th ed, vol. 2. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008:1791-804.

[178] Pui CH, Robinson LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 2008; 371:1030-43.

[179] Anthony V. Moorman, Sue M. Richards, Mary Martineau, Kan Luk Cheung, Hazel M. Robinson, G. Reza Jalali, Zoe J. Broadfield. Outcome heterogeneity in childhood high-hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2003 ; 102 : 8

[180] Baranger L., Cucuini W., Lefebvre C., Luquet I., Perot C., Radford I., Lafage M. Cytogenetics in the management of children and adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): an update by the Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH). *Annales de Biologie Clinique.* 2016;74:5.

[181] Pederson-Biergaard J, Rowley JD. The balanced and unbalanced chromosome aberrations of acute myeloid leukemia may develop in different ways and may contribute to malignant transformation. *Blood* 1994; 83:80-6.

[182] Rachana Chennamaneni, Sadashivudu Gundeti, Meher Lakshmi Konatam, Stalin Bala, Ashok Kumar, and Lakshmi Srinivas. Impact of cytogenetics on outcomes in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *South Asian J Cancer.* 2018 Oct-Dec; 7(4): 263–266.

[183] Kathrin M. and Stephen P. Current Concepts in Pediatric Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. *Front Oncol.* 2014; 4: 54.

[184] Becker M., Liu K., Tirado CA. The t(12;21)(p13;q22) in Pediatric B-Acute Lymphoblastic Leukemia: An Update. *J Assoc Genet Technol.* 2017;43(3):99-109.

[185] Winters A., Bernt K. MLL-Rearranged Leukemias - An Update on Science and Clinical Approaches *Front Pediatr.* 2017; 5: 4

- [186] Meyer C, Hofmann J, Burmeister T, Groger D, Park TS, Emerenciano M, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia* (2013) 27:2165–76.10.1038/leu.2013.135
- [187] Wafa A., As'sad M., Liehr T., Al Achkar W. Childhood pre-B cell acute lymphoblastic leukemia with translocation t(1;19)(q21.1;p13.3) and two additional chromosomal aberrations involving chromosomes 1, 6, and 13: a case report. *Journal of Medical Case Reports*. 2017, 11:94
- [188] Barber KE, Harrison CJ, Broadfield ZJ, Stewart AR, Wright SL, Martineau M, et al. Molecular cytogenetic characterization of TCF3 (E2A)/19p13.3 rearrangements in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007;46(5):478–86.
- [189] Arico M, Valsecchi MG, Rizzari C. Long-term results of the AIEOP-ALL-95 trial for childhood acute lymphoblastic leukemia: insight on the prognostic value of DNA index in the framework of Berlin-Frankfurt-Muenster based chemotherapy. *J Clin Oncol* 2008; 26:283-9
- [190] Jena RK, Patnaik SC, Nayak S. Secondary chromosomal abnormalities in acute lymphoblastic leukemia. *Caryologia* 2002; 55:349-55.
- [191] <https://www.thermofisher.com/ma/en/home/technical-resources/media-formulation.226.html>

Résumé

La leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) est l'hémopathie maligne la plus fréquente chez l'enfant représentant près de 30% des cancers dans ce groupe d'âge. L'examen cytogénétique tient une place prépondérante dans le bilan biologique des LAL, conjointement à la cytologie, l'immunophénotypage et la biologie moléculaire. Il permet l'établissement du diagnostic, l'évaluation du pronostic et par conséquent l'orientation thérapeutique des LAL.

Nous rapportons dans ce travail les résultats d'une étude rétrospective réalisée au sein du laboratoire d'analyses médicales et de cytogénétique BIOLAB de 155 patients âgés de 1 à 17 ans adressés par l'hôpital d'enfant pour suspicion de LAL sur une période de 4 ans (2012-2016).

Il s'agit pour tous les patients d'une étude cytogénétique conventionnelle qui nous a permis d'identifier des anomalies chromosomiques clonales dans 66% du total des cas étudiés, dont 70% ont révélé une valeur pronostique nous permettant de stratifier les groupes de risques des patients ; ainsi l'hyperdiploïdie et la t(12 ;21), sont associées à un pronostic favorable dans les LAL, par conséquent, une chimiothérapie moins agressive est indiquée. Par contre, l'hypodiploïdie, la t(9 ;22), la t(8 ;14), la t(4 ;11) et les caryotypes complexes appartiennent à une catégorie à haut risque faisant appel à des thérapies plus agressives, basées sur une intensification de la chimiothérapie et le recours à des greffes de cellules de moelle osseuse.

La fréquence de la plupart des réarrangements chromosomiques identifiés dans notre étude est en corrélation avec celles rapportées dans les données publiées dans la littérature.

Mots-clefs : leucémie aiguë lymphoblastique, étude cytogénétique, anomalies chromosomiques, enfants, Maroc.

Abstract

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common malignant hemopathy in children accounting for nearly 30% of all cancers in this age group. Cytogenetic analysis plays a prominent role in the biological assessment of ALL, along with cytology, immunophenotyping, and molecular biology. It allows the establishment of the diagnosis, the evaluation of the prognosis and consequently the therapeutic orientation of ALL.

We report in this work the results of a retrospective study carried out in BIOLAB laboratory of 155 patients aged from 1 to 17 years sent by the children's hospital for ALL suspicion over a period of 4 years (2012-2016).

We performed a conventional cytogenetic study for all patients that allowed us to identify clonal chromosomal abnormalities in 66% of the total studied cases, 70% of which revealed a prognostic value allowing us to stratify risk groups patients ; thus hyperdiploidy and t (12; 21) are associated with a favorable prognosis in ALL, therefore less aggressive chemotherapy is indicated. In contrast, hypodiploidy, t (9; 22), t (8; 14), t (4; 11), and complex karyotypes belong to a high risk category using more aggressive therapies, based on intensification of chemotherapy and the use of bone marrow cell transplants.

The frequency of most of the chromosomal rearrangements identified in our study correlates with those reported in literature data.

Key Words : acute lymphoblastic leukemia, cytogenetic study, chromosomal abnormalities, children, Morocco.