جامعة سيدي محمد بن عبد الله بفاس
UNIVERSITÉ SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH DE FES

كلية العلوم والتقنيات فاس
FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FÈS

Centre d'Etudes Doctorales : Sciences et Techniques de l'Ingénieur

N° d'ordre 38/2021

THESE DE DOCTORAT

Présentée par :

Mlle. HAJAR AZAMI IDRISSI

Discipline : Biomédecine
Spécialité : Génétique et Biologie Moléculaire
Sujet de la thèse :

Détermination et quantification des transcrits BCR-ABL au diagnostic et dans le suivi des patients atteints de la leucémie myéloïde chronique (LMC) et traités par les inhibiteurs de la tyrosine kinase (ITK)

Formation doctorale :

Sciences Médicales et Recherche Translationnelle

Thèse présentée et soutenue le 04 Mai 2021 devant le jury composé de :

Nom Prénom	Titre	Etablissement	
Pr. **Moustapha HIDA**	PES	FMP-Fès	Président
Pr. **Sanae BENNIS**	PES	FMP-Fès	Rapporteur
Pr. **Mariam TAJIR**	Pr Agrégée	FMP-Oujda	Rapporteur
Pr. **Saâd MRANI**	PES	FMP-Rabat	Rapporteur
Pr. **Rhizlane BERRADY**	PES	FMP-Fès	Examinateur
Pr. **Mounia LAKHDAR IDRISSI**	PES	FMP-Fès	Examinateur
Pr. **Laila BOUGUENOUCH**	Pr Agrégée	FMP-Fès	Examinateur
Pr. **Mohammed EL AZAMI EL IDRISSI**	PES	FMP-Fès	Directeur de thèse
Pr. **Karim OULDIM**	PES	FMP-Fès	Directeur de thèse

Laboratoire d'accueil :
Recherche Biomédicale et Translationnelle
Etablissement :
Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès

Résumé

La leucémie myéloïde chronique (LMC), causée par le biomarqueur BCR-ABL, est une maladie constitutivement active, qui présente une incidence de 0,39 à 1,52 de nouveau cas pour 100 000 habitants, cette hémopathie maligne a servi de paradigme pour une application réussie de la thérapie moléculaire ciblée contre le cancer. Le développement de l'inhibiteur de la tyrosine kinase (ITK) imatinib permet aux patients atteints de la LMC d'avoir une espérance de vie presque normale. Cependant, des mutations ponctuelles spécifiques qui diminuent l'affinité de liaison au médicament peuvent entrainer une résistance aux ITK. Par ailleurs les ITK de la deuxième et troisième génération atténuent largement ce problème. La majorité des patients atteints de la LMC en phase chronique, respectant l'observance, parviennent à contrôler la maladie à long terme. En revanche, les réponses au traitement par les ITK sont de courte durée dans les phases avancées de la maladie, avec des rechutes dues à des mécanismes dépendant et indépendant de la kinase BCR-ABL. Les efforts actuels sont concentrés sur l'identification de stratégies thérapeutiques consistant à obtenir des réponses moléculaires plus profondes, permettant aux patients d'interrompre le traitement.

L'objectif de notre thèse est de déterminer le profil génétique des patients marocains atteints de la LMC, ainsi que les facteurs de risque susceptibles de déclencher le développement des cellules leucémiques.

Nous avons pu implanter et intégrer en routine clinique au niveau du service de génétique médicale et d'oncogénétique du CHU Hassan II Fès les méthodes actuelles de diagnostic de la LMC et d'évaluation de la réponse moléculaire au traitement qui sont basées sur la recherche qualitative des transcrits de fusion BCR-ABL par PCR multiplex après transcription inverse, et leur quantification par une technique de PCR quantitative en temps réel (RTq-PCR), ainsi que le séquençage par la méthode de Sanger pour déterminer les mutations de résistance en cernant tout le site actif du domaine tyrosine kinase après avoir effectué une PCR nichée spécifique, aussi bien que la recherche de nouvelles mutations de résistance en explorant le profil génétique des patients marocains.

Dans cette thèse nous avons recruté 123 patients, dont 48% des femmes et 52% des hommes, avec unâge moyen de 50 ans. La phase chronique était le stade dominant, présent chez 84% des individus, la splénomégalie se manifeste chez 50% des malades, la plénitude abdominale chez 25%, asthénie et douleurs abdominales chez 20%, et l'hépatosplénomégalie, la fièvre, et l'anémie surgissent en moyenne chez 15% dans notre population.

A travers cette thèse nous avons pu explorer le profil génétique de la population marocaine touchée par la LMC. Et pour déterminer le type du transcrit BCR-ABL chez les patients LMC porteurs du chromosome Philadelphie, nous avons procédé à l'extraction d'ARN des échantillons sanguins frais, ensuite nous avons converti l'ARN extrait en ADNc qui a servi de matrice pour amplifier 14 types de transcrits BCR-ABL en employant la PCR-Multiplexe. Les résultats obtenus montrent une dominance totale des transcrits b2a2 et b3a2 dans notre population. En effet, 43% des patients exprimaient le transcrit b2a2, 52% des cas portaient le transcrit b3a2, tandis que 5% des sujets ont montré une co-expression des deux transcrits. Ainsi dans le but de déterminer une association probable entre le type de transcrit BCR-ABL et les données hématologiques et cliniques des patients, nous avons réalisé une étude statistique de corrélation qui vise à comparer les variables entre les deux groupes b3a2 et b2a2. Les patients ayant montré une co-expression des deux variants ont été fusionné avec le groupe des patients b3a2

Dans notre étude, 32 %des patients atteints de LMC résistants à l'Imatinib ont montré la présence d'une mutation dans leur domaine tyrosine kinase du gène BCR-ABL.

Le travail présent permet, ainsi, d'approfondir davantage la compréhension de la physiopathologie des biomarqueurs moléculaires étudiés, et contribue à la caractérisation des transcrits de fusion BCR-ABL chez la population marocaine. Ce travail permet également, aux patients concernés, de bénéficier d'un diagnostic moléculaire précis, et d'une prise en charge permettant d'améliorer la qualité de leur prise en charge.

Mots clés : Leucémie myéloïde chronique (LMC), Transcrit de fusion BCR-ABL, PCR multiplex, RTq-PCR, Mutation de résistance, Inhibiteur tyrosine kinase (ITK)

Abstract

Chronic myeloid leukemia (CML), caused by the biomarker BCR-ABL, is a constitutively active disease with an incidence of 0.39 to 1.52 new cases per 100,000 population. This hematological malignancy has served as a paradigm for the successful application of targeted molecular therapy for cancer. The development of the tyrosine kinase inhibitor (TKI) imatinib allows CML patients to have a near-normal life expectancy. However, specific point mutations that decrease the affinity for binding to the drug may lead to resistance to ITKs. Second- and third generation ITKs greatly alleviate this problem. The majority of patients with chronic-phase CML, adhering to adherence, achieve long-term control of the disease. In contrast, responses to ITK therapy are short-lived in the advanced phases of the disease, with relapses due to BCR-ABL kinase-dependent and BCR-ABL-independent mechanisms. Current efforts are focused on the identification of therapeutic strategies to achieve deeper molecular responses, allowing patients to discontinue treatment.

The objective of our thesis is to determine the genetic profile of Moroccan CML patients, as well as the risk factors that may trigger the development of leukemic cells.

We were able to implement and integrate into clinical routine at the Medical Genetics and Oncogenetics Department of the Hassan II Fez University Hospital in Fez the current methods for CML diagnosis and evaluation of the molecular response to treatment which are based on qualitative research of BCR-ABL fusion transcripts by multiplex PCR after reverse transcription, and their quantification by a real-time quantitative PCR technique (RTq-PCR), as well as sequencing by the Sanger method to determine resistance mutations by identifying the entire active site of the tyrosine kinase domain after performing a specific nested PCR, as well as the search for new resistance mutations by exploring the genetic profile of Moroccan patients.

In this thesis we recruited 123 patients, 48% of whom were women and 52% men, with an average age of 50 years. The chronic phase was the dominant stage, present in 84% of individuals, splenomegaly occurred in 50% of patients, abdominal fullness in 25%, asthenia and abdominal pain in 20%, and hepatosplenomegaly, fever, and anemia occurred on average in 15% of our population.

Through this thesis we were able to explore the genetic profile of the Moroccan CML population. To determine the type of BCR-ABL transcript in CML patients with Philadelphia chromosome, we extracted RNA from fresh blood samples, then converted the extracted RNA into cDNA, which served as a template to amplify 14 types of BCR-ABL transcripts using multiplex PCR. The results showed a total dominance of b2a2 and b3a2 transcripts in our population. Indeed, 43% of patients expressed the b2a2 transcript, 52% of cases had the b3a2 transcript, while 5% of subjects showed co-expression of both transcripts. Thus, in order to determine a probable association between the type of BCR-ABL transcript and the hematological and clinical data of the patients, we performed a statistical correlation study comparing the variables between the two groups b3a2 and b2a2. Patients who showed co-expression of the two variants were merged with the b3a2 patient group. In our study, 32% of Imatinib-resistant CML patients showed a mutation in their BCR-ABL tyrosine kinase domain.

This work is furthering our understanding of the pathophysiology of the molecular biomarkers studied and is contributing to the characterization of BCR-ABL fusion transcripts in the Moroccan population. This work also allows the patients concerned to benefit from a precise molecular diagnosis and a treatment that improves the quality of their care.

Key words: Chronic myeloid leukemia (CML), BCR-ABL fusion transcript, multiplex PCR, RTq-PCR, Resistance mutation, Inhibitor tyrosine kinase (ITK)

Dédicace

J'adresse tout d'abord

mes remerciements infinis et ma gratitude absolue à Allah le Tout-Puissant, qui m'a comblé de faveurs.

Je dédie ce travail à tous ceux qui, par leur soutien et leur Compréhension ont permis sa réalisation :

A mon cher père.
Que les portes du Paradis vous soient grandes ouvertes
Je prie le tout-puissant qu'il vous accorde sa sainte miséricorde.

A ma chère mère Mme. Fatima Saffi et mon Oncle Mr. Abdellatif Saffi.
Vous m'avez toujours encouragé, cru en moi, et prié pour mon bonheur et ma réussite. Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour, et la plus grande gratitude et reconnaissance que je ressens pour vous, pour les peines et les sacrifices que vous avez consentis pour mon éducation, ma formation et mon bien-être. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon amour le plus profond et mon affection la plus sincère.

A mes sœurs Aicha, Fadila, Latifa, Olaya et Salma, leurs maris et leurs enfants.

Tous les mots ne sauraient exprimer ma gratitude, mon amour, mon respect et ma reconnaissance.

A mon âme sœur Moulay El Hassane Sidi Ammi, merci d'être apparu dans ma vie.

A ma grande famille.

A mes chers amis.

Remerciements

J'exprime toute ma gratitude aux membres du jury qui ont bien voulu accepter de juger ce travail.

Au Professeur Karim OULDIM

J'adresse mes remerciements particuliers au Pr OULDIM, directeur de l'institut de recherche sur le cancer, et ancien directeur de l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique, pour m'avoir accepté au sein du laboratoire depuis 2014, en tant que stagiaire de Master jusqu'à aujourd'hui en tant que doctorante.

Au Professeur Mohammed EL AZAMI EL IDRISSI

Je ne saurai par les mots à exprimer mon admiration pour vos qualités humaines, votre compétence et votre rigueur scientifique. Vous avez su avec patience me guider dans mes travaux de recherche, par votre disponibilité, votre soutien permanent, votre gentillesse et vos conseils qui m'ont été d'une grande aide. Je vous prie de bien vouloir trouver dans ce travail l'assurance de mon profond respect et le témoignage de ma sincère reconnaissance.

Au Professeur Laila BOUGUENOUCH

Je vous remercie de nous avoir fait l'honneur de participer à ce jury. Je tiens tout particulièrement à vous témoigner ici toute ma reconnaissance à la fois pour votre encadrement et pour votre confiance depuis si longtemps. Tout au long des années passées ensemble, vous m'avez toujours épaulée, poussée dans mes retranchements et guidée. Vos qualités humaines et scientifiques font de vous une personne que l'on ne peut pas oublier. Merci sincèrement pour votre investissement professionnel et personnel à mon égard. Merci d'avoir tout mis en œuvre pour que mon passage dans l'unité se déroule dans des conditions optimales tant sur le plan matériel que sur le plan de l'encadrement. Merci sincèrement pour votre engagement.

Mes remerciements les plus distingués au Professeur ***Mme Rhizlane BERRADY*** *de m'avoir accueilli dans son service et de m'avoir donné l'opportunité de réaliser les prélèvements des patients sur lesquels repose mon travail de thèse. Je la remercie vivement pour ses qualités humaines, pour son soutien consécutif, à travers vous chère professeur je remercie toute l'équipe du service de médecine interne et d'oncohématologie.*

Au Professeur Moustapha HIDA

Je tiens à vous remercier chaleureusement de m'avoir fait l'honneur de Présider le jury de cette thèse. C'est pour moi l'occasion de vous exprimer ma profonde estime et respect.

J'adresse mes remerciements les plus profonds à mes Professeurs ***Mme Sanae BENNIS, Mme Mariam TAJIR, Mr Saad MRANI,*** *et* ***Mme Mounia LAKHDAR IDRISSI.*** *Vous avez accepté d'être rapporteurs de cette thèse et je vous en remercie. Toute ma gratitude pour vos encouragements, vos conseils et vos compétences. Veuillez trouver, dans ce travail, l'expression de mon respect et de mon admiration.*

Si ce travail existe, il doit énormément à ;

Mes chères ***Fatima Zahra Moufid*** *et* ***Ihssane EL BOUCHIKHI****, je tiens à vous adresser ici mes remerciements les plus sincères. Je me considère comme particulièrement chanceuse d'avoir fait votre connaissance, tellement vous êtes des vraies bulles d'air frais à chaque instant ! Durant cette thèse, vous avez été d'une aide plus que précieuse. Vous êtes toujours volontaires et présentes pour aider les gens qu'il s'agisse de travail ou à l'extérieur. J'ai lié avec Vous une relation bien plus que professionnelle, presque fraternelle. Je voudrais vous remercier du fond du cœur pour m'avoir fait confiance.*

Ma chère ***Ilham ARHOUNE****, je ne pourrai écrire des remerciements sans que tu y figures. Ta gentillesse, ta générosité, ta sensibilité, ton sens du travail sont des qualités que j'ai appréciées durant ma thèse et que j'apprécie aujourd'hui au quotidien. Tu es une excellente amie. Au fil des années, tu es devenu une amie fidèle et je t'en remercie vraiment.*

J'aimerai également remercier ma chère ***Ghizlane EL-KOUBAITI,*** *mes collègues (médecins et biologistes) du laboratoire de Génétique Médicale et d'Oncogénétique. Dans le désordre :* ***Ihssane, Hanae, Hanane, Said, Laila, Meriame, Khadija, Oussama, Mohamed, Badreddine, Sara, Ismail,*** *vous avez toujours été bienveillants à mon égard et prêts à m'apporter de l'aide quand j'en avais besoin. Merci d'être des gens passionnés et de transmettre tout ça vigoureusement ! Vos énergies sont contagieuses !*

Merci mes ami(e)s, ***Hasnae CHOUKRI, Siham CHAHBAR, Houda SIDI AMMI, Mohammed ELACHHAB, Asmae AKHANA, Fatima Zohra MOUNIM, Fatiha EL-GZIRI,*** *et* ***Jamal BENDARHOU*** *d'être aussi géniaux et inspirants chacun à leurs façons. Je ne vous ai jamais oublié. Je vous aime.*

Je tiens sincèrement à remercier mes parents et ma famille. Merci d'avoir toujours cru en moi et encouragé inlassablement. Sachez que vous êtes une véritable source d'inspiration au quotidien. Merci pour les sacrifices que vous avez faits pour moi, je vous en suis profondément reconnaissante.

Sommaire

Résumé ..... *II*
Abstract ..... *III*
Dédicace ..... *IV*
Remerciements ..... *V*
Sommaire ..... *VII*
Liste des figures ..... *X*
Liste des tableaux ..... *XII*
Liste des annexes ..... *XIII*
Liste des abréviations ..... *XIV*
Introduction *1*
Revue Bibliographique *1*
1. Généralité : *2*
2. Epidémiologie *3*
3. Leucémie myéloïde chronique (LMC) *7*
3.1 Définition *7*
3.2 Diagnostic clinique et hématologique *10*
3.2.1 Examen clinique *10*
3.2.2 Hémogramme *10*
3.2.3 Myélogramme *11*
3.3 Phases de la LMC *11*
3.4 Classification *13*
3.5 Etiologie *16*
4. Caractérisation Moléculaire des LMC *18*
4.1 Le gène ABL *18*
4.2 Le gène BCR *20*
4.3 Le gène de fusion BCR-ABL *22*
4.3.1 Anatomie moléculaire de la translocation BCR-ABL *22*
4.3.2 Structure de la protéine de fusion BCR-ABL *24*
4.4 Physiopathologie de la LMC *25*
4.4.1 Les conséquences physiopathologiques de la formation de la protéine aberrante BCR-ABL 26
4.4.2 La voie Ras *29*
4.4.3 La voie STAT5 ..... *30*
5. Prise en charge et complications *30*

5.1 Diagnostic cytogénétique et moléculaire 30
5.1.1 Caryotype 30
5.1.2 FISH 32
5.1.3 PCR multiplex 33
5.2 Suivi de la maladie résiduelle 33
5.3 Traitement 36
5.3.1 Avant l'ère des thérapies ciblées 36
5.3.2 L'ère des thérapies ciblées 37
5.3.3 Orientations futures 38
5.4 Résistance au traitement 40
Objectifs de l'étude 45
Matériel et méthode 46
1. Population étudiée 47
2. Caractérisation moléculaire 48
2.1 Extraction d'ARN et contrôle qualité 48
2.2 Reverse transcription 50
2.2.1 L'ADN complémentaire 50
2.2.2 Synthèse de l'ADNc 50
2.2.3 Contrôle qualité de l'ADNc synthétisé 51
2.3 Amplification par PCR multiplexe 51
2.3.1 Conception des amorces 51
2.3.2 Technique de la PCR multiplexe : 52
2.3.2.1 PCR multiplex traditionnelle 52
2.3.2.2 PCR multiplexe par kit 54
2.4 Quantification par PCR quantitative en temps réel 54
2.4.1 RT-PCR quantitative 54
2.4.2 Protocole expérimental de la RTq-PCR 55
2.5 PCR simplexe et Séquençage 59
2.5.1 PCR simplexe 59
2.5.2 Séquençage 61
3. Caractérisation bio-informatique 65
4. Analyse statistique 67
Résultats et discussion 68
Résultats 69
1. Caractérisation épidémiologique de la population LMC étudiée 70
1.1 Caractéristiques démographiques 70

1.2 Caractéristiques cliniques *72*

1.3 Caractéristiques hématologiques *76*

2. Caractérisation du profil génétique des patients atteints de la LMC et corrélation entre le type du transcrit BCR-ABL et les données cliniques et hématologiques *78*

3. Suivi de l'évolution de la maladie résiduelle par quantification des marqueurs moléculaires du gène de fusion *85*

4. Exploration moléculaire des facteurs génétiques responsables de la résistance au traitement ... *89*

Discussion *91*

Conclusion générale et perspectives *101*

Annexes *105*

Références *117*

Liste des figures

Figure 1: *Incidence de la leucémie dans le monde selon GLOBOCAN 2018, a : taux d'incidence de la leucémie chez les hommes standardisé par âge, b : taux d'incidence de la leucémie chez les femmes standardisé par âge(Namayandeh et al. 2020).* *4*
Figure 2: *Taux d'incidence des dix premiers cancers au Maroc standardisé par âge et par sexe selon GLOBOCAN 2018[1](Registry 2020)*..... *5*
Figure 3: *Représentation schématique de la t(9;22)(q34;q11)* *8*
Figure 4: *Photo historique de Peter Nowell et David Hungerford, scientifiques ayant découvert le chromosome Ph(Knutsen 2011)* *9*
Figure 5: *Progression de la leucémie myéloïde chronique (Losson et al. 2020)* *12*
Figure 6: *Gène ABL. Position des deux points de cassure (breakpoints) possibles : au niveau de l'intron séparant les exons Ia et Ib ou entre les exons Ia et a2* *18*
Figure 7: *Structure de la protéine ABL(Deininger et al. 2000)* *19*
Figure 8: *Gène BCR, position des différents points de cassures*..... *20*
Figure 9: *Structure de la protéine BCR(Deininger et al. 2000)*..... *21*
Figure 10: *Les points de rupture dans différentes régions des gènes ABL et BCR entraînent la formation de différents transcrits codant pour la protéine chimérique BCR-ABL. (A) Structure des gènes de la région d'Abelson (ABL) et de la région du groupe de points de rupture (BCR) composées de 11 et 23 exons, respectivement ; (B) Schéma des transcrits ABL (1130 acides aminés), BCR (1271 acides aminés) et des hybrides BCR-ABL. (C) L'ARNm hybride eXaY est produit après que le clivage ait eu lieu après l'exon X du BCR et avant l'exon Y de l'ABL* *23*
Figure 11: *Schéma de l'hématopoïèse : la cellule souche hématopoïétique peu différenciée s'autorenouvèle ou se différencie en cellule spécialisée, ce qui n'est plus le cas des cellules progénitrices* *25*
Figure 12: *Les conséquences de la protéine ABL normal et de la protéine de fusion BCR-ABL*..... *27*
Figure 13: *Les voies de signalisation BCR-ABL activées dans la LMC(Cilloni et al. 2012)*..... *28*
Figure 14: *Caryotype d'un patient atteint de la LMC avec présence du chromosome Philadelphie*... *31*
Figure 15: *Méthode FISH : mise en évidence du réarrangement chromosomique BCR-ABL au niveau du schéma (b) et des photos (c, et d): un point jaune est visible sur la photo, c'est le résultat de la superposition des gènes BCR et ABL sur le chromosome Philadelphie (versus les témoins rouge et vert (a))*..... *32*
Figure 16: *Hydrolyse de sondes (Taqman assay) (a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. (b) À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute. (c) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence(Émile 2004)* *34*
Figure 17: *Structure moléculaire des différents inhibiteurs de la tyrosine kinase (Robert 2011)* *39*
Figure 18: *Résistances dépendantes et indépendantes du BCR-ABL à l'imatinib - CYP3A4 : cytochrome 3A4-(Losson et al. 2020)* *42*
Figure 19: *Substitutions d'acides aminés dans le domaine kinase BCR-ABL identifiées dans des échantillons cliniques provenant de patients déclarés résistants à l'imatinib(Soverini et al. 2011)*..... *43*
Figure 20: *Protocole d'extraction des ARN à partir de sang prélevé dans les tubes "PurLink TM Total RNA Blood Purification Kit"* *49*

Figure 21: Détection précise des standards plasmidiques BCR-ABL. Standards plasmidiques BCR-ABL (SP1-SP6), 10^1, 10^2, 10^3, 10^5, 10^6 copies/5 µL 58
Figure 22: *Le programme des cycles de la purification par ExoSap* 62
Figure 23: *Le programme des cycles de la réaction de séquence* 63
Figure 24: *Applied Biosystems 3500Dx genetic analyzer* 64
Figure 25: *Diagramme des patients concernés par l'étude* 70
Figure 26: *La répartition des deux sexes dans la population* 71
Figure 27: *Diagramme des moyennes d'âge chez les deux sexes* 71
Figure 28: *Diagramme de comparaison des moyennes d'âge selon le sexe* 72
Figure 29: *La répartition des phases de la LMC* 72
Figure 30: *Figure du gel avec - de la gauche à la droite - le marqueur de taille, le gène ABL (gène endogène), Majeur, mineur, micro et nano BCR-ABL* 79
Figure 31: *Répartition des phases de la maladie en fonction du type du transcrit BCR-ABL* 80
Figure 32: *Répartition du sexe en fonction du type de transcrit BCR-ABL* 80
Figure 33: *Comparaison de la moyenne d'âge en fonction de type de transcrit BCR-ABL* 81
Figure 34: *Comparaison du taux moyen des leucocytes en fonction de type de transcrit BCR-ABL* 82
Figure 35: *Moyenne du taux d'hémoglobine selon le type de transcrit BCR-ABL* 82
Figure 36: *Moyenne du taux des plaquettes selon le type de transcrit BCR-ABL* 83
Figure 37: *Moyenne du pourcentage des blastes selon le type de transcrit BCR-ABL* 84
Figure 38: *Résultat de la réaction de PCR quantitative en temps réel (RTq-PCR) sur écran (A gauche : Les courbes d'amplification des échantillons des standards, et des négatifs. A droite : Vue de la plate RNase P avec l'emplacement des différents échantillons standards et négatifs)* 86
Figure 39: *Réponse moléculaire en fonction du type de transcrit BCR-ABL* 87
Figure 40: *Réponse moléculaire en fonction du sexe des patients* 88
Figure 41: *Résultats de l'analyse du séquençage du gène BCR-ABL montrant la présence de la mutation T315I dans le domaine de la kinase ABL* 89
Figure 42: *Résultats de l'analyse du séquençage du gène BCR-ABL montrant la présence de la mutation T315I dans le domaine de la kinase ABL* 90

Liste des tableaux

Tableau 1: *Incidence de la LMC selon dix différents registres et/ou enquêtes de population 7*
Tableau 2: *Organisation mondiale de la santé (OMS) - Classification des NMP 2017(Manivannan et al. 2019) 14*
Tableau 3: *Critères de l'OMS 2017 pour le diagnostic de la PA de la LMC (Manivannan et al. 2019) 15*
Tableau 4: *Concentration des pesticides organochloré (POC) total dans la LMC et la LMA (Attaullah et al. 2018)..... 17*
Tableau 5: *Définitions de la réponse hématologique, cytogénétique et moléculaire dans la LMC (Sorel et al. 2017)..... 40*
Tableau 6: *Les composants du kit de synthèse d'ADNc "SuperScript ® VILO cDNA Synthesis Kit", et la quantité nécessaire pour une réaction 51*
Tableau 7: *Séquences d'amorces utilisées dans la PCR multiplexe pour l'amplification des différents transcrits de fusion BCR-ABL et du gène ABL..... 52*
Tableau 8: *Conditions expérimentales nécessaires pour le protocole d'amplification par PCR multiplexe des gènes BCR-ABL et ABL..... 53*
Tableau 9: *Le programme du thermocycleur nécessaire pour le protocole d'amplification par PCR multiplexe des gènes BCR-ABL et ABL..... 54*
Tableau 10: *TaqMan Gene Expression Assays du gène BCR-ABL et de l'endogène ABL..... 56*
Tableau 11: *Conditions expérimentales nécessaires pour la préparation de la réaction RTq-PCRpour la quantification des gènes BCR-ABL et ABL en temps réel..... 57*
Tableau 12: *Le programme du StepOne™System nécessaire pour le protocole d'amplification par RTq-PCR pour la quantification des gènes BCR-ABL et ABL en temps réel..... 58*
Tableau 13: *Paires d'amorces utilisées pour la PCR nichée..... 60*
Tableau 14: *Protocole d'amplification par PCR du gène ABL 61*
Tableau 15: *Le mélange réactionnel de la purification par ExoSap..... 62*
Tableau 16: *Le mélange réactionnel de la réaction de séquence..... 63*
Tableau 17: *Le mélange réactionnel de la purification du produit de réaction de séquence..... 64*
Tableau 18: *Présentation de l'âge, le sexe, et les symptômes en nombres, et en pourcentage selon la phase de la maladie dans notre population..... 74*
Tableau 19: *Résultats hématologiques de notre étude avec les intervalles des valeurs normales..... 76*
Tableau 20: *Données cliniques et hématologiques fondées sur le type de transcrit BCR-ABL 78*
Tableau 21: *Réponse moléculaire en fonction du type de transcrit BCR-ABL..... 87*
Tableau 22: *Réponse moléculaire en fonction du sexe des patients..... 88*
Tableau 23: *Résultats de l'incidence de 3 types de transcrits de fusion BCR-ABL rapportés dans différents pays des cinq continents (ND : non déclaré)..... 93*

Liste des annexes

Annexe 1: *Carte mondiale présentant le classement national du cancer comme cause de décès à moins de 70 ans en 2015. Le nombre de pays représentés dans chaque groupe de classement est indiqué dans la légende. Source : Organisation mondiale de la santé.* *106*
Annexe 2: *Dix principaux types de cancer pour l'estimation des nouveaux cas de cancer et des décès par sexe, États-Unis, 2018* *107*
Annexe 3: *Hémopathies provoquées par le benzène et tous les produits en renfermant élaboré par l'INRS (Régime général tableau 4)* *108*
Annexe 4: *Formulaire de consentement du patient en arabe et en français et fiche de recueil des données* *111*
Annexe 5: *Approbation du comité d'éthique hospitalo-universitaire Fès* *113*
Annexe 6: *Références des kits et de l'automate du séquençage par Sanger* *114*
Annexe 7: *Tableau des symptômes selon la phase de la LMC présentant le pourcentage de l'âge, le sexe, et les symptômes selon la phase de la maladie chez la population générale* *115*
Annexe 8: *Exemple d'hémogramme ou NFS (Numération Formule Sanguine) d'une patiente atteinte de LMC en phase Chronique, montrant une forte hyperleucocytose* *116*

Liste des abréviations

A
ABL Abelson
ADN Acide désoxyribonucléique
ADNc L'ADN complémentaire
AHR Récepteur Aryl Hydrocarbon
AHS Agricultural Health Study
AKT activation of protein kinase B
AML Leucémie Aigüe Myeloblastique
A-MuLV virus de la leucémie murine d'Abelson
Ang1 Angiotensine 1
AR acide rétinoïque
ARN Acide ribonucléique
ARNm Acide ribonucléique messager
ARNm ARN messager
ATM AtaxiaTélangiectasiaMutated
ATP Adenosine Tri Phosphate
ATRA acide rétinoïque all Trans

B
BAD Biotin Acceptor Domain
BCR Breakpoint cluster region
bFGF basic-Fibroblast Growth Factor
BFU-E Burst Forming Unit- Erythroid
BMP Bone Morphogenic Protein
BP Blast phase

C
CCyR Réponse cytogénétique complète
CD cluster de différenciation
cDNA ADN Complementaire
CFC Colony Forming Cell
CFU-E Colony Forming Unit-Erythroid
CFU-G Colony Forming Unit-Granulocyte
CFU-GEMM Colony Forming Unit-GranuloErythro Macrophage Mégakaryocyte
CFU-GM Colony Forming Unit-GranuloMonocytic
CHR Réponse hématologique complète
CIRC Le Centre international de Recherche sur le Cancer
CMR : réponse moléculaire complète
CRKL Crk like proteine dok
CSH Cellule Souche Hématopoïétique
CSL Cellule souche leucémique

D
DBL Diffuse B-Cell Lymphoma
DD : Domaine de dimérisation
DFS disease-free survival
DH homologue Dbl
DNAg DNA génomique
DO Densitéoptique

E
EFS event-free survival
ELN European leukemia net
EPO Erythropoïétine
ES embryonic stem
ESC cellules souches embryonnaires
ESMO European Society for Medical Oncology
European Society for Medical Oncology ESMO
EUTOS European Treatment and Outcome Study

F
FABD Filament Actin Binding Domain
FDA Food and Drug Administration
FDA Food and Drug Administration Administrationfédérale de l'alimentationet de médicaments
FISH Hybridation in situ fluorescente
FP Forward Primer
FRET fluorescence resonance energy transfer
FU Fluoro-Uracile

G
G-CSF Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GDP Guanidine diphosphate
GFP Green fluorescent protein
GM-CSF Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
Grb2 Growth factor receptor-bound 2
GTP guanidine triphosphate

H
HSCs hematopoietic stem cells
Hyper-CVAD hyperfractionated cyclophosphamide, vincristine, adriamycin (doxorubicin) and dexamethasone

I
IAP Protéine inhibitrice apoptose
IFNα Interferon-alpha
IL Interleukine
IM Imatinib
INSERM Institut national de la santé et de la recherche médicale
IS international scale
ITK Inhibiteur Tyrosine Kinase

J
JAK Janus Kinase

K
kDa kilo Dalton
KLF4 Kruppel-like factor 4

L
LAI leucémie aiguë indifférenciée
LAL Leucémie Aigüe Lymphoïde
LMA Leucémie aiguë myéloïde ;
LBP lymphoid blast phase
LMC LeucémieMyéloïdeChronique
LRP Low Density Lipoprotein
LSCs leukemic stem cells
LT lymphocyte T

M
MAPK Mitogen-Activated Protein
MBP Myeloid blast phase
MgCl2 Magnesium chloride
MMR Réponse moléculaire majeure
MO Moelle osseuse
MR Molecular response
MR Réponse moléculaire ;
MRD Minimal residual disease
MSC Cellule souche mésenchymateuse

N
NLS Nuclear Localization signal
NLT Numération leucocytaire totale
NR Not reported

O
OCT1 Organic cation transporter 1
OCT4 Octamer-binding transcription factor 4
OLI : Domaine d'oligomérisation

P
PA phase accélérée
PB peripheral blood
PBMC Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS Sulfure de plombe
PC phase chronique
PCR polymerasechainreaction
PCR Polymerase Chain Reaction
PCyR réponse cytogénétique partielle
PECAM-1 Platelet endothelial cell adhesion molecule 1
PFS progression-free survival
PFS progression-free survival.
Ph Philadelphia chromosome
PH Pleckstrin-homology
Ph+ Chromosome Philadelphie positif
PHA Phytohémagglutinine
PI3K Phosphatidylinositol-3 Kinase
PKB Protéine Kinase B
PSC Pluripotent Stem Cells
PTC Patched
PTH Parathyroïd Hormone
PTK Protéine tyrosine kinase
PV polyglobulie de Vaquez

R
RCyC : réponse cytogénétique complète
RCyM Réponse cytogénétique majeure
RHC : Réponse hématologique complète
RMM: Réponse moléculaire majeure
RNA Ribonucleic acid
ROS Reactive Oxygen Species
RP : Reverse Primer
RTq-PCR Quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction

S
SAC Société Américaine de Cancer
SCF Stem Cell Factor
SDF-1 Stromal Cell Derived Factor 1
SH Homologie Src
SMD syndrome myélodysplasique
SNP single nucleotide polymorphisms
SOS Son Of Sevenless
SOX2 Sex determining region Y box2
SP Sang périphériques
Srchomology Domaines d'homologie SH
SSC saline-sodium citrate
STAT Signal Transducers and Activators of Transcription
STEV Serine-Thréonine-Glutamine-Valine

T
TE thrombocytémie essentielle ;
TGF-β Transforming Growth Factor β
Tm Melt temperature (température de fusion)

U
UV ultraviolets

W
WBC White Blood Cells (globule blanc)

Introduction

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une hémopathie maligne rare touchant les cellules souches hématopoïétiques (CSH) et appartenant au groupe des néoplasmes myéloprolifératifs chroniques(Danielet al. 2016), dont l'incidence se situe entre 10 et 15 cas pour 100 000 par an sans différence géographique ou ethnique majeure (Andreas Hochhaus 2007). L'âge médian au moment du diagnostic se situe entre 60 et 65 ans en Europe, mais il est considérablement plus bas dans les pays où la population est plus jeune. La prévalence de la LMC augmente régulièrement en raison de la prolongation substantielle de la survie obtenue grâce à un traitement ciblé (Bower et al. 2016). La LMC chez les enfants est rare, la biologie et les stratégies de traitement chez les patients pédiatriques révèlent des aspects spécifiques (Hijiya et al. 2016).

Le traitement par les inhibiteurs de la tyrosine kinase (ITK) dans la LMC est un superbe exemple de thérapie ciblée(Hossein et al. 2017), et l'utilisation de la surveillance de la maladie résiduelle pour déterminer l'efficacité clinique est un modèle pour toutes les tumeurs malignes(Dine et al. 2013).

Le diagnostic moléculaire est devenu essentiel dans la prise en charge des patients atteints de la LMC pour aider à prédire les résultats et à orienter les décisions thérapeutiques(Tong et al. 2018). La PCR quantitative en temps réel (RTq-PCR) est une méthode permettant actuellement d'atteindre des niveaux de sensibilité informatifs, et trouve une place croissante dans la prise en charge de la leucémie myéloïde chronique et la quantification de la maladie résiduelle.

Le séquençage de sa part est un outil très fort pour la détection des mutations de résistance aux ITK au niveau du domaine tyrosine kinase sur le gène ABL du biomarqueur BCR-ABL(Baccarani et al. 2019).

En outre, la récente prise de conscience que certains patients dont la charge de morbidité est faible ou nulle peuvent interrompre leur traitement et ne pas rechuter par la suite a conduit à chercher des moyens de prédire quels patients peuvent ou non se voir proposer l'interruption de leur traitement. Le "fruit le plus prometteur" de ces recherches est la mise au point de tests plus sensibles, grâce aux progrès réalisés dans le séquençage haut débit et les méthodes de PCR numérique.

La détermination du variant BCR-ABL, la prédiction de la thérapie appropriée, et la surveillance de la réponse au traitement, constituent des préoccupations extrêmement importantes pour la communauté scientifique internationale. Elles permettent, premièrement, la compréhension de la physiopathologie de la maladie, deuxièmement, chaque axe constitue, une étape de base pour toute recherche scientifique visant à développer des thérapies ciblées plus efficaces.

Les intérêts de telles études se reflètent également sur le côté socio-économique. Ainsi, sur le plan individuel, le patient pourrait bénéficier d'une surveillance moléculaire de sa maladie résiduelle et d'une prise en charge adéquate aboutissant à l'amélioration de sa qualité de vie. Alors que sur le plan de la société, les coûts de prise en charge des sujets atteints pourraient être réduits par l'identification et l'administration de la thérapie ciblée correcte.

Hélas, au Maroc les outils de diagnostic moléculaire que nous avons décrits dans cette thèse ne sont pas couramment utilisés, y compris la RTq-PCR effectuée par quelques laboratoires à Rabat, et Casablanca, et le séquençage des mutations de résistance aux ITK qui n'est pas disponible comme test de routine dans les laboratoires.

Par la même occasion, nous avons estimé intéressant d'étudier les facteurs de risque impliqués dans la manifestation ou la prédisposition de la LMC dans la population Marocaine.

Nous avons pareillement estimé important de comparer, dans un second lieu, les taux mutationnels obtenus dans notre étude avec ceux des populations internationales. Ce qui permettrait de déterminer le profil génétique des patients marocains atteints de la LMC par la recherche des biomarqueurs habituelles, rares et de nouveaux biomarqueurs, en vue de confirmer le diagnostic et proposer une thérapie ciblée.

Nous nous sommes, également, intéressés à la recherche de corrélations entre le type du transcrit BCR-ABL et les données cliniques et hématologiques des patients étudiés, dans une tentative de prédire la réponse au traitement en se basant sur le type du transcrit de fusion chez la population marocaine. Nous avons aussi estimé pertinent de suivre l'évolution de la réponse au traitement de la maladie résiduelle via la quantification des marqueurs moléculaires du gène de fusion.

Ainsi, nous avons initié la détermination des facteurs génétiques responsables de la résistance au traitement dans le cadre d'un mini-projet intitulé « Détection des mutations du

domaine tyrosine kinase du gène ABL chez les patients résistants aux ITK », qui est financé par l'Institut de Recherche sur le Cancer (IRC), en vue de personnaliser la thérapie chez nos patients.

Dans la perspective de réaliser ce travail, nous nous sommes servis de différents outils de biologie moléculaire, tels que l'extraction d'ARN, la réverse transcription d'ARN en ADN complémentaire (ADNc), et le séquençage de Sanger. Pour évaluer les résultats de la biologie moléculaire, nous avons utilisé les outils de bio-informatique, notamment l'alignement de séquences Blast. Alors que pour la comparaison de nos résultats avec les différentes études internationales, nous nous sommes servis de différents outils de statistiques, notamment, les tests de comparaison des moyennes et fréquences, chi carré et test de student.

Cette étude permettrait, ainsi, de contribuer significativement à la recherche dans le volet moléculaire et la détermination du profil génétique de la cohorte atteinte d'une hémopathie maligne typique qui est la LMC au Maroc, et qui est jusqu'alors très en retard par rapport aux pays développés.

Revue Bibliographique

1. Généralité :

Notre corps est composé de plusieurs millions de cellules minuscules, chacune étant une unité vivante autonome. Normalement, chaque cellule coordonne avec les autres qui composent les tissus et les organes de notre corps. L'une des façons dont cette coordination se produit, se reflète dans la façon dont nos cellules se reproduisent. Les cellules normales du corps se divisent pendant un certain temps, puis cessent de se développer. Par la suite, elles ne se reproduisent qu'en cas de nécessité pour remplacer des cellules défectueuses ou mourantes. Le cancer survient lorsque ce processus de reproduction cellulaire devient incontrôlable. Ce qui nous permet de déterminer le cancer comme maladie caractérisée par une division cellulaire incontrôlée, non coordonnée et indésirable. Contrairement aux cellules normales, les cellules cancéreuses continuent de croître et de se diviser pendant toute leur vie, générant des cellules de plus en plus nocives(DeSantis et al. 2019).

Le cancer constitue un problème majeur de santé publique à l'origine de 8,8 millions de décès en 2015(Chen et al. 2016)(Annexe 1). Près d'un décès sur 6 dans le monde est dû au cancer. Environ 70% des décès par cancer surviennent dans les pays à revenu faible ou intermédiaire. Le dépistage du cancer à un état précoce et l'impossibilité d'avoir accès à un diagnostic et par la suite à un traitement sont des problèmes fréquents. En 2017, uniquement 26% des pays à faible revenu déclaraient bénéficier de services de prise en charge généralement offerts par le secteur public. Au-dessous de 30% des pays à faible revenu proclamaient disposer de services de traitement, tandis que la proportion pour les pays à revenu élevé excédait 90%.

La croissance et la division anormales observées dans les cellules cancéreuses sont causées par des lésions de L'ADN. Par exemple, via des facteurs environnementaux (tels que l'exposition aux radiations ionisantes ou à la fumée de tabac) qui peuvent déclencher une chaîne d'événements qui se traduit par des défauts de l'ADN cellulaire conduisant au cancer(dos Santos et al. 2020). L'ADN défectueux peut également être hérité des parents.

Lorsque les cellules cancéreuses se divisent et se répliquent, elles forment souvent un amas de cellules cancéreuses appelé tumeur. Les tumeurs provoquent de nombreux symptômes en exerçant une pression sur les cellules et les tissus non cancéreux environnants, en les écrasant et en les détruisant.

Les tumeurs se présentent sous deux formes : bénignes et malignes. Les tumeurs bénignes ne sont pas cancéreuses, elles ne se développent donc pas et ne se propagent pas à la hauteur des tumeurs cancéreuses. Les tumeurs bénignes ne mettent généralement pas la vie en danger. En revanche, les tumeurs malignes, dont les hémopathies malignes ou bien les leucémies se développent et se propagent à d'autres parties du corps, entrainant des conséquences graves, qui réduisent l'espérance de vie et altèrent considérablement la qualité de vie quotidienne des personnes atteintes.

La leucémie est une pathologie maligne impliquant la génération exagérée de leucocytes immatures ou anormaux, qui finit par abolir la production de cellules sanguines normales et provoque des symptômes liés aux cytopénies.

La transformation maligne concerne habituellement une cellule-souche pluripotente ou un progéniteur qui a des potentiels d'auto-renouvellement plus limités. Une prolifération anormale, une expansion clonale et une diminution de l'apoptose mènent à une baisse des éléments sanguins normaux, et à la susceptibilité du passage des cellules malignes dans le sang.

La Société Américaine de Cancer a rapporté qu'aux États-Unis, 60 300 nouveaux cas de leucémie (de tous types) chez les adultes et les enfants, et environ 24 300 décès ont été recensés en 2018 (Annexe 2). Elle a estimé également que la leucémie myéloïde chronique (LMC) a présenté 14% de l'ensemble des nouveaux cas par type de leucémie en 2017 (Baeker et al. 2020).

2. Epidémiologie

L'incidence brute de la LMC pour les deux sexes est passée d'un minimum de 0,39 nouveau cas pour 100 000 habitants (0,47 chez les hommes et 0,29 chez les femmes) chez les très jeunes adultes (20-29 ans) jusqu'à un maximum de 1,52 (2,08 chez les hommes et 1,18 chez les femmes) chez les adultes âgés de 70 ans et plus. L'incidence était toujours plus élevée chez les hommes que chez les femmes, quel que soit l'âge du groupe(Hoffmann et al. 2015). L'incidence standardisée dans tous les pays était de 1,10 pour les hommes et 0,82 pour les femmes(Hoffmann et al. 2015).

L'incidence augmente avec l'âge, et la LMC représente moins de 10 % de tous les cas de cancer pendant l'enfance (Meral et al. 2021). L'âge médian du diagnostic est de 60 à 65 ans dans l'Union Européenne (Eichhorst et al. 2020) et de 65 ans aux États-Unis (Thomas et al. 2020). Dans les populations pédiatriques (âgées de moins de 18 ans), l'âge médian du diagnostic est de 11-12 ans (Horton et al. 2020)(Miller et al. 2020).

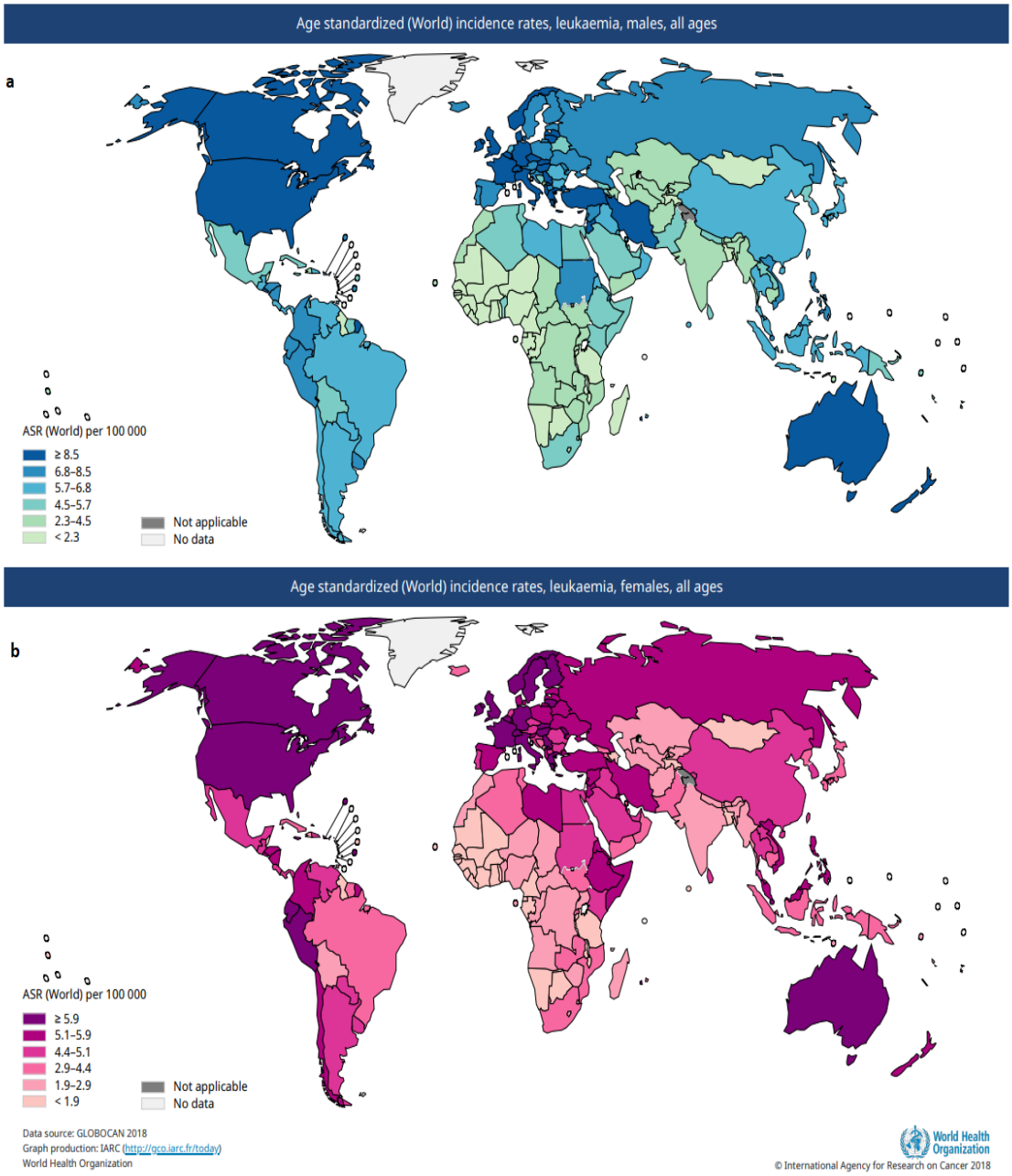


Figure 1: Incidence de la leucémie dans le monde selon GLOBOCAN 2018, a : taux d'incidence de la leucémie chez les hommes standardisé par âge, b : taux d'incidence de la leucémie chez les femmes standardisé par âge(Namayandeh et al. 2020).

Les registres des cancers couvrent des données importantes sur l'épidémiologie des leucémies, à savoir la prévalence, l'incidence, la répartition par âge et/ou sexe, la survie relative, et l'évolution chronologique de la maladie dans la population d'un pays ou d'une nation. Aux États-Unis par exemples, le registre SEER assure la collecte des données sur tous les cancers nouvellement diagnostiqués chez 30% de la population américaine (Lam et al. 2020).

Les taux d'incidences les plus forts de la leucémie ont été observés dans les pays occidentaux (Figure 1), par ailleurs, les taux les plus bas ont été constatés dans les pays à moyen et à faible revenus.

L'organisation mondiale de la santé (OMS) a classé la leucémie parmi les dix premiers cancers dont le taux d'incidence standardisé par âge est le plus élevé parmi trente-cinq autres cancers au Maroc (Figure 2).

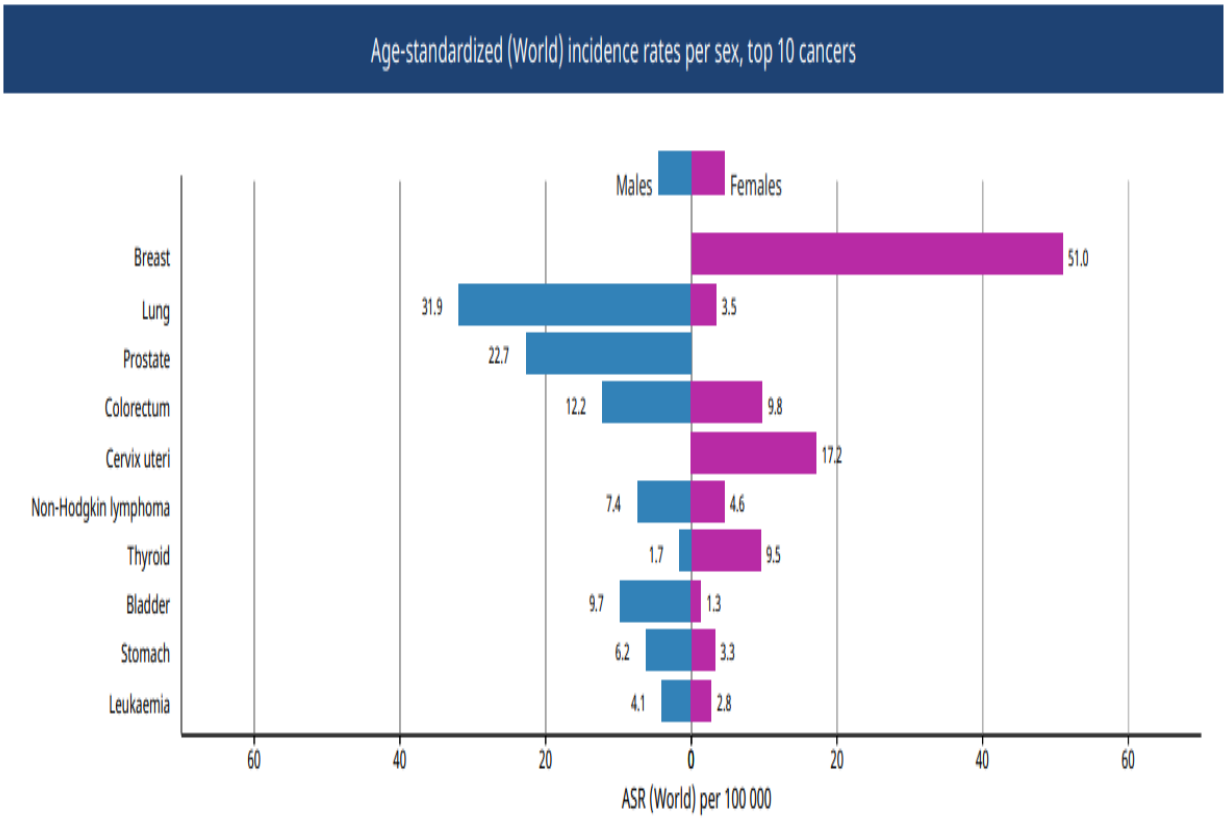


Figure 2: Taux d'incidence des dix premiers cancers au Maroc standardisé par âge et par sexe selon GLOBOCAN 2018[1](Registry 2020)

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

Au Maroc, le registre de la région du grand Casablanca (2008-2012)[2] et le registre de Rabat (2009-2012)[3] ont attribué une incidence standardisée par âge de la LMC de l'ordre de 1,5.

Cette valeur est inférieure à celles octroyée par le registre SEER des États-Unis qui est de 1,75 entre 1975 et 2009, ainsi qu'à l'incidence de 1,9 rapportée dans la période allant de 2010 à 2017 (Tableau 1), mais reste proche des incidences retrouvées par les autres registres du cancer au Maghreb (excepte en Libye).

[1] : Le projet GOLOBOCAN vise à fournir des estimations contemporaines de l'incidence, la prévalence et la mortalité des principaux types de cancers dans 184 pays. http://globocan.iarc.fr/Pages/Map.aspx.

[2] : Les données du registre du Grand Casablanca établies entre 2008-2012 : http://contrelecancer.ma/en/documents/registre-des-cancers-de-la-region-du-grand-casab-3/

[3] : Les données du registre de la ville de Rabat établies en 2005 : http://www.irc.ma/wp-content/uploads/2016/pdf_statistique/Registre-des-Cancers-de-Rabat.pdf

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

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

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

3. Leucémie myéloïde chronique (LMC)

3.1 Définition

La "leucémie myéloïde chronique", est appelée par plusieurs autres noms, comme "leucémie myélogène chronique" et "leucémie granulocytaire chronique"(Gratwohl and Favre 2005).

La leucémie myéloïde chronique est une maladie myéloprolifération clonale de la cellule souche hématopoïétique pluripotente appartenant au groupe des syndromes myéloprolifératifs. Cette hémopathie maligne est marquée par des anomalies de cellules sanguines dans la mesure de nombre (leucocytose, souvent accompagnée d'une thrombocytose) et de différenciation

(granulocytes dans le sang). Elle est caractérisée par la prolifération clonale anormale de cellules de la lignée granuleuse, issues d'un précurseur pluripotent (Flis and Chojnacki 2019).

La principale observation chez les patients atteints de la LMC est une prolifération de granulocytes immatures (neutrophiles, éosinophiles et basophiles) et de leurs précurseurs. Asymptomatique au départ, la progression de la LMC est insidieuse(Hebeda et al. 2021), avec des manifestations non particulières comme la sensation de malaise, la perte de poids et l'anorexie, entrainant éventuellement une phase d'accélération ou phase blastique avec des symptômes plus inquiétants tels une splénomégalie, une fièvre, des lésions cutanées, et des hémorragies(Tefferi 2021).

La LMC est caractérisée particulièrement par la présence du chromosome Philadelphie (Ph) (Figure 3). Il résulte d'une rupture d'une partie du bras long du Chr. 9 qui comprend le gène ABL, et une autre rupture du bras long du Chromosome 22 au niveau du gène BCR. Après cassures des Chromosomes, une translocation réciproque aura lieu entre les deux régions du Chromosome 9 qui inclut le gène ABL et le chromosome 22 qui inclut le gène BCR, ce qui donne le chromosome Ph.

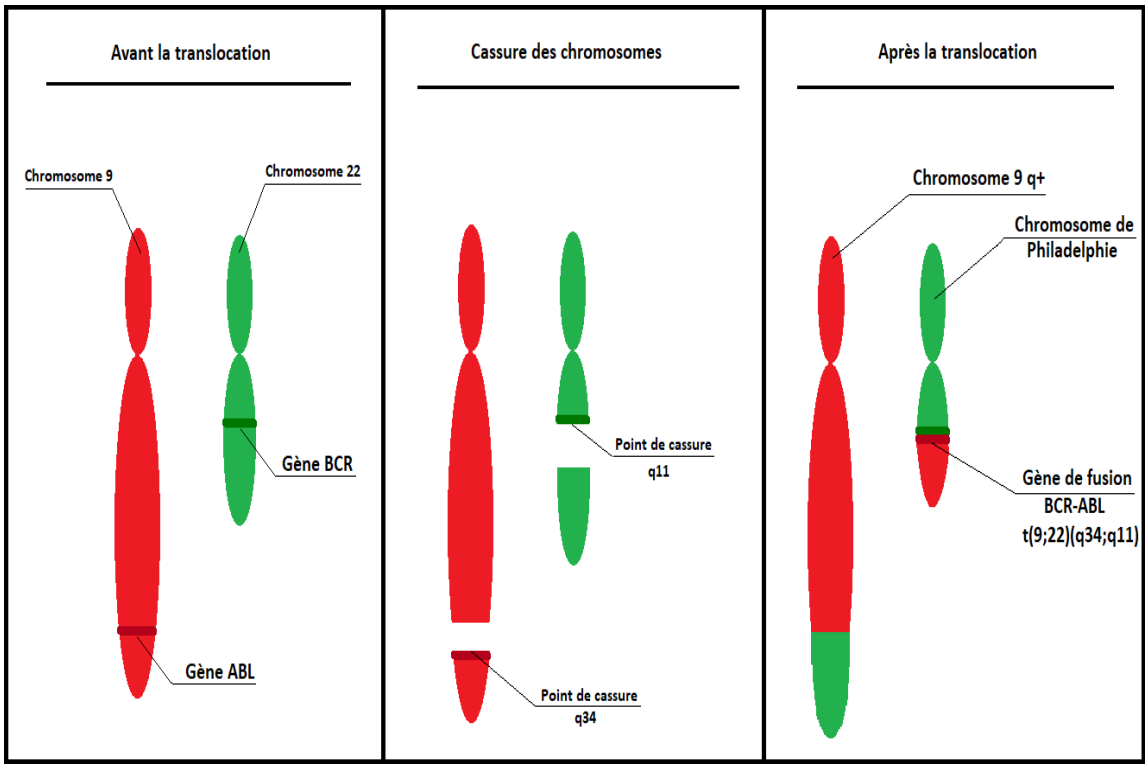


Figure 3: Représentation schématique de la t(9;22)(q34;q11)

Le chromosome Ph a été découvert et décrit pour la première fois en 1960 par Peter Nowell de l'Université de Pennsylvanie et David Hungerford du Fox Chase Cancer Center (Nowell 2007) (Figure 4).



Figure 4: Photo historique de Peter Nowell et David Hungerford, scientifiques ayant découvert le chromosome Ph(Knutsen 2011)

Le chromosome Ph a donc été nommé comme la ville où résident les deux scientifiques. La cassure sur le chromosome 9 (région q34) entraîne une mutation d'Abelson le gène de la leucémie murine (ABL), tandis que la rupture sur le chromosome 22 (région q11) implique le gène de la région de regroupement des points de rupture ou Breakpoint Cluster Region (BCR). Cette translocation chromosomique est désignée comme t(9;22)(q34;q11). Par conséquent, le gène ABL se déplace vers le chromosome 22 et fusionne avec la partie restante du gène BCR, créant ainsi un chromosome 9 allongé, et un chromosome 22 qui est le chromosome Ph (Rowley 1973)(Chandra et al. 2011). La conséquence moléculaire de cette translocation est l'oncogène de fusion BCR-ABL, responsable de la leucémie, qui, à son tour se traduit en une oncoprotéine BCR-ABL(Assouline et al. 2011).

3.2 Diagnostic clinique et hématologique

C’est en plusieurs étapes et à plusieurs niveaux que le bilan diagnostique d’une LMC se réalise. Il consiste, au début, en un interrogatoire du patient, accompagné de l’exploration des signes cliniques. Puis en une prise de sang, avec une numération de formule sanguine (NFS), comprenant un comptage différentiel des globules blancs et des plaquettes. Puis, on évalue le pourcentage de basophiles et de blastes dans la moelle grâce à une aspiration ou une biopsie. Après cela vient l'étape de la génétique, où il y aura réalisation du caryotype pour détecter le chromosome Ph et valider le diagnostic de la LMC. Certains cas diagnostiqués peuvent être Ph négatif (Absence du chromosome Ph). Dans ce cas, une étude des réarrangements du gène BCR-ABL via des analyses plus sensibles comme l’hybridation in situ fluorescente (FISH) ou la réaction de polymérisation en chaine (PCR) sera envisagée.

3.2.1 Examen clinique

Les signes cliniques de la LMC ne sont pas spécifiques et ne permettent pas de poser le diagnostic. Ils peuvent cependant être évocateurs et diriger le médecin vers des examens spécifiques pour poser le diagnostic exact de la LMC. Ces derniers seront ensuite effectués tout au long du suivi de l’hémopathie, afin de contrôler la réponse au traitement. Les symptômes communs des patients sont la splénomégalie, l'anémie, la plénitude de l'abdomen, la faiblesse ou bien l’asthénie, la fièvre, et l’amaigrissement.(Chowdhury et al. 2019).

Le médecin interroge le patient lors de l’examen clinique, recherchant les signes de splénomégalie et d’hypertrophie des ganglions lymphatiques. Par la suite, il prescrira une prise de sang, afin de contrôler l’hémogramme.

3.2.2 Hémogramme

L'hémogramme est un examen courant, c’est une analyse du sang avec évaluation du nombre de cellules sanguines (érythrocytes, plaquettes, globules blancs, etc.). On y retrouve une NFS perturbée chez un patient avec LMC, qui peut être différente selon la phase à laquelle on détecte la maladie. Généralement, le diagnostic se fait en phase chronique, très rarement en phase accélérée ou phase blastique. Comme rappel, les anomalies retrouvées à l’hémogramme sont :

- Une hausse du nombre de globules blancs (surtout des granulocytes neutrophiles, mais également des granulocytes basophiles et éosinophiles),

- Une myélémie (existence de cellules immatures dans le sang),

- Une progression du nombre de plaquettes.

Les résultats de la NFS sont très évocateurs de la maladie mais ne permettent en aucun cas de poser son diagnostic.

3.2.3 Myélogramme

Il confirme la phase de la maladie d'où sa nécessité au diagnostic. Pour le faire, un échantillon de moelle osseuse est prélevé, étalé sur une lame -on l'appelle un frottis- (Brück et al. 2018), ensuite, il est coloré et analysé à l'aide d'un microscope. Le myélogramme révèle une moelle riche chez un patient atteint de LMC, avec un surplus de globules blancs de type granuleux. Dans le cadre d'une greffe de moelle une biopsie ostéo-médullaire peut être effectuée, elle signale une hyperplasie du tissu hématopoïétique, remplissant tous les espaces médullaires, une suppression des cellules adipeuses, et l'apparition d'une fibrose, qui signe d'accélération de la maladie.

En outre, le prélèvement de moelle exécuté pour le myélogramme sert également à la réalisation de l'examen cytogénétique que ça soit la cytogénétique conventionnelle, ou moléculaire par hybridation in situ fluorescente, ce prélèvement est indispensable à l'établissement du diagnostic final par caryotype (Brück et al. 2018).

3.3 Phases de la LMC

La LMC peut être classée en trois phases différentes : la phase chronique (PC), phase accélérée (PA) et phase blastique (PB) (Figure 5). Le diagnostic de la maladie s'effectue dans la majorité des cas au moment de la phase chronique. En l'absence de traitement, la LMC est mortelle, avec une évolution en 3 à 5 ans comportant une phase accélérée puis blastique résultant d'une transformation aiguë prenant l'aspect d'une leucémie aiguë secondaire. Cette progression résulte également d'altérations génétiques supplémentaires dans les cellules leucémiques(Gianelli et al. 2014). Il existe ainsi un passage progressif d'une hyperproduction chronique d'éléments matures variés de la lignée myéloïde à une prolifération rapide de cellules

immatures (hiatus de maturation et emballement d'un ou plusieurs sous-clones). Dans de rares cas, la maladie sera diagnostiquée en phase accélérée voire blastique, où les manifestations cliniques et biologiques de la pathologie seront plus marquées et dont le délai de prise en charge devra être plus rapide (Zhang et al. 2019).

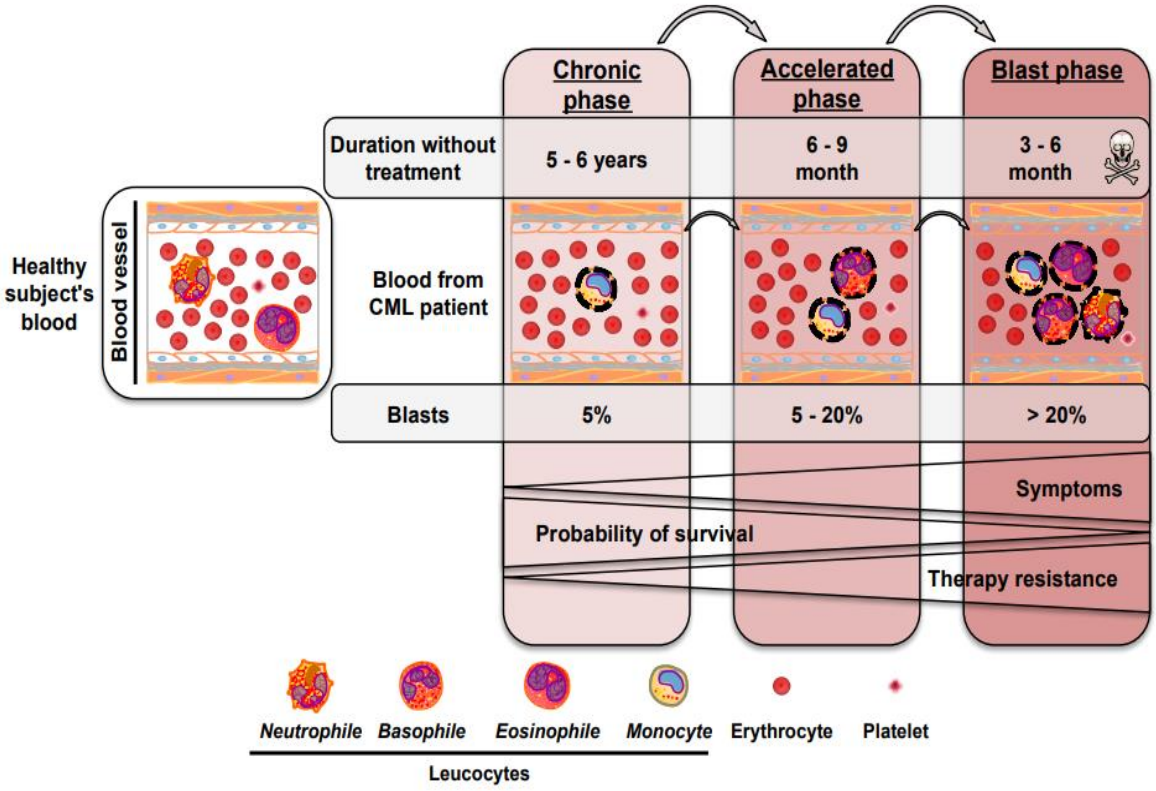


Figure 5: Progression de la leucémie myéloïde chronique (Losson et al. 2020)

- **Phase chronique**

Environ 85% des patients sont en PC au moment du diagnostic (détection du gène BCR-ABL). La durée de la PC est variable et dépend de la date du diagnostic de la maladie ainsi que la thérapie utilisée (Hochhaus et al. 2017)(Figure 5). La majorité des diagnostics de LMC est réalisée lors de la phase chronique. Dans la moitié des cas, il s'agit d'une découverte fortuite, sur un hémogramme pathologique mais sans signe clinique. Cette première phase d'installation est progressive, et dure en moyenne 4 à 5 ans. La présentation clinique de la maladie peut être marquée par une altération de l'état général associée à un syndrome tumoral caractérisé par la présence d'une splénomégalie.(Mahon et al. 2018).

- **Phase accélérée**

La plupart des patients évoluent en PA avant la PB. Dans la PA, les patients peuvent présenter une aggravation de l'anémie, une splénomégalie et une augmentation du nombre de globules blancs. Le nombre de blastes dans le sang et la moelle osseuse commence généralement à augmenter (10 à 19 % des blastes dans le sang ou la moelle osseuse) et est encore plus élevé dans la PA. Dans cette phase, il y a généralement une accumulation d'aberrations chromosomiques, en plus du chromosome Ph. Les patients peuvent perdre leur sentiment de bien-être et d'autres complications peuvent s'ensuivre. Le traitement médicamenteux devient généralement moins efficace à ce stade (Boddu et al. 2017) (Figure 5).

- **Phase blastique**

C'est la phase finale de l'évolution de la LMC, avec une progression rapide et courte survie. La PB se présente comme une leucémie aiguë, le nombre de blastes montre une augmentation spectaculaire de la moelle et du sang avec une perte de la capacité de différenciation, qui se traduit par le nombre très faible de globules rouges, de plaquettes et de neutrophiles. Les patients peuvent connaître des épisodes d'hémorragie et d'infection (Hehlmann et al. 2016)(Figure 5).

En conclusion, la leucémie myéloïde chronique (LMC) se caractérise par une prolifération excessive de leucocytes non fonctionnels ou de blastes dans la moelle osseuse puis dans le sang. La phase chronique reste généralement asymptomatique. Après 5 à 6 ans sans traitement, la pathologie progresse vers la phase accélérée et les symptômes, dont la fatigue et la perte d'appétit et de poids commencent à apparaître. Sans traitement, la phase accélérée progresse en 6 à 9 mois en phase blastique (plus de 20 % blastes), ce qui entraîne une détérioration rapide de l'état des patients et leur décès après quelques mois seulement sans prise en charge(Zhang et al. 2019).

3.4 Classification

La leucémie est une pathologie caractérisée par la prolifération de cellules malignes appelées "blastes" dans la moelle osseuse (MO) et/ou le sang périphérique. Il s'agit de proliférations malignes développées à partir des cellules immatures des lignées myéloïdes ou lymphoïdes. Les leucémies sont déjà connues depuis très longtemps (le terme "leucémie" a été inventé par Virchow en 1847 (Masic 2019))(Davis et al. 2014) mais leur classification

systématique ne remonte qu'à la fin des années 1970 avec la publication de la classification franco-américaine et britannique (FAB) (Delacrétaz et al. 1987) qui décrit 3 formes développées à partir du tissu lymphoïde et 7 puis 8 formes à partir du tissu myéloïde. Cette classification a été très largement utilisée dans le monde jusqu'en 2000. Depuis lors, le développement rapide des techniques de cytométrie en flux, de culture cellulaire, de cytogénétique et de biologie moléculaire ont conduit à l'affinement de cette classification par la consolidation de certaines entités et l'individualisation de nouvelles entités. L'OMS a ainsi publié une nouvelle classification internationale en 2000, modifiée en 2008 puis en 2016(Daniel A. et al. 2016).

L'édition 2016 de la classification de l'organisation mondiale de la santé (OMS) des tumeurs des tissus hématopoïétiques et lymphoïdes, représente la dernière mise à jour de la classification des hémopathies malignes (Tableau 2)(Daniel A. et al. 2016).

Tableau 2: Organisation mondiale de la santé (OMS) - Classification des NMP 2017(Manivannan et al. 2019)

Néoplasmes myéloprolifératifs (NMP)
Leucémie myéloïde chronique (LMC), BCR-ABL+
Leucémie neutrophile chronique (LCN)
Polycythemiavera (PV)
Myélofibrose primaire (MFP), stade précoce/préfibrotique
MFP, stade fibrotique déclaré
Thrombocytémie essentielle (TE)
Leucémie éosinophile chronique (LEC), NSA
Néoplasme myéloprolifératif (NMP), inclassable
MPNs : Néoplasmes myéloprolifératifs, NSA : non spécifié ailleurs

Depuis lors, les progrès sont nombreux dans l'identification de biomarqueurs uniques associés à quelques néoplasmes myéloïdes des leucémies, qui sont largement dérivées de l'analyse de l'expression des gènes et du séquençage haut débit ce qui peut améliorer considérablement les critères de diagnostic ainsi que la pertinence du pronostic. Les nouvelles

données cliniques, morphologiques, immunophénotypiques, et génétiques sont des entités actuellement incluses dans la classification de l'OMS de 2016 et reflètent un consensus de l'avis des hématopathologistes, des hématologues, des oncologues et des généticiens(Manivannan et al. 2019).

Tableau 3: Critères de l'OMS 2017 pour le diagnostic de la PA de la LMC (Manivannan et al. 2019)

Critères hématologiques	**Cytogénétique (CTG)**	**Réponse à la thérapie TKI**
NLT persistante ou en augmentation >10 × 10^9 /L ne répondant pas à la thérapie	Anomalies chromosomiques clonales supplémentaires qui comprennent des anomalies des voies d'accès principales	Résistance hématologique à la première TKI
Splénomégalie persistante ou croissante ne répondant pas à la thérapie	Chromosome Ph	Absence de réponse hématologique complète à la première TKI
Thrombocytose persistante >1000 × 10^9/L ne répondant pas au traitement	Trisomie 8, 19 Isochromosome17q	Toute indication hématologique, CTG ou moléculaire de résistance à deux TKI séquentiels
Thrombocytopénie persistante <100 × 10^9/L sans rapport avec le traitement	Caryotype complexe	Présence de deux mutations ou plus dans le gène BCR-ABL pendant le traitement TKI
≥20% de basophiles dans le sang périphérique	Nouvelle anomalie chromosomique clonale dans les cellules Ph+ pendant le traitement	
10 à 19 % de blastes dans le sang périphérique et/ou la moelle osseuse	Anomalies du 3q26.2	
De grands groupes de petits mégacaryocytes anormaux, associés à une fibrose marquée de la réticuline ou du collagène dans les échantillons de biopsie peuvent être considérés comme des preuves présomptives de la LMC en PA. NLT : la numération leucocytaire totale, Ph: Philadelphie, TKI: l'inhibiteur de tyrosine kinase, Réponse hématologique complète : NLT <10 × 10^9/L, numération plaquettaire <450 × 10^9 /L, pas de granulocytes immatures dans le différentiel, et rate non palpable		

Cette classification associe chaque entité à un stade du développement physiologique des lignées hématopoïétiques et les individualise ensuite en fonction d'anomalies cytogénétiques ou moléculaires récurrentes et donc selon un mécanisme physiopathologique. Il existe deux grandes familles de leucémies aiguës : la leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) et la leucémie myéloïde aiguë (LMA). À l'origine du tissu hématopoïétique, une seule cellule souche totipotente se divise en deux souches cellulaires. L'une donnera naissance à tout le tissu myéloïde et l'autre à tout le tissu lymphoïde. Chacune de ces cellules souches se séparera en deux lignées différentes (au moins 5 lignées pour le tissu myéloïde et 3 pour le tissu lymphoïde). A partir de ces 2 tissus, il y aura un développement possible de leucémie aiguë ou chronique. Ces leucémies sont dissociées car ce sont des tissus qui ont des fonctions distinctes dans l'organisme (Daniel A. et al. 2016).

3.5 Etiologie

Jusqu'aujourd'hui on ne sait que peu de choses sur les mécanismes conduisant à la formation de la translocation t(9;22). Il a été démontré que des facteurs environnementaux, comme l'exposition aux radiations ionisantes (cas des survivants d'Hiroshima et de Nagasaki), augmentaient le risque de LMC (Sadakane et al. 2019). Cette hypothèse est confortée in vitro par l'augmentation de la fréquence de détection du réarrangement BCR-ABL après irradiation de lignées cellulaires initialement BCR-ABL négatives (Balajee et al. 2018). Ainsi, l'exposition aux fortes doses de radiations suite aux accidents de centrales nucléaires, tel le cas des techniciens en radiologie d'avant les années 1950 (période à partir de laquelle les blindages de protection ont été introduits) présente un risque accru de LMC. Des inquiétudes ont été également exprimées depuis un certain temps concernant l'augmentation des leucémies en Irak(Al-Faluji et al. 2012) et ont été reprochés aux agents mutagènes et cancérigènes , comme l'uranium appauvri utilisé pendant la guerre de 2003(Busby et al. 2010).D'autre part, les résultats d'une récente étude basée sur une population cas-témoins ont suggéré une faible association entre le tabagisme et la LMC, mais cela n'a pas encore été confirmé par d'autres études (Musselman et al. 2013).Une exposition au formaldéhyde pourrait augmenter le risque de survenue d'une LMC -travailleurs de l'industrie chimique et embaumeurs- (Mundt et al. 2017).

Les pesticides ont été signalés pour la première fois comme facteurs de risque de leucémie humaine il y a plus de 30 ans. (Yun et al. 2017). En effet, Les personnes exposées aux pesticides et aux benzènes (Annexe 3) dans le cadre de leur travail présentent un risque non négligeable de développer une LMC (ESMO 2013)(Van et al. 2008). Une association avec les pesticides a été observée dans 6 méta-analyses, dont deux études de cohorte, ce qui a permis de conclure la présence d'un lien fort avec l'exposition aux pesticides chez les agriculteurs dans la dernière expertise collective de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm).En outre**,** une méta-analyse traitant 14 études publiées entre 1984 et 2004 a autorisé la confirmation d'une association possible entre l'exposition aux pesticides (herbicides phénoxyacétiques) et le développement de la LMC chez les agriculteurs ou fermiers(Duhayon et al. 2007).Comme illustré sur le tableau 4, les concentrations élevées des pesticides organochlorés (POC) chez les patients cancéreux authentifient l'implication des POC dans les troubles malins des cellules souches hématopoïétiques conduisant à la leucémie myéloïde chronique (LMC) chez l'homme. Ces POC sont positivement associées au risque de divers cancers autres que la LMC (Attaullah et al. 2018).

Tableau 4: Concentration des pesticides organochloré (POC) total dans la LMC et la LMA (Attaullah et al. 2018)

Principal site de cancer	**Cancer**	**Concentration des POC total dans les cancers (mg/Kg)**	**Moyenne (mg/Kg)**	**Écart-type (mg/Kg)**
Sang	LMC	0,323	0,161	0,016
	LMA	4,801	0,436	0,962

Il a été proposé que des séquences répétées localisées au niveau des loci ABL et BCR pourraient favoriser l'alignement des chromosomes 9 et 22, la survenue des cassures chromosomiques spontanées et finalement le réarrangement BCR-ABL(Albano et al. 2010). Concernant les facteurs génétiques héréditaires, plusieurs SNP (single nucleotide polymorphisms) pourraient être associés à une prédisposition à développer une LMC (Bruzzoni-Giovanelli et al. 2015). Il est à noter que les gènes portant ces SNP jouent un rôle dans la différenciation hématopoïétique, l'apoptose, la survie cellulaire et l'immuno-

surveillance. Les facteurs environnementaux et génétiques pouvant favoriser la translocation t(9;22) représentent ainsi l'une des dernières zones d'ombre de la leucémogenèse BCR-ABL qu'il convient d'éclaircir.

4. Caractérisation Moléculaire des LMC

4.1 Le gène ABL

L'oncogène Abelson (ABL) a été identifié par Abelson sous la forme v-ABL dans le génome du rétrovirus leucémogène murin, dirigeant la leucémie chez la souris. Il comporte 11 exons dont 2 exons '1' alternatifs (Ia et Ib) dissocié par un intron de 200kb et 10 autres exons qui sont peu espacés. 230kb est la mesure du locus ABL, ce dernier est transcrit en deux ARNm de 6 ou 7kb selon que la transcription aura lieu à partir de l'exon Ia ou Ib (figure 6). Le gène ABL code pour une tyrosine kinase non réceptrice (Laneuville 1995).



Figure 6: Gène ABL. Position des deux points de cassure (breakpoints) possibles : au niveau de l'intron séparant les exons Ia et Ib ou entre les exons Ia et a2

La protéine ABL générée par le gène ABL contient le domaine Ia généré par l'exon Ia (majoritaire), a une localisation nucléaire prédominante et le domaine Ib généré par l'exon Ib a une position membranaire (Lipton et al. 2011). Cette protéine est manifestée dans la majorité des cellules du corps (Cohen et al. 1995).

L'ABL humaine est une protéine de 145 kDa qui a une localisation essentiellement nucléaire, et est exprimée de manière ubiquitaire, avec 2 isoformes provenant de l'épissage alternatif du premier exon (Laneuville 1995). Elle est constituée de plusieurs domaines jouant un rôle complexe dans sa localisation. Plusieurs domaines structurels peuvent être définis à l'intérieur de la protéine (figure 7), possédant des domaines d'homologie SH (Srchomology). Trois domaines d'homologies du SRC (SH1-SH3) sont situées vers le terminus NH2. Le

domaine SH1 porte la fonction tyrosine kinase, tandis que le domaine SH2 permet l'interaction avec des protéines comportant des résidus tyrosine phosphorylés, et est également un régulateur positif du domaine SH1, tandis que le domaine SH3 permet l'interaction avec des séquences riches en proline, qui interagissent à leurs tours avec d'autres protéines(Daniel A. et al. 2016).

La partie N-terminale de la protéine contribue au mécanisme cellulaire de transmission du signal et il existe une zone variable de myristoylation permettant à la protéine ABL myristoylée, de type Ib, de s'installer sur la membrane. La partie C-terminale porte des domaines lui permettant de se coller aux filaments d'actine (donc au cytosquelette), ainsi qu'une séquence de localisation nucléaire : NLS pour nuclear localization signal (figure 7)(Deininger et al. 2000).

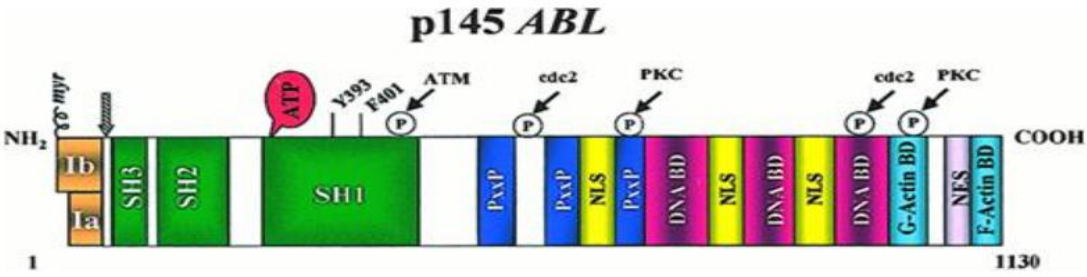


Figure 7: Structure de la protéine ABL(Deininger et al. 2000)

L'isoforme de type Ia est légèrement plus court que le type Ib, qui contient un site de myristoylation (myr) pour la fixation à la membrane plasmique. Les 3 domaines d'homologie SRC (SH) sont situés vers l'extrémité NH2. Y393 est le principal site d'autophosphorylation dans le domaine kinase, et La phénylalanine 401 (F401) est hautement conservée dans les PTK contenant des domaines SH3. Le site au milieu de chaque protéine est dominé par des régions riches en proline (PxxP) capables de se lier aux domaines SH3, et il héberge un des trois signaux de localisation nucléaire. L'extrémité carboxy-terminale contient les domaines de liaison à la G et à la F-actine qui est une proteine bi-globulaire de 5,46 nm de diamètre qui joue un rôle important dans l'architecture et les mouvements cellulaires, Elle est présente dans toutes les cellules du corps (c'est une protéine ubiquitaire), mais elle est particulièrement abondante dans les cellules musculaires. La pointe de la flèche indique la position du point de rupture dans la protéine de fusion BCR-ABL (Deininger et al. 2000).

L’action de la protéine ABL dépend de sa localisation nucléaire ou cytoplasmique, on remarque que cette protéine est dotée d'une dualité structurale et fonctionnelle, avec des domaines de régulation lui permettant de jouer un rôle simultanément dans le noyau et dans le cytoplasme de la cellule, aussi de se déplacer entre les deux compartiments(Wong and Witte 2004).La protéine ABL participerait également à la réponse cellulaire relative aux dommages causés sur l’ADN par des radiations ionisantes(Hehlmann et al. 2016).

4.2 Le gène BCR

Il a été découvert en clonant la région M-BCR (major breakpoint cluster region) où sont installés la majorité des points de ruptures (figure 8).

Ce gène s’étend sur 135kb et comprend 23 exons. Il est transcrit en ARNm de 4,5 ou 6,7kb qui codent une protéine cytoplasmique de 160kb d’expression ubiquitaire (Pallera et al. 2016).

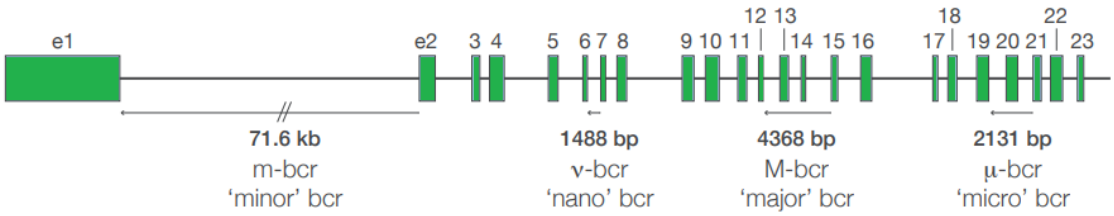


Figure 8: Gène BCR, position des différents points de cassures

Pareille à la protéine ABL, la protéine BCR (Figure 9) présente plusieurs domaines importants, dont la partie N-terminale, où on trouve le domaine Ib, assurant plus tard la dimérisation de la protéine BCR-ABL amenant à l’ouverture de l’activité tyrosine kinase. Le domaine Ia est composé de deux sites de liaison aux domaines SH2 de la protéine Grb2. La partie centrale de BCR fourni un domaine d’homologie avec les protéines DBL : facteur d’échange GTP (guanosine triphosphate) /GDP (guanosine diphosphate). Et enfin, la partie C-terminale qui a une fonction GAP (GTPase activating protein) et qui joue un rôle primordiale dans l’activité bactéricide des polynucléaires (Hehlmann et al. 2016).

Pourtant cette partie n’est pas présente dans la protéine de fusion. Cette protéine de localisation cytoplasmique est exprimée de manière péri-chromosomique lors de la mitose (Heisterkamp et al. 1983).



Figure 9: Structure de la protéine BCR(Deininger et al. 2000)

A l'extrémité N-ter de la protéine BCR, se trouve le domaine de dimérisation (DD) et les 2 domaines homologues de l'adénosine monophosphate kinase cyclique. Y177 est le site d'autophosphorylation crucial pour la liaison à Grb-2. Le centre de la molécule contient la région (Rho-GEF) ainsi que les domaines d'homologie dbl-like et pleckstrin (PH). Vers l'extrémité C, se trouve le site de liaison lipidique calcium-dépendant (CaLB) et un site avec fonction d'activation pour Rac-GTPase (Rac-GAP). Les pointes des flèches indiquent la position des points de rupture dans les protéines de fusion BCR-ABL(Deininger et al. 2000).

Pour résumer, en fonction du site de cassure sur le gène BCR, la taille de la protéine de fusion qui en résulte peut varier entre 158 kb et 230 kb (figure 10). Chaque gène de fusion code pour le gène ABL, et diffère dans la longueur de la séquence du gène BCR qui reste à l’extrémité N. Presque tous les patients atteints d’une LMC (95%) expriment une protéine de 210 kb (Konopka et al. 1984)(Landbouw 1988).

En conclusion, la protéine BCR a une activité sérine/thréonine kinase localisée dans le cytoplasme (Laneuville 1995), et comprend un domaine d'oligomérisation (OLI) (Chojnacki et al. 2019). Des mutations dans ce domaine entraînent une diminution de l'activité tyrosine kinase de la protéine BCR-ABL et permet de prévenir l'interaction entre les protéines BCR et BCR-ABL(J. Chomel 2017). Elle a également un domaine d'homologie avec la protéine DBL [facteur

d'échange guanosine diphosphate et triphosphate], un domaine d'homologie de la pleckstrine (PH), un domaine C2 pour la liaison des phospholipides dépendant du calcium, et enfin un domaine de la GTPase (permettant l'hydrolyse de la GTPase en GDP et en ion phosphate) pour la liaison aux protéines Rac(J. C. Chomel et al. 2014).

4.3 Le gène de fusion BCR-ABL

4.3.1 Anatomie moléculaire de la translocation BCR-ABL

Les points de ruptures au sein du gène ABL à 9q34 peuvent se produire n'importe où sur une grande surface (plus de 300 kb) vers son extrémité 5', soit en amont du premier exon alternatif Ib, en aval du second exon alternatif Ia, ou, plus fréquemment, entre les deux(Bruzzoni et al. 2015) (figure 10).

Indépendamment de l'emplacement exact du point de rupture, l'épissage du transcrit hybride primaire donne une molécule d'ARNm dans laquelle les séquences BCR sont fusionnées à l'exon a2 d'ABL. Contrairement à l'ABL, les points de rupture au sein du gène BCR se localisent dans une des quatre régions appelées "breakpoint cluster region". Chez la plupart des patients atteints de LMC et chez environ un tiers des patients atteints de leucémie lymphoblastique aiguë (LLA) Ph-positive, la rupture se produit dans une zone de 5,8 kb couvrant les exons 12-16 du BCR (initialement appelés exons b1-b5), définie comme la principale région de regroupement des points de rupture (M-BCR). En raison de l'épissage alternatif, des transcrits de fusion avec des jonctions b2a2 ou b3a2 peuvent être formées.

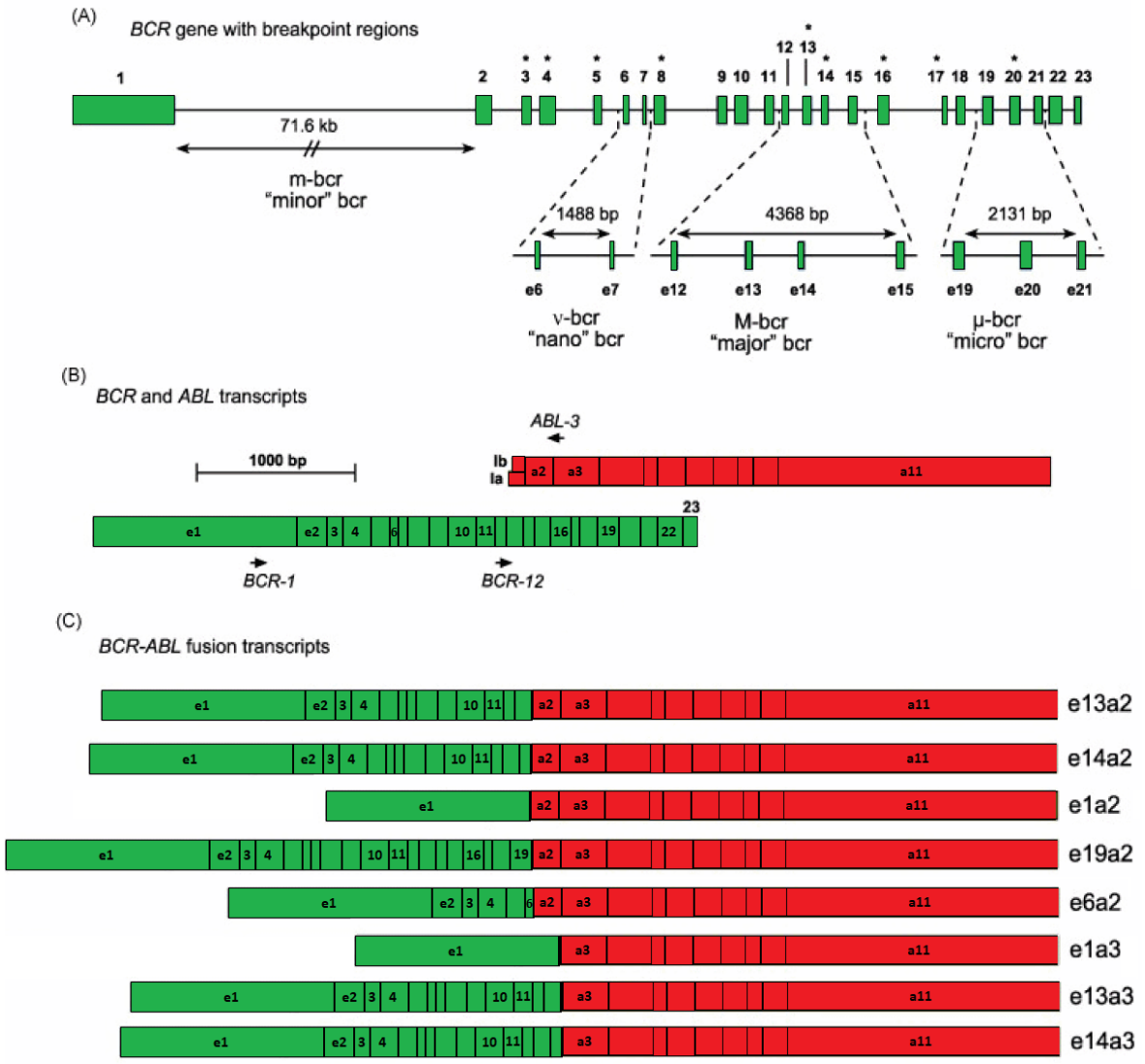


Figure 10: Les points de rupture dans différentes régions des gènes ABL et BCR entraînent la formation de différents transcrits codant pour la protéine chimérique BCR-ABL. (A) Structure des gènes de la région d'Abelson (ABL) et de la région du groupe de points de rupture (BCR) composées de 11 et 23 exons, respectivement ; (B) Schéma des transcrits ABL (1130 acides aminés), BCR (1271 acides aminés) et des hybrides BCR-ABL. (C) L'ARNm hybride eXaY est produit après que le clivage ait eu lieu après l'exon X du BCR et avant l'exon Y de l'ABL

Une protéine chimérique de 210 kDa (P210BCR-ABL) est dérivée de cet ARNm. Chez les autres patients atteints de LAL et rarement chez les patients avec la LMC, caractérisée cliniquement par une monocytose importante (Pallera et al. 2016), les points de rupture se trouvent plus en amont dans la région de 54,4 kb, appelée le point de rupture mineur du cluster (m-BCR). L'ARNm e1a2 résultant est traduit en une protéine de 190 kd (P190BCR-ABL). Récemment, un troisième groupe de points de rupture (m-BCR) a été identifié en aval de l'exon

19, donnant lieu à une protéine de fusion de 230 kd (P230BCR-ABL) associée à la rare leucémie neutrophile chronique ph-positive, trouvée seulement en utilisant des techniques sensibles. Les transcrits avec la fusion e1a2 sont détectables chez de nombreux patients atteints de LMC classique P210BCR-ABL (Baccarani et al. 2009).

Le faible niveau d'expression de ces transcrits de type P190 par rapport à celui de type P210 indique qu'ils sont très probablement le résultat d'épissage alternatif de l'ARNm primaire. Les cas occasionnels avec d'autres jonctions, telles que b2a3, b3a3, e1a3, e6a2,41 ou e2a2,(Weerkamp et al. 2009) ont été signalés chez des patients atteints de LAL et de LMC. Ces "formes inhabituelles" fournissent des informations importantes quant à la fonction des différentes parties du gène BCR et de l'ABL dans la protéine de fusion oncogène.

Il est intéressant de noter que l'exon 1 d'ABL, même s'il est retenu dans la fusion génomique, ne fait jamais partie de l'ARNm chimérique. Il doit donc être épissé pendant le traitement de l'ARNm primaire, le mécanisme qui sous-tend cette particularité apparente est inconnu. En se basant sur l'observation que la partie ABL de la protéine chimérique est presque invariablement constante alors que la partie BCR varie fortement, on peut déduire que l'ABL est susceptible de porter le principe de transformation alors que les différentes tailles de la séquence BCR peuvent dicter le phénotype de la maladie.

4.3.2 Structure de la protéine de fusion BCR-ABL

Structurellement, la protéine BCR-ABL contient de multiples domaines. Les séquences ABL codent pour les domaines d'homologie Src (SH3 et SH2), le domaine de la tyrosine kinase SH1, le domaine de liaison à l'ADN, le domaine de liaison à l'actine, les signaux de localisation nucléaire et le signal d'exportation nucléaire. La région BCR code un domaine d'oligomérisation en bobine, un domaine de sérine/thréonine kinase, un domaine d'homologie de pleckstrine (PH), un domaine d'homologie de facteur d'échange de nucléotides de guanine Dbl/cdc24, plusieurs sites de phosphorylation de sérine/thréonine et tyrosine, et des sites de liaison pour le domaine ABL SH2 et les protéines Grb2 (Preudhomme et al. 2010). Le domaine SH2 de BCR-ABL recrute des protéines de signalisation telles que p62dok, c-Cbl et Rin1. La liaison et la phosphorylation de ces molécules peuvent être fonctionnellement importantes car les mutations SH2 du BCR-ABL affectent l'évolution de la maladie dans les modèles

biologiques. Le domaine de liaison à l'actine relie directement le BCR-ABL au cytosquelette, et facilite la phosphorylation des protéines du cytosquelette par la tyrosine (Ghosh et al. 2004).

4.4 Physiopathologie de la LMC

La LMC est le résultat d'une prolifération monoclonale issue d'une mutation survenue dans une cellule souche hématopoïétique pluripotente, donc une cellule encore peu différenciée (Mazumdar et al. 2015).

Voici pour rappel un schéma de l'hématopoïèse (figure 11) :

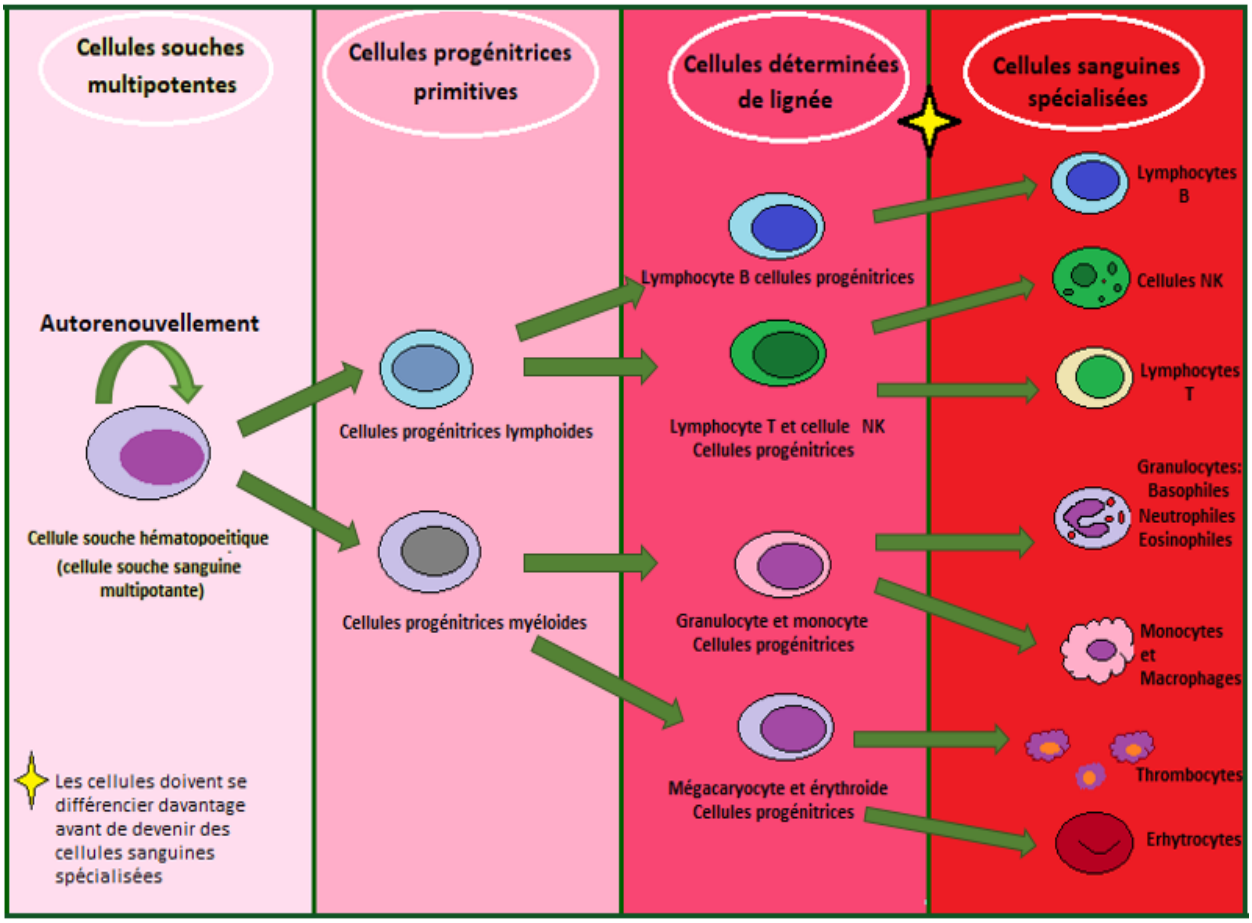


Figure 11: Schéma de l'hématopoïèse : la cellule souche hématopoïétique peu différenciée s'autorenouvèle ou se différencie en cellule spécialisée, ce qui n'est plus le cas des cellules progénitrices

Dans la LMC les cellules touchées sont les cellules souches multipotentes, qui, en cas normal, se différencient par la suite en cellules progénitrices primitives et en cellules déterminées dites précurseurs, enfin en cellules sanguines spécialisées. Toutes les lignées cellulaires peuvent donc être atteintes, avec une ampleur variable. D'autre part, les cellules souches sont munies d'un potentiel d'autorenouvèlement, qui autorise aux cellules souches mutées de se différencier et de se renouveler en nouvelles cellules progénitrices touchées.

Cette hémopathie maligne est un des syndromes myéloprolifératifs qui est le plus typique car il porte un marqueur spécifique de cette maladie : le chromosome Philadelphie, qui sera donc identifié dans toutes les cellules d'origine monocytaire, granuleuse, érythroblastique, mégacaryocytaire mais aussi lymphocytaire (B, T, NK). Il sera par contre introuvable dans les fibroblastes et les cellules extra-hématopoïétiques (Chereda et al. 2015).

4.4.1 Les conséquences physiopathologiques de la formation de la protéine aberrante BCR-ABL

En 1990 Lugo et et al. ont mis en évidence l'activité tyrosine kinase constitutive de la protéine BCR-ABL, en démontrant son pouvoir essentiel transformant (Groffen et al. 1984). Daley et al. ont observé par la suite que chez des souris préalablement transplantées par une moelle contenant un rétrovirus codant la protéine P210BCR-ABL, un développement de tumeurs hématologiques malignes similaires à une phase chronique de LMC humaine en évolution(Etten 1999). Donc l'induction de la LMC par l'expression de la protéine P210BCR-ABL a été démontrée par ces résultats. Ensuite les efforts ont été portés sur la compréhension du mécanisme d'action moléculaire de la kinase BCR-ABL dans les années2000, une fois BCR-ABL identifié comme l'événement moléculaire pathogénique dans la LMC. La leucémogenèse de la cellule normale est le résultat de la phosphorylation d'un grand nombre de substrats. La perte de régulation de l'activité tyrosine kinase de BCR-ABL et l'activation de cette cascade de signalisations entraînent une progression de l'augmentation d'indépendance aux facteurs de croissance, une inhibition des mécanismes mitochondriaux d'apoptose, et une croissance de la prolifération cellulaire (Stucchi et al. 2000) (Figure 12).

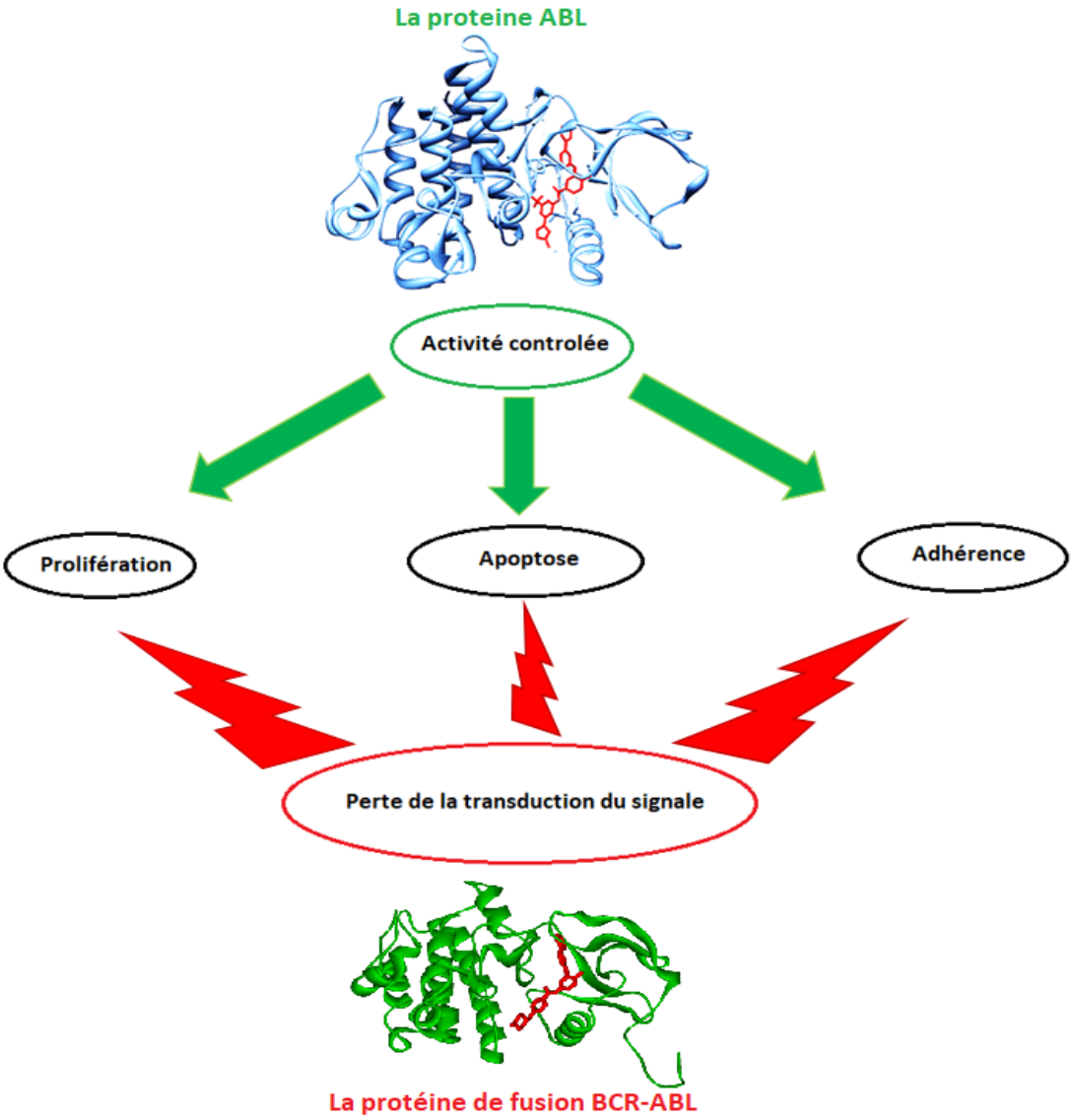


Figure 12: Les conséquences de la protéine ABL normal et de la protéine de fusion BCR-ABL

L'activité de la tyrosine kinase BCR-ABL s'est avérée avoir un effet profond sur les changements caractéristiques de la LMC, de sa pathogénie moléculaire et aussi des voies de signalisation. Les principales activités des cellules malignes sont la prolifération incontrôlée, la diminution de l'apoptose et l'activation des molécules anti-apoptotiques qui constituent les principales cibles de la thérapie. La prolifération cellulaire accrue dans la LMC est due à l'activation de la voie RAS et la diminution de l'apoptose est due à l'activation de la voie STAT5,

l'inhibition de la molécule pro-apoptotique est due à la protéine BAD via l'activation des protéines kinase AKT. En raison de la dérégulation de l'adhésion cellulaire, avec une libération prématurée dans la circulation des cellules myéloïdes immatures (effet CRKL), les modifications de l'angiogenèse et l'instabilité accrue du génome sont les principaux changements liés à l'évolution de la LMC (Colditz, Sellers, and Trapido 2006) (Figure 13). Les différentes voies associées à la transduction du signal BCR-ABL sont la voie RAS, la voie de la protéine kinase activée par les mitogènes, la voie de la phosphatidyl-inositol-3kinase, la voie de la kinase régulée par le signal extracellulaire, la transduction du signal et l'activateur de la transcription 5 et la voie du facteur nucléaire Kb (Mittal et al. 2009).

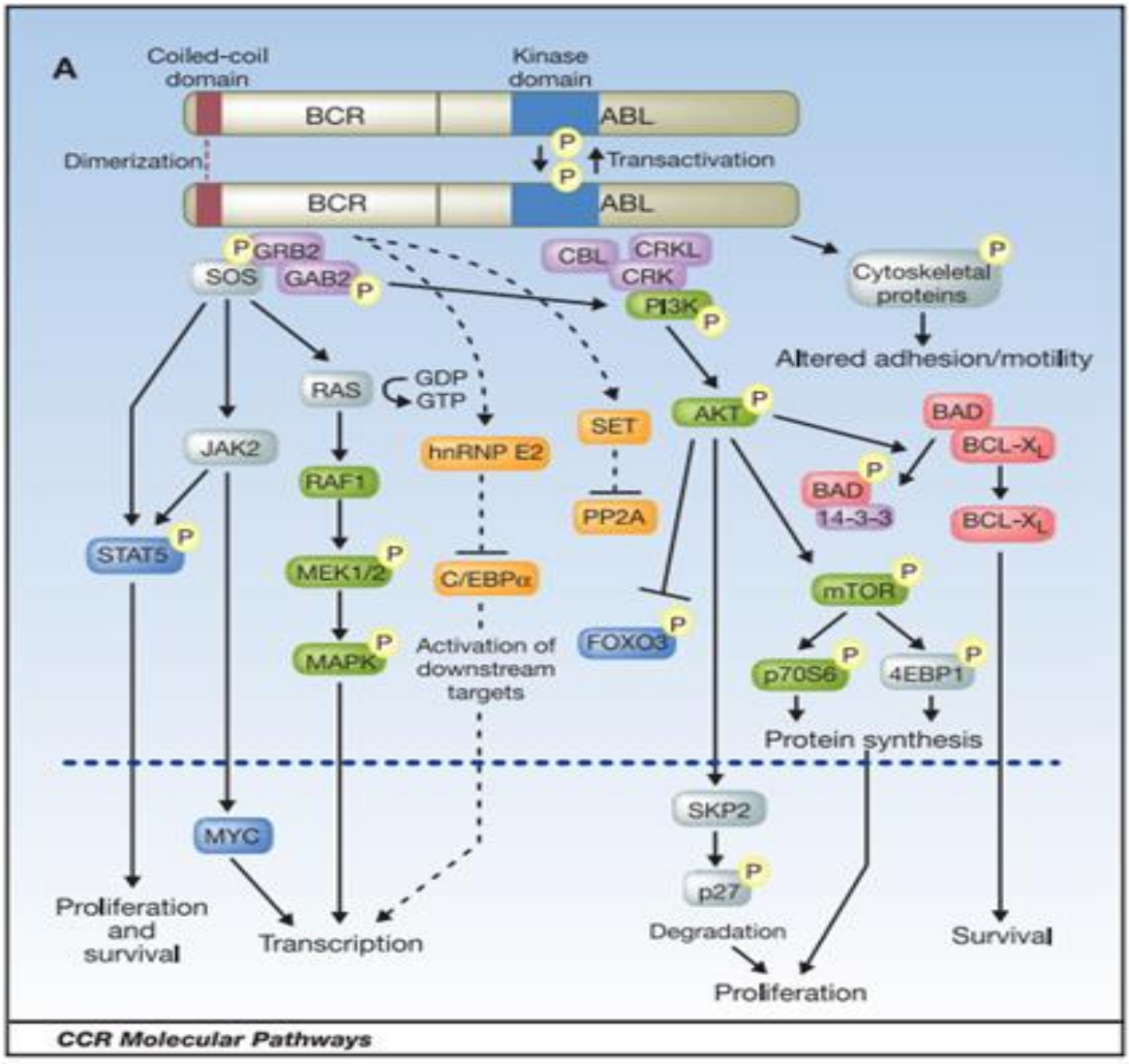


Figure 13: Les voies de signalisation BCR-ABL activées dans la LMC(Cilloni et al. 2012)

La dimérisation du BCR-ABL déclenche des événements d'autophosphorylation qui activent la kinase et génèrent des sites d'accueil pour les protéines adaptatrices intermédiaires sur la figure 13, telles que GRB2. La signalisation dépendante du BCR-ABL facilite l'activation de multiples voies en aval qui renforcent la survie cellulaire, l'inhibition de l'apoptose et la perturbation de l'adhésion et de la migration cellulaires. Un sous-ensemble de ces voies et leurs facteurs de transcription constitutifs, les kinases spécifiques à la sérine/thréonine (en vert) et les protéines liées à l'apoptose est présenté dans cette figure. Quelques voies qui ont été plus récemment impliquées dans le maintien des cellules souches de la LMC et la maladie à médiation BCR-ABL ainsi que les transformations sont indiquées. Il convient de noter qu'il s'agit d'un schéma simplifié et que de nombreuses autres associations entre BCR-ABL et les protéines de signalisation ont été déclarées. Le BCR-ABL est instable lors de la perturbation des cellules primaires de la LMC ; par conséquent, l'évaluation pharmacodynamique de l'activité du BCR-ABL est effectuée en surveillant l'état de phosphorylation de la tyrosine du CRKL ou du STAT5, la phosphorylation du CRKL étant considérée comme la lecture la plus spécifique.

4.4.2 La voie Ras

Ras est une petite protéine associée à la membrane par une ancre lipidique, ne contient qu'une seule petite sous-unité et possède une activité GTPasique. Le mécanisme moléculaire d'activation de la voie Ras par BCR-ABL commence par l'autophosphorylation du résidu tyrosyl 177 de BCR qui fournit un site d'ancrage au domaine SH2 de l'adaptateur Grb2. Grb2 recrute par son domaine SH3 la protéine SOS (Son Of Sevenless) qui favorise l'échange d'un GDP contre un GTP dans la boucle effectrice de Ras et stabilise Ras dans sa forme active (Pendergast et al. 1993)(Steelman et al. 2004). Ras activé va alors s'associer avec un domaine Raf-RBD de la protéine Raf-1. Le recrutement à la membrane de Raf-1 permet son activation. Raf1 activée, à son tour, active la cascade MEK1/MEK2, ERK qui conduit à l'activation de facteurs de transcription (Raitano et al. 1995). L’activation de Ras fait aussi intervenir la cascade de SAP kinase.

L’effet cellulaire de l’activation de la voie Ras est l'expression anormalement élevée de gènes indispensables pour la prolifération cellulaire, tels que c-Fos (un facteur de transcription

induisant la réplication de l'ADN), c-Myc (nécessaire pour la transcription de l'ARN ribosomal), ou c-Jun (Raitano et al. 1995). Elle stimule aussi, en coordonnant avec la voie PI3K, l'expression de cycline D1 et de Cdk6, deux éléments importants pour l'initiation du cycle cellulaire en G1 (Pages et al. 1993)(Lavoie et al. 1996). Cette voie active également la synthèse protéique en favorisant la traduction au niveau des ribosomes.

4.4.3 La voie STAT5

L'activation de STAT5 par BCR-ABL accorde la résistance à l'apoptose en activant la transcription des gènes codant les protéines anti-apoptotiques BCLXL et Mcl1. STAT5 induit aussi avec STAT3 l'expression de c-Myc et les gènes régulant le cycle cellulaire comme cycline D1/D2 (Weerkamp et al. 2009)(Jain et al. 2013). Récemment, des études ont montré que l'activation de voie JAK2/STAT5 dans les lignées et les progénitures BCR-ABL positives pourrait être due à la production autocrines et paracrines de GM-CSF ou IL3 et constituerait un des mécanismes de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase (O'Dwyer et al. 2002)(Rea et al. 2012).

5. Prise en charge et complications

5.1 Diagnostic cytogénétique et moléculaire

En plus de la caractérisation clinique et hématologique, le diagnostic de la LMC repose sur divers critères, cytologiques, cytogénétiques et moléculaires. Rappelant que la numération de formule sanguine ou l'hémogramme des patients LMC montrent une hyperleucocytose avec myélémie (myéloblastes, myélocytes, promyélocytes, métamyélocytes) harmonieuse, thrombocytose fréquente, basophilie caractéristique comme déjà expliqué dans le diagnostic clinique et hématologique. Le frotti sanguin et médullaire se caractérise par une moelle osseuse avec hyperplasie myéloïde. Dans les rubriques suivantes, on va détailler le principe de multiples techniques permettant la mise en évidence du chromosome de Ph, le typage du transcrit, autrement dit, la mise en évidence de l'un des variants BCR-ABL par PCR multiplex.

5.1.1 Caryotype

Le caryotype demeure l'examen de référence, il est inévitable au diagnostic et au suivi des patients. Il est réalisé sur un échantillon de moelle osseuse (habituellement le même

prélèvement que pour le myélogramme). Ensuite les cellules sont mises en culture, puis bloquées à un stade précis de la division cellulaire (la métaphase), ce qui permet de visionner les chromosomes (Figure 14). L'examen standard exige l'analyse d'au moins 30 cellules en division (mitose). Il déclare la présence du chromosome Ph (présent chez plus de 95% des patients), ainsi que d'éventuelles anomalies chromosomiques additionnelles.



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

5.1.2 FISH

L'hybridation in situ fluorescente permet l'illustration du réarrangement BCR-ABL par le gène de fusion à partir du sang ou de la moelle osseuse. Cet examen n'est utilisé que si le chromosome Ph n'a pas été retrouvé sur le caryotype. Les cellules prélevées sont plongées dans quelques microlitres d'une solution incluant des sondes qui se fixent spécifiquement sur les locus BCR et ABL. La FISH est une technique plus sensible que le caryotype conventionnel permettant d'analyser en moyenne 100 à 500 cellules. Le gène ABL est révélé par une sonde rouge et BCR par une autre verte, et les résultats sont obtenus en 1 à 2 jours.

Dans une cellule normale, deux spots rouges et deux spots verts sont clairement visibles (Figure 15 a). En cas de réarrangement BCR-ABL, les deux spots se superposent et donnent un signal jaune (Figure 15 b, c, d).

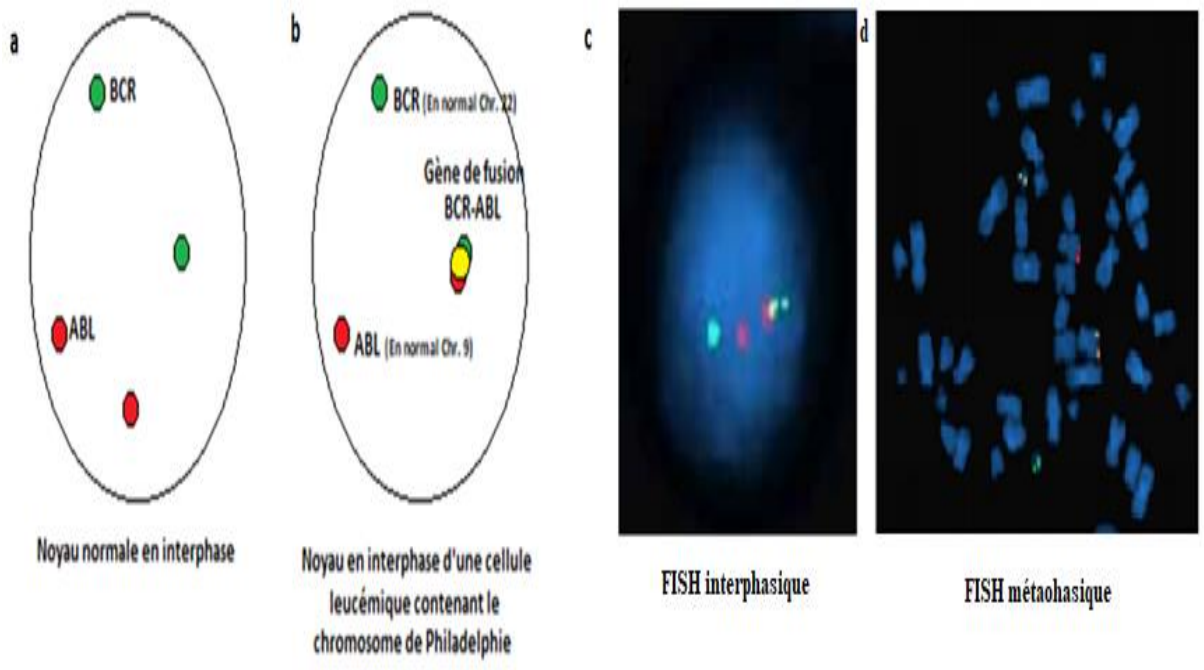


Figure 15: Méthode FISH : mise en évidence du réarrangement chromosomique BCR-ABL au niveau du schéma (b) et des photos (c, et d): un point jaune est visible sur la photo, c'est le résultat de la superposition des gènes BCR et ABL sur le chromosome Philadelphie (versus les témoins rouge et vert (a))

5.1.3 PCR multiplex

La PCR multiplex est une technique très rapide et plus précise pour identifier plusieurs variants du gène de fusion BCR-ABL grâce à l'utilisation dans une même réaction, de plusieurs couples d'amorces spécifiques permettant de déterminer les points exacts de cassure des gènes de fusion BCR et ABL.

En effet, plusieurs études ont démontré l'intérêt de son utilisation dans la détection d'autres transcrits atypiques impliquant différentes parties d'exons de BCR et ABL, ainsi que dans la détermination de nouveaux isoformes moléculaires.

La RT-PCR qualitative notamment de type multiplex est nécessaire à la caractérisation non seulement des types de transcrit classiques b3a2 et b2a2 au cours du diagnostic mais aussi pour les deux variants e1a2, e19a2, ainsi que pour les variantes rares tels que e1a3, e2a1, e6a2, e8a2, e13a3 (ou b2a3) et e14a3 (ou b3a3) (Tong et al. 2018).

5.2 Suivi de la maladie résiduelle

La RTq-PCR (Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction) consiste à amplifier et révéler spécifiquement la région de l'ADN correspondant aux gènes mutés à partir de molécules extraites des globules blancs. C'est l'analyse qui est la plus utilisée dans le cadre de la LMC car elle permet de mesurer la quantité des transcrits BCR-ABL.

L'ARN messager est extrait des leucocytes et transformé en ADN complémentaire (l'ADNc) par une reverse transcription. L'ADNc est ensuite amplifié par PCR utilisant la Taq Polymérase et des « amorces » qui s'attachent spécifiquement aux séquences des gènes BCR et ABL.

La technologie Taqman est basée sur l'activité 5'-exonucléasique de laTaq polymérase pour hydrolyser une sonde hybridée à sa séquence cible sur l'amplicon durant l'étape d'hybridation/extension de la PCR (Figure 16).

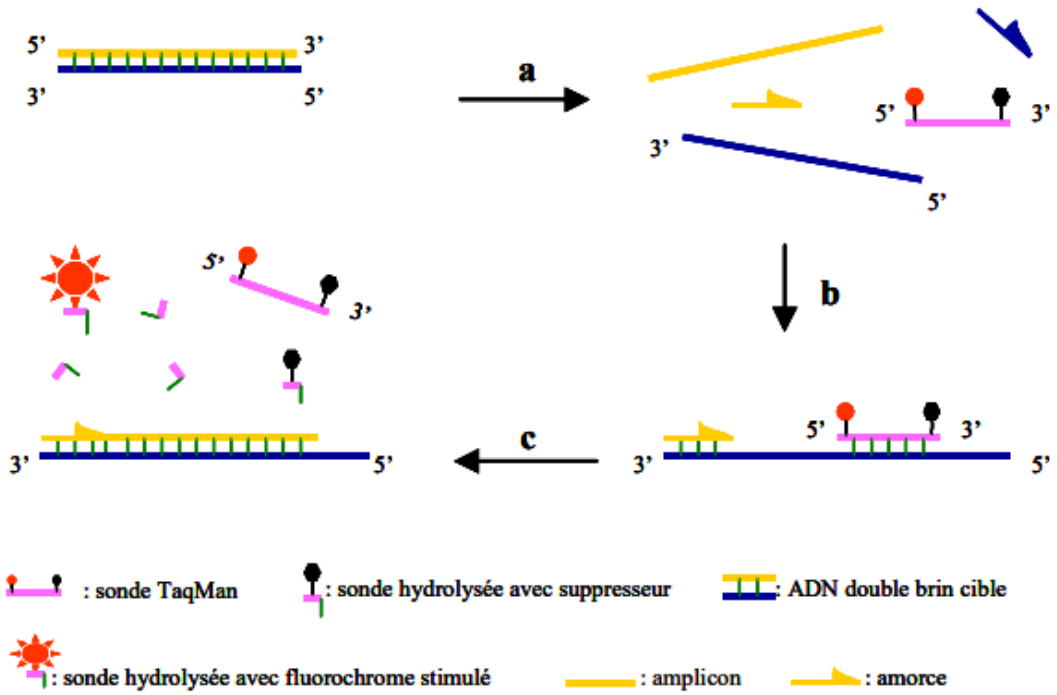


Figure 16: Hydrolyse de sondes (Taqman assay) (a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. (b) À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute. (c) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence(Émile 2004).

Un fluorochrome émetteur (reporter) (ex. FAM : 6-carboxyfluorocein) est fixé à l'extrémité 5' de la sonde d'hybridation et son émission est inhibée par un second fluorochrome suppresseur (quencher) présent à l'extrémité 3' (ex. TAMRA : 6-carboxy-tetramethyl-rhodamine). Une fois stimulé, le fluorochrome émetteur transfert son énergie au fluorochrome suppresseur voisin par le principe FRET (fluorescence resonance en ergytransfer) qui dissipe cette énergie sous forme de chaleur plutôt que d'émettre de la fluorescence (Mackay et al, 2002). Lors de l'étape d'hybridation, la sonde et les amorces se fixent à leurs séquences complémentaires respectives. A l'étape suivante, la Taq polymérase débute l'élongation du nouveau brin d'ADN à partir de l'amorce jusqu'à ce qu'elle rencontre sur son passage la sonde hybridée qu'elle déplace et hydrolyse avec son activité 5'-exonucléasique. Le reporter est alors libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de fluorescence qui augmente à chaque cycle proportionnellement au taux d'hydrolyse de la sonde. Comme la Taq

polymérase hydrolysera la sonde seulement lorsque celle-ci est hybridée à sa séquence complémentaire, les conditions de température de l'étape de polymérisation doivent être ajustées de façon à permettre à la sonde de rester hybridée durant cette étape. La majorité des sondes ont une température de dissociation (Tm) autour de 70ºC ou de 5 à 10°C plus élevée que les amorces. Par conséquent, la technologie Taqman utilise une étape combinée d'hybridation et de polymérisation à 60-62ºC assurant l'hybridation et la stabilité de la sonde durant l'extension. Ceci permet aussi une activité 5'-exonucléasique maximale de la Taq polymérase mais, l'efficacité de l'activité de polymérisation de l'enzyme sera légèrement réduite à cette température sub-optimale. Pour de longs amplicons, une étape d'hybridation/polymérisation plus longue ou encore une augmentation de la concentration en Mn2+ ou Mg2+ pourraient s'avérer nécessaires pour stabiliser l'hybridation de la sonde à sa séquence cible. Les principes à respecter dans le design des sondes Taqman sont aussi applicables aux autres sondes linéaires et comprennent comme règles générales : 1) une longueur de 20-40 nucléotides, 2) un contenu en G-C variant de 40- 60%, 3) aucune partie de séquences répétées, 4) aucune séquence permettant une hybridation ou un chevauchement avec les amorces, 5) un A, un C ou un T à l'extremité 5' parce qu'un G supprime la fluorescence de l'émetteur même après clivage et, 6) une Tm de 5 à 10°C plus élevée que les amorces afin de s'assurer qu'elles s'hybrideront avant les amorces et qu'elles demeureront hybridées pendant l'étape combinée d'hybridation et de polymérisation (Bustin, 2000) (Mackay et al, 2002). Les sondes fluorescentes possèdent comme avantage par rapport aux agents se liant à l'ADN une spécificité accrue et une meilleure capacité de multiplexage. La spécificité d'hybridation entre la sonde fluorescente et sa séquence d'ADN cible réduit significativement l'émission de fluorescence non spécifique due à des mauvais appariements ou des dimères d'amorces (primer-dimers). Des réactions multiplexes peuvent être élaborées en utilisant des fluorochromes émetteurs distincts liés à des sondes différentes dans une même réaction de PCR.

La technique RTq-PCR, grâce à sa rapidité et sa sensibilité, est indispensable à plusieurs étapes de la maladie, qui seront revues postérieurement dans cette thèse, comme : avant de prescrire un traitement, et pour suivre la réponse des patients au traitement.

En effet, notamment lorsque le chromosome Ph n'est plus repéré sur le caryotype, ce test révèle s'il existe des traces infirmes de maladies (des taux de transcrit BCR-ABL très faibles), que l'on appelle la maladie résiduelle.

Le suivie de la maladie résiduelle repose sur des réponses hiérarchiques à partir d'une réponse hématologique, cytogénétique, et moléculaire évaluée par la RTq-PCR. Toutes les analyses doivent être exprimées selon l'échelle internationale. La réponse moléculaire majeure (RMM) (Tableau 5) doit être définie comme un rapport BCR-ABL ≤0.1 avec au moins 10 000 copies ABL. La réponse moléculaire profonde doit être définie comme une MR4 (rapport BCR-ABL≤0.01% avec au moins 10 000 copies ABL), ou MR4.5 (rapport BCR-ABL ≤0.0032% avec au moins 32 000 copies ABL), ou encore MR5 (rapport BCR-ABL ≤0.001% avec au moins 100 000 copies ABL) confirmée au moins trois fois avant l'arrêt des ITK (Losson et al. 2020). Chez quelques patients qui ont arrêté l'ITK avant l'établissement de la standardisation moléculaire, la maladie résiduelle minimale (MRD) est forcément définie comme un niveau de transcription BCR-ABL indétectable par PCR qualitative, confirmé dans au moins deux contrôles. La réponse cytogénétique a été évaluée selon les critères de l'European Leukemia Net (ELN) (Baccarani et al. 2009)(Soverini et al. 2011)(Meral Günes et al. 2021).

5.3 Traitement

5.3.1 Avant l'ère des thérapies ciblées

La LMC a disposé de diverses armes thérapeutiques. Au début du 20ème siècle c'était l'arsenic, ensuite le busulfan et l'hydroxyurée (Hydréa), ces derniers n'étaient que palliatifs dans le but de d'améliorer la qualité de vie des patients en phase chronique, mais n'autorisaient pas d'arrêter ou de modérer de manière considérable l'évolution de la maladie vers ses formes avancées. Parallèlement, selon les dernières recommandations du ELN, en attendant jusqu'à ce qu'un diagnostic soit établit, l'hydroxyurée peut être utilisée provisoirement (Baccarani et al. 2013). La greffe allogénique de CSH ou transplantation allogénique de CSH (allogenic stem cell transplantation (alloSCT) était, le seul traitement curatif de la LMC reconnu chez les patients jeunes dans les années quatre-vingt, puis dans les années quatre-vingt-dix ce dernier est devenue le traitement de première ligne pour tous les patients éligibles en phase chronique et en phase d'accélération précoce (Andreas Hochhaus 2007). Pourtant, dès l'introduction des ITK et en raison d'une morbidité accrue liée à la maladie du greffon contre l'hôte (GVH), la

transplantation n'est prévu qu'en cas d'échec d'une prise en charge en seconde ligne par ITK(Baccarani et al. 2013). Dans les années quatre-vingt-dix l'induction d'une réponse cytogénétique complète par l'INF alpha chez les patients ne pouvant pas bénéficier d'une allogreffe lui a permis de devenir un traitement de première ligne (Talpaz et al. 2013). Actuellement, il fournit une alternative thérapeutique pour des patients intolérants aux ITK. Il a été expérimenté dans une étude française STI571 prospective Randomized Trial (SPIRIT)(Preudhomme et al. 2010), et son association avec l'IM 400mg/j, a fait la preuve de son principe en augmentant de manière très significative le taux de RMC4.5 à 12 et 24 mois comparativement avec l'IM seul. Par rapport au bras IM seul, une autre étude a confirmé cette efficacité avec un taux de RMM significativement amélioré(Simonsson et al. 2011). Ce résultat signale le rôle encore erroné de l'immunité dans le contrôle de la leucémie.

5.3.2 L'ère des thérapies ciblées

Dans les années 1960, la LMC était traitée par chimiothérapie à l'aide de busulfan et d'hydroxyurée, qui sont deux traitements différents. Par la suite les stratégies thérapeutiques ont émergé dans les années 1970, notamment, la transplantation de cellules souches allogéniques et l'utilisation de interferon-α (Apperley et al. 2015). Une nouvelle thérapie a été approuvée en 2001 par l'agence Américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) en utilisant l'imatinib (Gleevec®) (Zitvogel et al. 2016). Les ITK représentent une avancée majeure dans la prise en charge des patients atteints de la LMC en permettant pour la première fois une thérapie ciblée.

Il existe deux types des ITK : les ITK de type I, qui ciblent la conformation active et inactive de la BCR-ABL et se lient au site de liaison de l'ATP sur le domaine tyrosine kinase de la protéine ; et les inhibiteurs de type II qui ciblent la conformation inactive de la protéine et se lient à un site adjacent au site de liaison de l'ATP disponible lorsque la boucle d'activation n'est pas phosphorylée (Sorel et al. 2017)(Hantschel 2012).

L'imatinib est une ITK de type II. Son action empêche donc la liaison de l'ATP, et bloque donc la protéine sous sa forme inactive, empêchant son autophosphorylation, et donc empêchant la phosphorylation de ses substrats (Modugno 2014). L'imatinib est le traitement de première ligne de la LMC avec une prise orale quotidienne. Selon l'IRIS, parmis1106 nouveaux patients atteints de LMC, 76% des patients traités par l'imatinib ont perdu le chromosome

Philadelphie, ce qui signifie une réponse cytogénétique complète. Ce traitement de type ITK a ainsi permis de stabiliser la pathologie dans la phase chronique, permettant aux patients de vivre normalement. Cependant, ce traitement a de nombreux effets secondaires, dont la fatigue, les maux de tête, l'anémie et la myalgie, qui sont plus courants, et parfois même entraînant une toxicité d'organes tel que le foie ou le cœur, avec allongement de l'intervalle QT associé à un risque élevé de troubles du rythme et de graves troubles ventriculaires qui restent peu fréquentes et surviennent chez moins de 1 % des patients traités par l'imatinib(Apperley et al. 2015).

Pour cela les patients traités par l'imatinib doivent être suivis de près pour évaluer leur réponse au traitement. Il existe trois types de réponses : les réponses hématologiques, cytogénétiques et moléculaires. Une réponse complète concernant la réponse hématologique correspond à la normalisation des niveaux sanguins et de la taille de la rate. Un examen est effectué toutes les deux semaines jusqu'à l'obtention d'une réponse hématologique complète, suivie d'un contrôle tous les trois mois. Ensuite, un examen est effectué tous les 6 mois jusqu'à ce qu'une réponse cytogénétique soit obtenue, puis tous les 12 à 18 mois. Enfin, une réponse moléculaire complète correspond à la disparition totale de la transcription BCR-ABL, qui est mesurée par la transcription inverse suivie d'une amplification par PCR en temps réel. Ce test est effectué tous les 3 mois selon les recommandations du réseau européen de lutte contre la leucémie (An et al. 2010).

5.3.3 Orientations futures

Le traitement standard de la LMC par des ITK implique une évaluation de routine des niveaux quantitatifs de BCR-ABL du sang périphérique tout au long du traitement. Les patients qui présentent des signes de progression précoce de la maladie sont transférés à un autre ITK (Figure 17).

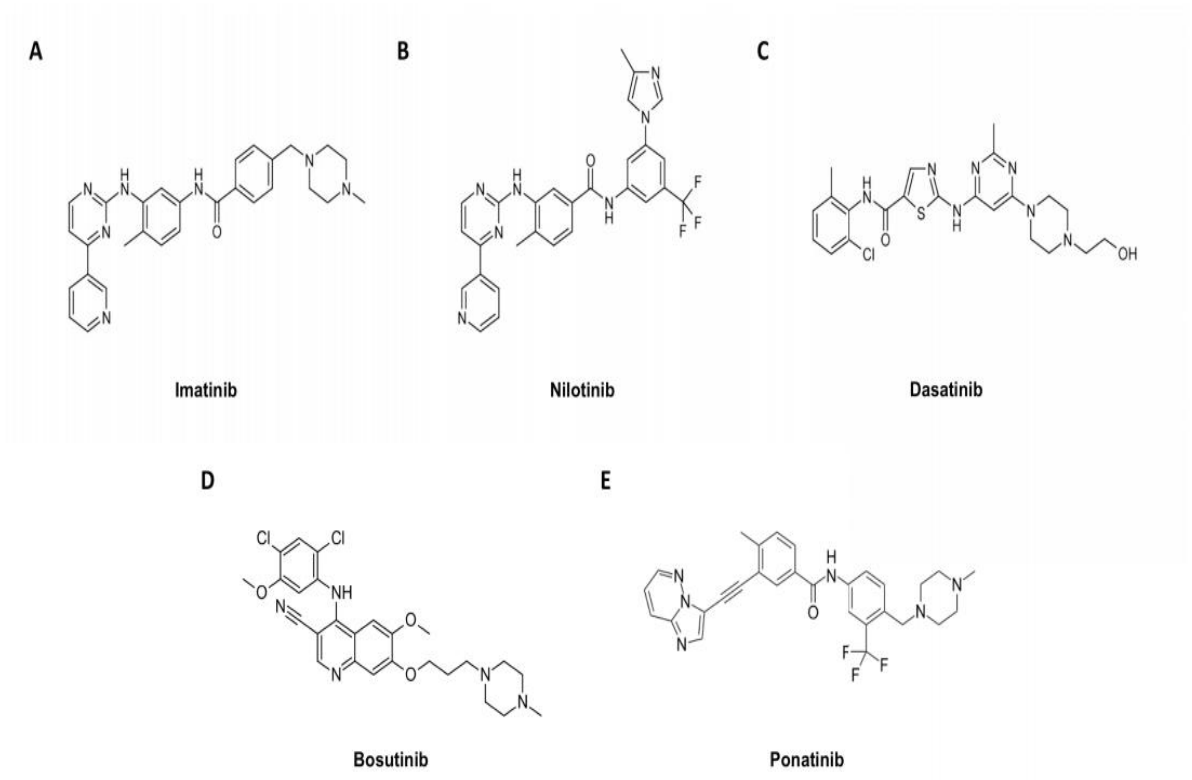


Figure 17: Structure chimique des différents inhibiteurs de la tyrosine kinase (Robert 2011)

(A) Structure de l'imatinib. Un criblage à haut débit des chimiothèques de Novartis a été effectué pour identifier une molécule, qui était appelée pyrimidine A. Ce composé servait de composé de plomb et a ensuite été testé et modifié pour développer l'Imatinib. Avec un remplacement du groupe imidazole avec un groupe benzamido, la spécificité du composé a augmenté tandis que son activité en tant que kinase est restée la même. Par la suite, l'introduction d'un substituant méthyle en ortho du groupe pyrimidinyl-amino a renforcé la puissance. (B) Structure du nilotinib. Le nilotinib est un dérivé de la phénylamino-pyrimidine qui est structurellement apparenté à l'Imatinib. (C) Dasatinib structure. Le dasatinib est une thiazolylaminopyrimidine développée sous forme de sel de chlorhydrate. (D) Structure de Bosutinib. Le bosutinib est un inhibiteur de la 4-anilinoquinoléine-3-carbonitrile. (E) Ponatinib structure. Le ponatinib est un composé dérivé de N-phénylbenzamides.

Actuellement, peu de pays en voie de développement disposent de l'infrastructure nécessaire pour suivre les patients de manière systématique de cette manière et encore moins ont accès aux TKI coûteux de nouvelle génération.

5.4 Résistance au traitement

Bien que l'imatinib soit la référence pour le traitement de la LMC, 35 à 40 % des patients développent des résistances à ce médicament (Ankathil et al. 2018).

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

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

Ces données proviennent des résultats de l'étude IRIS détaillée ci-dessus et actualisés (Assouline et al. 2011). Définition de la résistance OMS 2016.

Tableau 5: Définitions de la réponse hématologique, cytogénétique et moléculaire dans la LMC (Sorel et al. 2017)

Réponse hématologique complète
➢ Numération plaquettaire <450 cellules par µl ➢ Nombre de globules blancs <10 cellules par µl ➢ Pas de granulocytes immatures ➢ Basophiles <5% de la numération globulaire ➢ Pas de rate palpable
Réponse Cytogénétique †
➢ CCyR = 0% Ph+ métaphases ➢ PCyR = 1-35% Ph+ métaphases ➢ mCyR = 36 à 65 % de métaphases Ph+ ➢ Minimal = 66-95% Ph+ métaphases ➢ Aucune = >95% métaphases Ph+ ➢ MCyR = complet + partiel
Réponse Moléculaire ‡
➢ Major (MMR ou MR3) = réduction de 3 log par rapport à une base de référence standardisée = niveau de transcription Bcr-Abl<0,1 % à l'échelle internationale ➢ Complet (CMR ou MR4) = réduction de 4 log par rapport à une base de référence standardisée = niveau de transcription Bcr-Abl<0,01% à l'échelle internationale
† Tel qu'évalué par l'analyse conventionnelle des bandes G du chromosome en examinant au moins 20 métaphases de la moelle osseuse ; ‡ Évaluation par PCR de transcription inverse en temps réel pour les niveaux de transcription Bcr-Abl.CCyR : réponse cytogénétique complète ; CMR : réponse moléculaire complète ; mCyR : réponse cytogénétique mineure ; MCyR : réponse cytogénétique majeure ; MMR : réponse moléculaire majeure ; MR : Réponse moléculaire ; PCyR : réponse cytogénétique partielle ; Ph+ : Chromosome Philadelphie positif ; WBC : Globule blanc

Il est possible de distinguer les résistances primaires, définies comme une absence totale de réponse hématologique après 3 mois, une réponse cytogénétique après 6 mois ou une réponse cytogénétique majeure après un an de traitement ; et résistances secondaires, également appelée résistance acquise, lorsque la réponse hématologique ou cytologique précédente est perdue. Les résistances peuvent également être classés selon qu'elles dépendent ou non de BCR-ABL (Figure 18) (Danisz et al. 2013)(Alikian et al. 2017).

Les résistances dépendantes (violettes) et indépendantes (bleues) du BCR-ABL (Figure18) peuvent être expliquées par les mécanismes de duplication et de mutation du BCR-ABL, la co-médication, la variété interindividuelle, la diminution des protéines d'importation, l'augmentation des protéines d'exportation, la liaison de l'imatinib aux protéines plasmatiques et la présence de cellules souches leucémiques (CSL) insensibles à l'imatinib.

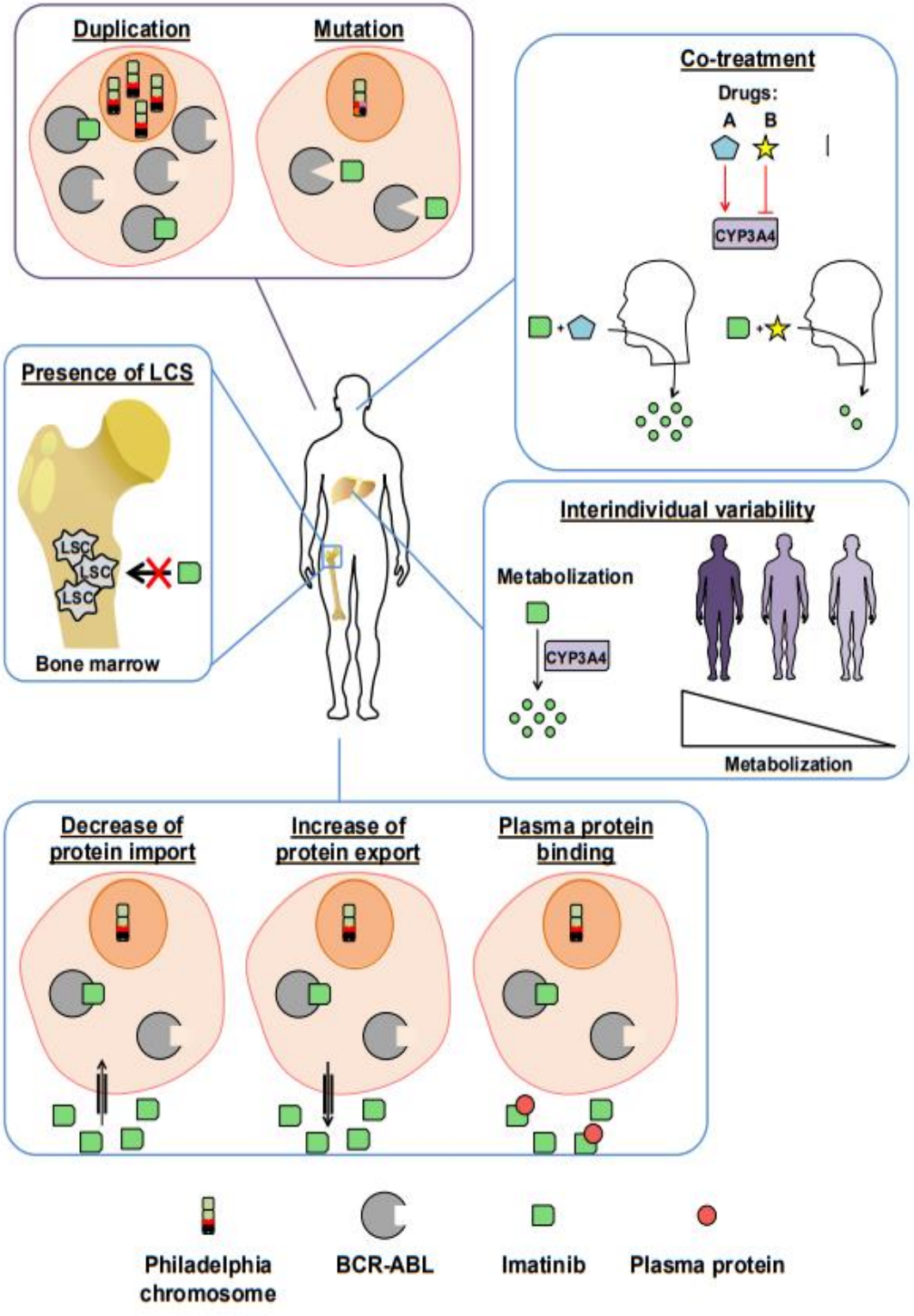


Figure 18: Résistances dépendantes et indépendantes du BCR-ABL à l'imatinib - CYP3A4 : cytochrome 3A4-(Losson et al. 2020)

Le séquençage de Sanger est la méthode que nous recommandons pour l'analyse des mutations du domaine kinase du gène de fusion BCR-ABL (Figure 19). Le séquençage direct permet de détecter les mutations présentes dans 20% des cellules Ph+(Baccarani, Rosti, and Soverini 2019).

Des études rétrospectives sur des patients au moment du diagnostic ou dans le cadre de la réponse cytogénétique complète qui ont essayé de tirer parti de méthodes très sensibles, telles que la PCR spécifique des allèles fluorescents, ont suggéré que les mutations trouvées dans de rares cellules Ph+ ne sont pas nécessairement sélectionnées ; par conséquent, leur détection n'est pas toujours en corrélation avec un échec thérapeutique ultérieur car il est impossible de prédire si ces cellules représentent un clone capable de soutenir une hématopoïèse à long terme et de concurrencer efficacement le ou les clones non mutés (Neul et al. 2016).

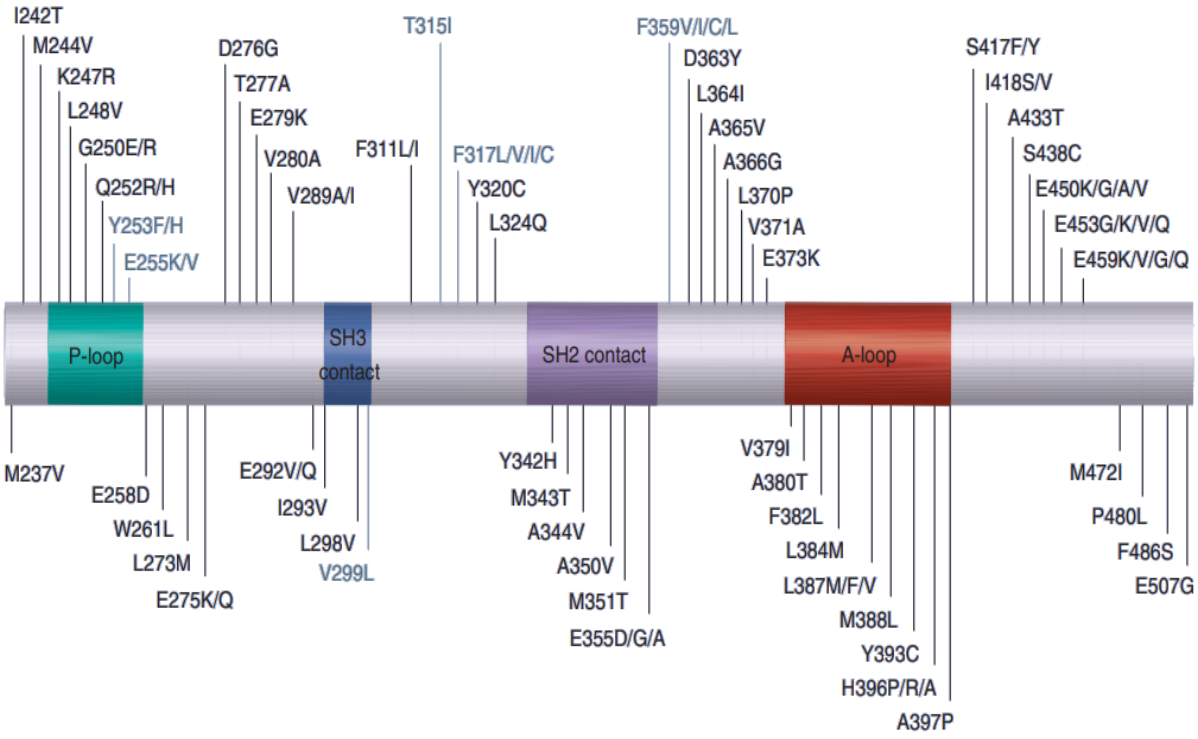


Figure 19: Substitutions d'acides aminés dans le domaine kinase BCR-ABL identifiées dans des échantillons cliniques provenant de patients déclarés résistants à l'imatinib(Soverini et al. 2011)

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

Objectifs de l'étude

L'objectif de notre thèse est de déterminer le profil génétique des patients marocains atteints de la LMC, ainsi que les facteurs de risque susceptibles de déclencher le développement des cellules leucémiques.

Objectifs spécifiques :

- ✓ Recherche des biomarqueurs habituelles, rares et de nouveaux biomarqueurs, en vue de confirmer le diagnostic et proposer une thérapie ciblée et personnalisée.
- ✓ Rechercher une éventuelle corrélation entre le type du transcrit BCR-ABL et les données cliniques et hématologiques des patients étudiés.
- ✓ Prédire la réponse au traitement en se basant sur le type du transcrit de fusion
- ✓ Suivre l'évolution de la réponse au traitement de la maladie résiduelle via la quantification des marqueurs moléculaires du gène de fusion.
- ✓ Déterminer les mutations de résistance en cernant tout le site actif du domaine tyrosine kinase après avoir effectué une PCR nichée spécifique.

✓

Matériel et méthode

1. Population étudiée

Il s'agit d'une étude prospective portant sur 123 patients recrutés entre Janvier 2016 et Janvier 2020, au niveau du service de médecine interne du CHU Hassan II de Fès.

- ✓ Critères d'inclusion des patients :
  - ➢ Patients suivis au service de médecine interne pour LMC,
  - ➢ Dont le diagnostic est retenu par les moyens disponibles notamment les données cliniques (splénomégalie, asthénie…), hématologiques (hyperleucocytose, présence de myélémie, hyperplasie de la lignée granuleuse) et cytogénétiques,
  - ➢ Quel que soit la phase de la maladie.
- ✓ Critères d'exclusion des patients :
  - ➢ Patients dont le dossier médical est inexploitable ou incomplet,
  - ➢ Patients vulnérables ou ayant refusé de signer le consentement écrit (toutes causes confondues).

Chaque patient répondant au moins aux critères d'inclusion cités ci-dessus, a bénéficié d'une consultation génétique, dans laquelle un dossier médical complet a été réalisé contenant les données personnelles. Conformément au dossier de demande d'avis du comité d'éthique, les personnes participantes à l'étude ont lu une lettre d'information décrivant les objectifs, le déroulement de l'étude, les moyens de communication des résultats ainsi que les droits des individus notamment celui de pouvoir se retirer à tout moment de l'étude. Un entretien préalable à la prise de sang a été réalisé pour chaque personne participante à l'étude par un médecin, pour s'assurer que le sujet était bien apte à subir le prélèvement sanguin. À cette occasion, nous avons répondu aux questions de nos patients, puis recueilli leurs consentements éclairés par signature du formulaire de consentement.

Ces formulaires sont conservés par la suite au service de génétique médicale au CHU Hassan II de Fès. Les données cliniques et hématologiques ont été récupérées de la base de données médicale (HOSIX) de l'hôpital.

Après consentement des patients (Annexe 4), les différents échantillons sanguins (2 à 4 ml) ont été collectés dans des tubes EDTA, et utilisés immédiatement pour l'extraction d'ARN, ou stockés à moins 80°C pour une reverse transcription ultérieure.

L’étude a été approuvée par le comité d’éthique de la Faculté de médecine et de pharmacie et du CHU Hassan II de Fès sous la référence (Réf. 14/16) (Annexe 5).

2. Caractérisation moléculaire

L’analyse moléculaire assure la détection des réarrangements de BCR-ABL. Elle est plus exacte et plus instantanée que la cytogénétique pour confirmer le diagnostic. Multiples analyses existent et présentent des approches différentes les unes des autres. La PCR multiplexe permet de déterminer les points exacts de cassure des gènes de fusion BCR et ABL.

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

2.1 Extraction d’ARN et contrôle qualité

L’ARN est une molécule intermédiaire qui permet de réguler l’expression des gènes gouvernant l’essentiel des aspects de fonctionnement d’une cellule. Son extraction peut être réalisée par un kit de purification qualifié.

Dans notre étude l’extraction d’ARN total a été effectuée en utilisant "PurLink^{TM} Total RNA Blood Purification Kit" et conservé à -80 °C jusqu'à la transcription inverse. La figure 20 illustre le Protocole suivi en vue d’extraire les ARN à partir des échantillons sanguins.

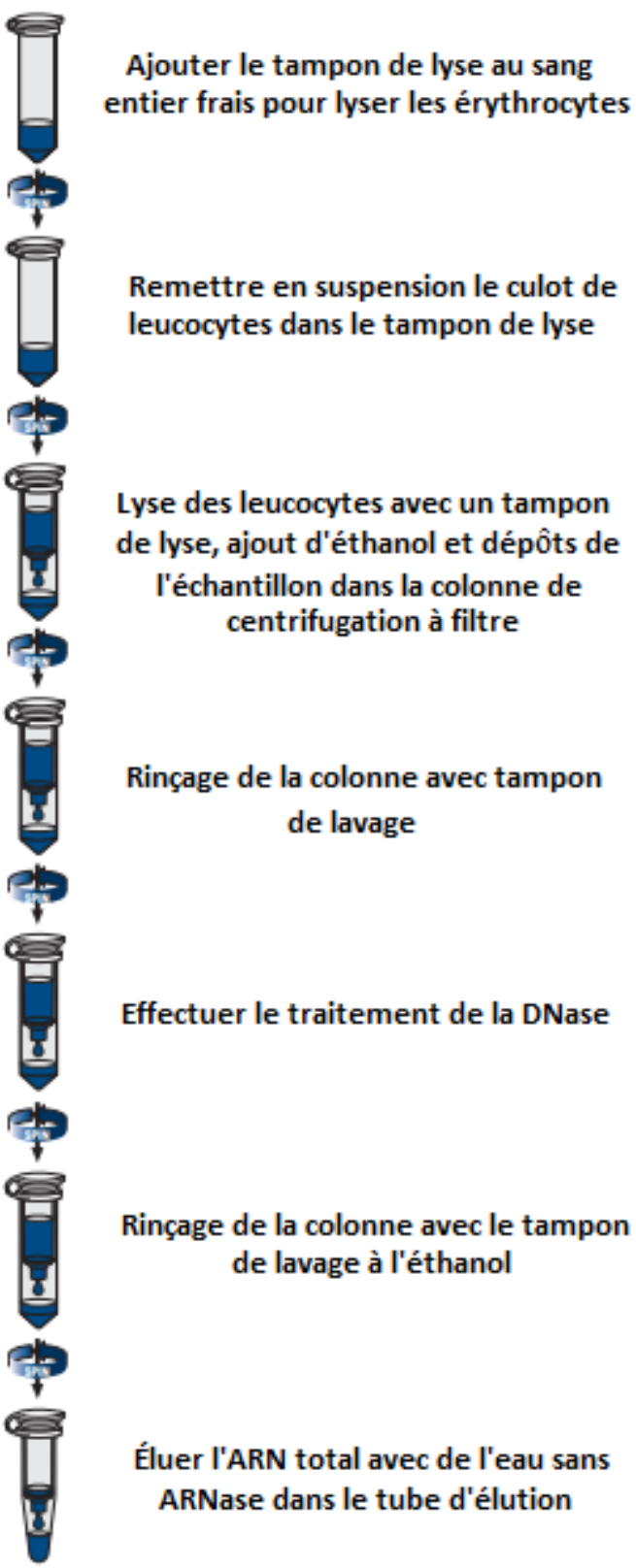


Figure 20: Protocole d'extraction des ARN à partir de sang prélevé dans les tubes "PurLink TM Total RNA Blood Purification Kit"

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

La concentration et la pureté de l'ARN ont été évaluées par Qubit®3.0 Fluorometer, qui permet la quantification spécifique d'ARN, en outre, chaque composant du kit est exempt de ribonucléase et est très éligible pour une performance optimale. L'extraction de l'ARN doit être réalisée dans les 72 heures suivant le prélèvement sanguin.

2.2 Reverse transcription

2.2.1 L'ADN complémentaire

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

2.2.2 Synthèse de l'ADNc

L'ADNc est synthétisé à l'aide du "Super Script ® VILO cDNA Synthesis Kit", à partir de l'ARN total (2µg). Le protocole suivant a été optimisé pour la génération de l'ADNc pour une utilisation par RTq-PCR en deux étapes. Le volume de la réaction peut être ajusté selon les besoins jusqu'à 100µL. La synthèse a été réalisée conformément aux instructions du fabricant. L'ADNc résultant a été dilué à 10ng/ µL et a été stocké à -20°C.

1) Pour une réaction unique, nous avons combiné les composants suivants (Tableau 6) dans un tube sur glace. Pour les réactions multiples, nous avons préparé un master mix sans ARN.

Tableau 6: Les composants du kit de synthèse d'ADNc "SuperScript ® VILO cDNA Synthesis Kit", et la quantité nécessaire pour une réaction

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

2) Le contenu du tube a été mélangé et incubé à 25°C pendant 10 minutes.

3) Le tube a été incubé ensuite à 42°C pendant 60 minutes.

4) Enfin, la réaction a été mise à 85°C pendant 5 minutes.

5) L'ADNc a été conservé à -20°C jusqu'à son utilisation, pour la PCR Multiplexe, et pour la RTq-PCR.

2.2.3 Contrôle qualité de l'ADNc synthétisé

La DNase utilisée au cours d'extraction d'ARN a permis d'éliminer la contamination de l'ARN total par l'ADN génomique. Bien que l'intégration de cette étape a pu améliorer le rendement des ADNc spécifiques, la concentration et la pureté de l'ADNc ont été évaluées à l'aide du fluoromètre Qubit ® 3.0.

2.3 Amplification par PCR multiplexe

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

2.3.1 Conception des amorces

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

Tableau 7: Séquences d'amorces utilisées dans la PCR multiplexe pour l'amplification des différents transcrits de fusion BCR-ABL et du gène ABL

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

2.3.2 Technique de la PCR multiplexe :

Après la conception des amorces, une PCR multiplexe est réalisée pour mettre en évidence le gène de fusion BCR-ABL avec ses différents variants à partir de l'échantillon d'ADNc, en utilisant deux méthodes différentes, la première avec un protocole d'amplification usuel et la deuxième par kit contenant un master mix spécifique.

2.3.2.1 PCR multiplex traditionnelle

Dans un premier temps, nous avons utilisé la technique de PCR multiplexe traditionnelle, qui constitue une réaction de polymérisation en cycles répétitifs de dénaturation-hybridation-élongation. Cette technique est assurée principalement par un programme thermique et une enzyme de polymérisation thermorésistante, la Taq polymérase. Les différents constituants de cette réaction sont détaillés dans le tableau 8.

Tableau 8: Conditions expérimentales nécessaires pour le protocole d'amplification par PCR multiplexe des gènes BCR-ABL et ABL

Conditions expérimentales			
Réactifs		**Concentration**	**Volume (µl)**
Tampon		10 X	2,5
$Mgcl_2$		50 mM	0,3 – 0,5
dNTP		10 mM	1
Séquences amplifiées	Amorce sens	10 mM	1
	Amorce anti-sens	10 mM	1
Taq		5 u/µl	0,2
ADNc		30 ng/µl	1
H_2O		-	Qsp
Volume total		25 µl	

Le programme du thermocycleur est détaillé dans le tableau 9. Ces protocoles ont nécessité initialement des essais d'optimisation pour améliorer la qualité des bandes d'ADN observées sur le gel d'électrophorèse. Aussi pour chaque essai de PCR, un témoin négatif exempt d'ADN a été associé à l'ensemble des échantillons traités, ce qui permet de contrôler la qualité de la manipulation et s'assurer de l'absence des contaminants d'acides nucléiques.

Tableau 9: Le programme du thermocycleur nécessaire pour le protocole d'amplification par PCR multiplexe des gènes BCR-ABL et ABL

Programme de PCR			
Etapes	**Température (°C)**	**Durée**	**Nombre de cycles**
Dénaturation initiale	94	7 min	1
Dénaturation	94	35 s	40
Hybridation	60	30 s	
Elongation	72	40 s	
Elongation finale	72	10 min	1

2.3.2.2 PCR multiplexe par kit

La PCR multiplexe a été réalisée dans un volume réactionnel final de 25 µL contenant 10 µL de Phusion U Multiplex PCR Master Mix (Thermo Scientific™), 3 µL d'eau, 2 µL d'ADNc et 1 µL de chaque amorce utilisant le système de PCR à 3x32 puits ProFlex™ (AppliedBiosystems). Le programme du thermocycleur était de : dénaturation initiale : 98 °C pendant 30 s, 35 cycles d'amplification de 94 °C pendant 10 s 60 °C pendant 10 s 72 °C pendant 25 s et élongation finale de 72 °C pendant 8 minutes.

2.4 Quantification par PCR quantitative en temps réel

2.4.1 RT-PCR quantitative

Il existe plusieurs façons d'analyser une cellule pour détecter les changements induits par des agents artificiels ou naturels au cours d'un processus biologique. L'une d'entre elles consiste à rechercher les modifications au niveau de la transcription cellulaire qui peuvent indiquer des changements dans les protéines correspondantes et fournir des informations précieuses pour la mise au point d'un régime de traitement. La technologie de la PCR quantitative en temps réel (RTq-PCR) peut être utilisée pour offrir les informations requises.

Une mise en œuvre réussie de cette technologie exige des utilisateurs ayant une connaissance de base des principes théoriques de la PCR en temps réel ainsi que ses applications pratiques.

La RTq-PCR est une méthode à haute sensibilité nécessaire pour surveiller les patients traités avec des régimes induisant une réduction marquée de la charge tumorale. Il a été démontré que les techniques de PCR, telles que la RT-PCR ou, la PCR multiplexe, ciblant l'oncogène BCR-ABL ou l'onco-ARNm, permettent de détecter le gène de fusion de la LMC avec une grande sensibilité. Au cours de la dernière décennie, des tests RT-PCR quantitatifs (RTq-PCR) ont été mis au point pour mesurer les niveaux de transcription du gène BCR-ABL dans le sang périphérique et la moelle osseuse, ce qui permet de suivre la dynamique de la maladie résiduelle dans le temps.

En 1996, Applied Biosystems (ABI) a rendu la PCR en temps réel disponible dans le commerce (Gibson et al., 1996) avec l'introduction de l'instrument 7700. La PCR quantitative en temps réel est devenue la méthode la plus précise et la plus sensible pour la détection et la quantification des acides nucléiques jamais conçue. Cette méthode a surmonté la plupart des principales lacunes des précédentes. En utilisant la spécificité et la sensibilité de la PCR combinée à la détection directe de la cible de choix à l'aide d'amorces, de sondes ou de colorants marqués par fluorescence, les problèmes inhérents aux gels, au transfert sur une membrane, à l'hybridation des sondes radioactives et aux limites du film comme détecteur ont été éliminés. Deux problèmes cependant subsistent pour la PCR en temps réel. Il s'agit 1) des méthodes de quantification, c'est-à-dire le type de norme, la qualité du test et la méthode de calcul utilisée et 2) de la façon de normaliser correctement différents échantillons pour corriger les différences d'apport d'acide nucléique d'un échantillon à l'autre. Ces deux domaines font l'objet de nombreuses études

2.4.2 Protocole expérimental de la RTq-PCR

L’action du Taq Man Gene Expression Assay (Tableau 10) peut être simplifiée davantage en incorporant le Taq Man Gene Expression Master Mix. Le Taq Man Gene Expression Master Mix est concentré, et tous les réactifs nécessaires sont pré-mélangés, ce qui réduit le temps de manipulation pour la dilution, le mélange et le pipetage. Le Taq Man Gene Expression Master Mix permet une détection sensible et spécifique sur un large éventail de

quantité d'échantillon, jusqu'à une seule copie de la cible. Pour faciliter l'utilisation, Taq Man Gene Expression Master Mix utilise des conditions de cycle thermique universelles et les utilisateurs peuvent régler la réaction à température ambiante.

Tableau 10: TaqMan Gene Expression Assays du gène BCR-ABL et de l'endogène ABL

BCR-ABL TaqMan Gene Expression Assays	
Assay ID	**Transcript**
Hs03024541_ft	b3a2
Hs03024646_ft	b2a2
Control endogen: ABL TaqMan Gene Expression Assays	
Gene	**Assay ID**
ABL	Hs 99999002_mH

Protocole expérimental

- Déterminer le nombre total de réactions PCR, y compris un contrôle hautement positif, un contrôle négatif ainsi que l'étalon IS-MMR. Ces témoins permettent de surveiller les étapes de transcription inverse et d'amplification des gènes ABL et BCR-ABL lors de la quantification des transcrits. L'étalon IS-MMR permet également de convertir le nombre de copies normalisé selon l'Échelle internationale

Note : Nous utilisons trois réplicas pour chaque test.

- Décongelez le TaqMan® Fast Advanced Master Mix sur de la glace, puis mélangez soigneusement et doucement.

- Décongeler les tests TaqMan® sur de la glace, puis passer au vortex et à la centrifugeuse pour les remettre en suspension.

- Décongeler les échantillons sur de la glace, puis les passer à la centrifugeuse et au vortex pour les remettre en suspension.

1. Combinez les éléments suivants pour le nombre de réactions requises, plus 10 % de dépassement.

Tableau 11: Conditions expérimentales nécessaires pour la préparation de la réaction RTq-PCRpour la quantification des gènes BCR-ABL et ABL en temps réel

Composants	**Volume par réaction**	**Concentration finale**
	Plaques de 48 puits	
TaqMan® Fast Advanced Master Mix (2X)	10 µL	1X
TaqMan® Assay (20X)	1 µL	1X
Nuclease-Free Water	9 µL	-
Volume total par reaction	20 µL	-

2. Vortexer brièvement pour mélanger.
3. Centrifuger brièvement pour amener le mélange réactionnel au fond du tube et éliminer les bulles d'air.
4. Transférer le volume approprié de mélange réactionnel de la PCR dans chaque puit de la plaque de réaction d'un appareil optique.
5. Ajouter un échantillon d'ADNc (1 pg à 100 ng dans de l'eau pure), à chaque puits : 5 µL pour la plaque à 48 puits (ajuster le volume d'eau pure dans la réaction PCR pour un plus grand volume d'ADNc).
6. Sceller la plaque de réaction avec un film adhésif optique, puis centrifuger brièvement pour amener le mélange réactionnel PCR au fond du puit et éliminer les bulles d'air.
7. Sur l'appareil StepOne™ System (48 puits-Fast), on constitue un document d'expérience en respectant les conditions mentionnées sur le tableau 10. et on lance la technique.

Tableau 12: Le programme du StepOne™ System nécessaire pour le protocole d'amplification par RTq-PCR pour la quantification des gènes BCR-ABL et ABL en temps réel

Système PCR en temps réel	Paramètres	UNG Incubation	Activation de la polymérisation	PCR (40cycles)	
StepOne™ System (48 puits-Fast)	Température (°C)	50	95	95	60
	Temps (mm:ss)	02:00	02:00	00:01	00:20

En utilisant des standards ayant un nombre connu de molécules, on peut établir une courbe standard et ainsi déterminer la quantité de cible exacte présente dans l'échantillon. Les courbes standards qu'on a utilisées sont basées sur les plasmides. Nous avons utilisé 3 dilutions plasmidiques standards (10^3, 10^4, et 10^5 copies/5 µL) pour le gène contrôle (ABL) et 5 dilutions standards (10^1, 10^2, 10^3, 10^5, 10^6 copies/5 µL) pour le gène de fusion (BCR-ABL) afin de garantir la précision des courbes standards (Figure 21).

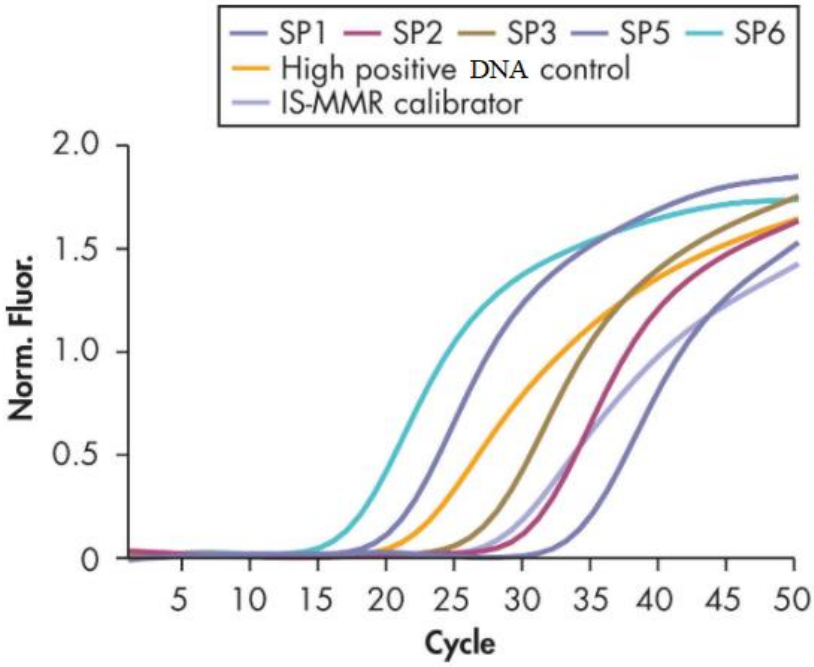


Figure 21: Détection précise des standards plasmidiques BCR-ABL. Standards plasmidiques BCR-ABL (SP1-SP6), 10^1, 10^2, 10^3, 10^5, 10^6 copies/5 µL

Pour chaque gène (ABL et BCR-ABL), les valeurs brutes de CT obtenues à partir des dilutions plasmidiques standard sont représentées sur un graphe en fonction du nombre de copies log.

Les standards étant des dilutions au dixième, la pente théorique de la courbe est de –3,3. Une pente comprise entre –3,0 et –3,9 est acceptable tant que R^2 est > 0,95. Toutefois, une valeur de détermination $R^2 > 0,98$ est souhaitable pour obtenir des résultats précis.

Le nombre de copies (CN) des gènes BCR-ABL et ABL des échantillons inconnus est calculé par le logiciel en utilisant l'équation de la courbe standard.

Le ratio des deux valeurs des CN permet d'obtenir le nombre de copies normalisé (NCN) pour déterminer la maladie résiduelle :

NCN = (BCR-ABL CN / ABLCN) x 100

2.5 PCR simplexe et Séquençage

2.5.1 PCR simplexe

Pour augmenter la sensibilité et la spécificité de l'amplification du domaine ABL kinase, nous avons utilisé une approche PCR Nichée qui consiste à réaliser deux PCR successives en utilisant des couples d'amorces différents. Le deuxième couple d'amorces encadre une séquence incluse dans celle qui est amplifiée par le premier couple d'amorces.

Le premier cycle d'amplification a été réalisé avec 2 µL d'ADNc et les amorces suivantes : F-BCR-A (positionnée entre exons 12 et 13 sur ARNm BCR) et R-ABL-A (positionné sur l'exon 8 sur ARNm ABL. La position des amorces et les séquences sont détaillées dans le tableau 11).

Cette procédure garantit que le transcrit ABL de type sauvage, non réarrangé ne soit pas analysé.

Une étape de dénaturation initiale de 5 min à 95 ° C a été suivie d'une amplification pendant 30 cycles (dénaturation pendant 40 s à 95 ° C, hybridation pendant 1 min à 60 ° C, extension pendant 1 min à 72 ° C) et extension finale pendant 7 min à 72 ° C.

On a procédé ensuite à la réamplification d'un aliquot de 1 µL à partir d'une dilution de 1/50 du premier produit PCR (1 µL de produit PCR et 49µL d'eau stérile) en utilisant les paires d'amorces internes : F-ABL-B / R-ABL-B et F-ABL-C /R-ABL-C (Tableau 11). De cette manière, le domaine ABL kinase a été divisé en deux fragments partiellement chevauchants, c'est-à-dire ABL-B (393 pb, couvrant les codons 206-335) et ABL-C (482 pb, couvrant les codons 262–421).

Tableau 13: Paires d'amorces utilisées pour la PCR nichée

Amorce	Séquence 5'-3'	Positions [a]	Amplicon
F-BCR-A	GAG CAG CAG AAG AAG TGT TTC AGA	BCR (nt 3075–3098)	A [b] (1475 bp (b3a2) or 1401 bp (b2a2))
R-ABL-A	CTC TAG CAG CTC ATA CAC CTG GG	ABL (nt 1484–1506)	
F-ABL-B	CAT CAT TCA ACG TGT GCC GAC GG	ABL (nt 748–770)	
R-ABL-B	GTT GCA CTC CCT CAG GTA GTC	ABL (nt 1120–1140)	
F-ABL-C	GAA GAA ATA CAG CCT GAC GGT G	ABL (nt 930–951)	
R-ABL-C	CGT CGG ACT TGA TGG AGA A	ABL (nt 1393–1411)	

[a] : Les positions des amorces sont conformes aux séquences d'ARNm X02596 (pour BCR) et X16416 (pour ABL) de la GenBank.
[b] : La longueur de l'amplicon obtenu après la première PCR varie légèrement selon la jonction BCR-ABL est b2a2 ou b3a2.

Les 2 PCR ont été réalisées dans un volume final de 25 µL utilisant le kit dream taq green PCR master Mix (tableau 14) et les amorces décrites dans le tableau 13.

Tableau 14: Protocole d'amplification par PCR du gène ABL

Conditions expérimentales		**Programme de PCR ABL**			
Mix PCR de la Dream Taq Green	10 µL	Etape	Température (C)	Durée	Nombre de cycles
Amorce F	1 µL	Dénaturation initiale	95	2min	1
Amorce R	1 µL	Dénaturation	95	30s	30
ADN	5 µL	Hybridation	5	30s	
Eau pure	8 µL	Elongation	72	1min	
Volume total	25 µL	Elongation finale	72	10min	1

2.5.2 Séquençage

Après réalisation de la PCR nichée pour amplifier le domaine ABL kinase, nous avons procédé au séquençage des produits PCR obtenus. Cette technique, qui se base initialement sur l'idée de Fréderick Sanger, a reconnu depuis un énorme progrès consistant en l'utilisation de kits spécifiques, de marquage par quatre types de fluorochromes, ainsi que l'automatisation du processus.

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

Deux étapes de purification dont le rôle principal est d'éliminer l'excès des réactifs qui peuvent gêner les étapes suivantes, accompagnent ce processus. Les paragraphes suivants résument les différentes étapes du séquençage avec les réactifs correspondants. Les références de l'automate et des kits utilisés dans la technique du séquençage sont illustrées dans l'Annexe 6.

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

- **Purification des produits PCR**

Les produits PCR sont purifiés grâce à deux enzymes hydrolytiques ; l'exonucléase I et la phosphatase alcaline. Le mélange réactionnel est présenté dans le tableau 13.

Tableau 15: Le mélange réactionnel de la purification par ExoSap

Réactif	Volume en µL
Produits PCR	4
ExoSap	1

Le programme usuel utilisé est présenté dans la figure suivante :

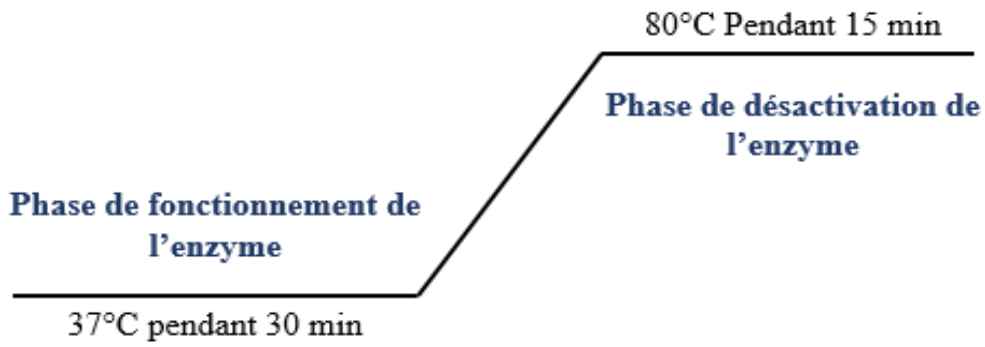


Figure 22: Le programme des cycles de la purification par ExoSap

- **Réaction de séquence**

Les produits PCR purifiés sont amplifiés linéairement au cours de la réaction de séquence. Le mélange réactionnel est présenté dans le tableau 14.

Tableau 16: Le mélange réactionnel de la réaction de séquence

Réactif	Volume en µL
Tampon	2
Eau pure	1
Amorce (F ou R)	1
BigDye	2
Produits PCR purifiés	4

Le programme usuel utilisé est présenté dans la figure suivante :

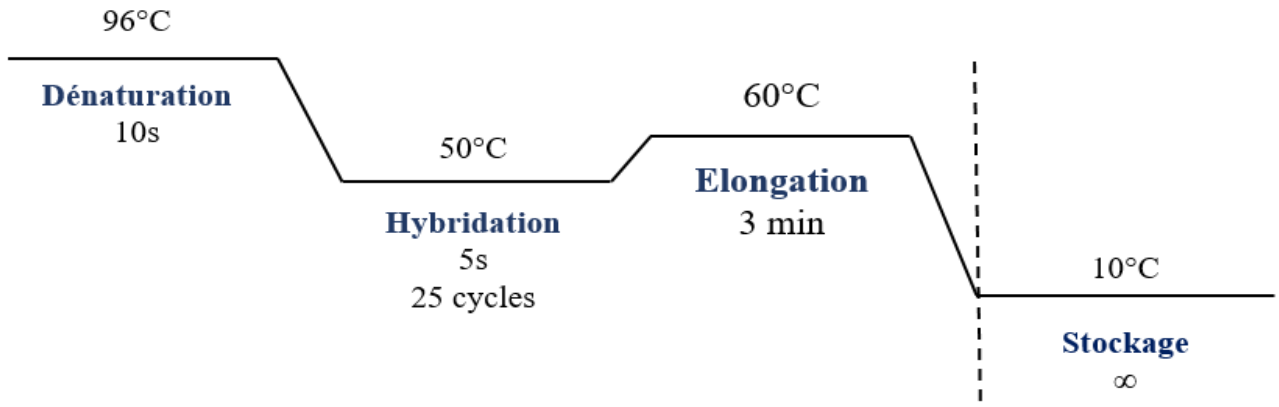


Figure 23: Le programme des cycles de la réaction de séquence

- **Purification du produit de la réaction de séquence**

Les produits de séquence sont purifiés en utilisant le kit BigDye® XTerminator™. Le tableau 15 représente les différents réactifs utilisés pour la purification.

Tableau 17: Le mélange réactionnel de la purification du produit de réaction de séquence

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

Les produits de séquence peuvent être conservés avant et après purification à -20°C. Le séquençage (électrophorèse capillaire et capture de la fluorescence des fragments par caméra CCD) est réalisé sur l'analyseur de séquences 3500Dx Geneticanalyzer (AppliedBiosystems, Life Technologies) (Figure 24). Les séquences obtenues ont été visualisées en utilisant le logiciel Sequencinganalysis v3.4 qui permet d'évaluer la qualité des séquences.



Figure 24: Applied Biosystems 3500Dx genetic analyzer

3. Caractérisation bio-informatique

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

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

- ✓ **Alignement des séquences avec BLAST**

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

Nous avons aligné nos séquences à celles présentes dans la base de données de NCBI via l'outil « Nucleotide BLAST » (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov). Le principe de cet outil consiste à chercher parmi toutes les séquences de la base de données celles représentant les successions nucléotidiques les plus similaires à la requête entrée. Selon les options cochées, telles que l'espèce et le degré de similarité, BLAST effectue sa recherche d'une façon plus ciblée. Après cette analyse, BLAST présente les informations des séquences les plus similaires, avec le pourcentage d'identité correspondant. Il affiche également l'alignement détaillé des séquences similaires. En cas d'absence de mutations, la succession des nucléotides de la séquence requête doit être complètement identique à celle de la séquence de référence d'une personne saine, alors qu'en présence de variants, le pourcentage d'identité diminuera en fonction du nombre des différences détectées.

- ✓ **Positionnement et nomenclature des variants**

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

L'option CCDS affiche la séquence codante consensus du gène recherché, commençant par le codon initiateur ATG, et finissant par le codon stop. Ainsi, nous nous sommes servis de cet outil pour préciser la position du nucléotide exonique muté par rapport au premier nucléotide de l'ATG initiateur de la séquence codante CCDS (Consensus CodingSequence).
L'option CCDS affiche également la séquence protéique du gène recherché, ce qui permet également l'identification de la position de l'acide aminé affecté par rapport au codon Méthionine initiateur. De plus, cet outil dispose de la possibilité d'identifier le trinucléotide renfermant le variant nucléotidique (selon le cadre ouvert de lecture correspondant), ce qui permet de déterminer le nouvel acide aminé généré après mutation, en se référant au code génétique.

Après réunion de ces informations (la position nucléotidique, la position protéique, le trinucléotide sauvage et muté et l'acide aminé généré), nous nous somme basés sur les dernières recommandations de l'HGVS pour générer les nomenclatures des différents variants détectés.

- ✓ **Recherche des variants dans les bases de données**

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

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

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

En cas d'absence du variant détecté dans les bases de données ainsi que dans les articles qui rapportent le résultat d'exploration du gène étudié, ce variant pourrait alors s'avérer un nouveau variant, non décrit dans la littérature. Des études complémentaires doivent être établies dans ce cas pour prouver son caractère pathogène.

✓ **Alignement multiple des séquences**

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

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

Dans le but d'évaluer l'impact pathogénique des variants non-synonymes sur la fonction de la protéine, nous nous sommes servis des outils de prédiction *in-silico*. Il s'agit de logiciels bio-informatiques qui prédisent l'impact clinique le plus probable d'un variant en se basant sur l'évaluation de différentes caractéristiques. Il existe deux groupes majeurs d'outils de prédiction : les outils de prédiction qui se basent sur l'évaluation du degré d'homologie de la séquence protéique avec ses homologues ; et les outils dits « hybrides » qui se basent sur l'évaluation des caractéristiques structurelles de la protéine (la conformation tridimensionnelle, l'emplacement du variant par rapport à un domaine fonctionnel…), en plus des caractéristiques de l'homologie. Ainsi, nous avons opté pour l'utilisation de deux outils de prédiction appartenant respectivement à ces deux groupes, et qui sont largement utilisés pour leurs performances. Il s'agit de PROVEAN (http://provean.jcvi.org/), et PolyPhen-2 (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/).

4. Analyse statistique

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

Résultats et discussion

Résultats

La leucémie myéloïde chronique est une hémopathie maligne bien connue qui se caractérise par une prolifération et un développement incontrôlé des cellules hématopoïétiques. Chez la plupart des patients cette leucémie se définie par la translocation t (9 ; 22) (q34 ; q11), entraînant la formation du chromosome Philadelphie portant la région de l'amas de points de cassures des oncogènes chimériques BCR-ABL. Normalement, la leucémie chronique met des mois et des années à progresser. Elle survient principalement chez les personnes âgées mais peut également se produire chez les jeunes.

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

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

1. Caractérisation épidémiologique de la population LMC étudiée

Nous avons recruté un total de 130 patients du mois de Janvier 2016 jusqu'au mois de Janvier 2020. Trois patients ont refusé de signer l'approbation du comité d'éthique (Figure 25), alors que quatre patients avaient un syndrome myéloprolifératif, autre que la LMC. Les patients retenus dans notre série étaient des individus diagnostiqués avec LMC dont 89 nouveaux cas, et 34 anciens adressés du service de médecine interne du CHU Hassan II Fès, pour une évaluation moléculaire. Le recrutement de nos patients a impliqué principalement ceux de la région de Fès-Meknès.

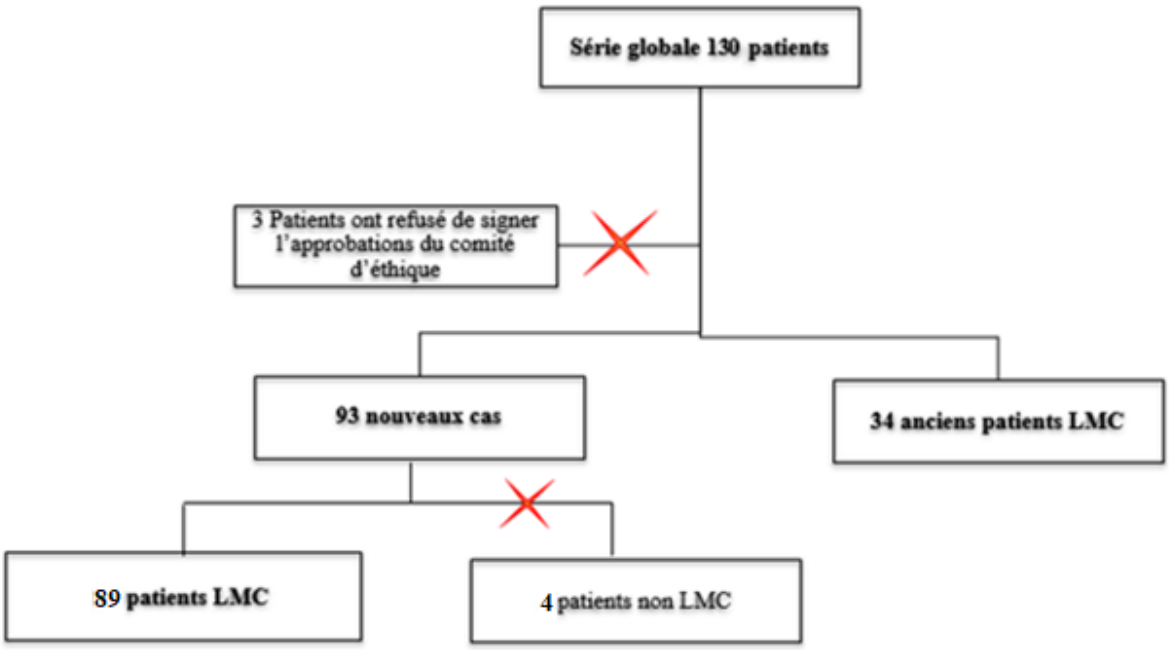


Figure 25: Diagramme des patients concernés par l'étude

1.1 Caractéristiques démographiques

Cent vingt-trois patients ont été recrutés dans l'étude, dont l'ensemble des caractéristiques démographiques au diagnostic est résumé dans les figures suivantes. Notamment, 48% de femmes et 52% d'hommes avec un sexe ratio H:F de 1,08:1, une légère prédominance masculine (Figure 26), et un âge moyen de 50,11±15,31 ans (18-86 ans).

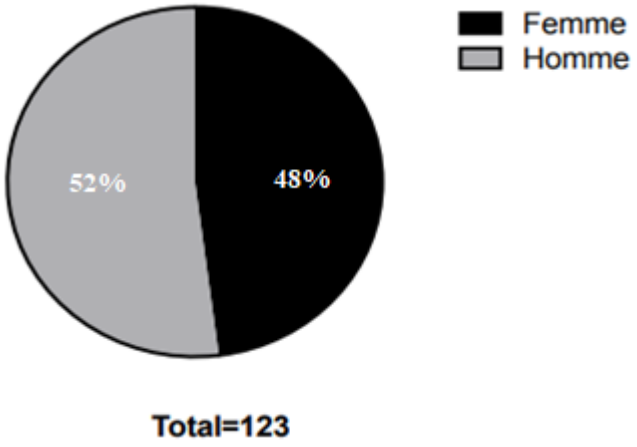


Figure 26: La répartition des deux sexes dans la population

Sur les 123 patients, 32 % avaient moins de 45 ans et 68 % étaient âgés de 45 ans ou plus. La moyenne d'âge chez les hommes est de 53 ans alors qu'elle est de 47,5 ans chez les femmes (Figure 27), en générale la médiane d'âge est de 50 ans.

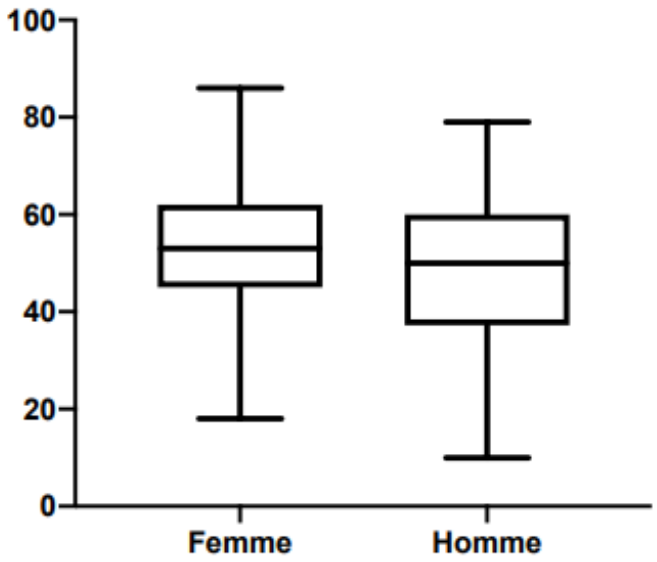


Figure 27: Diagramme des moyennes d'âge chez les deux sexes

Dans notre population,les tranches d'age de 18 ans à 30ans,31 ans à 40 ans, 51 ans à 60 ans, et de 71 ans à80 ans sont des groupes d'age plus dominants chez les hommes que chez les femmes, alors que la classe d'age de 41 ans à 50 ans s'avère considérablement prédominante chez les femmes par rapport à son analogue chez les hommes.Les tranches d'age de 61 ans à

70 ans sont très proches ches les deux sexes alors que la classe supérieure à 80 ans est absente chez les hommes (Figure 28).

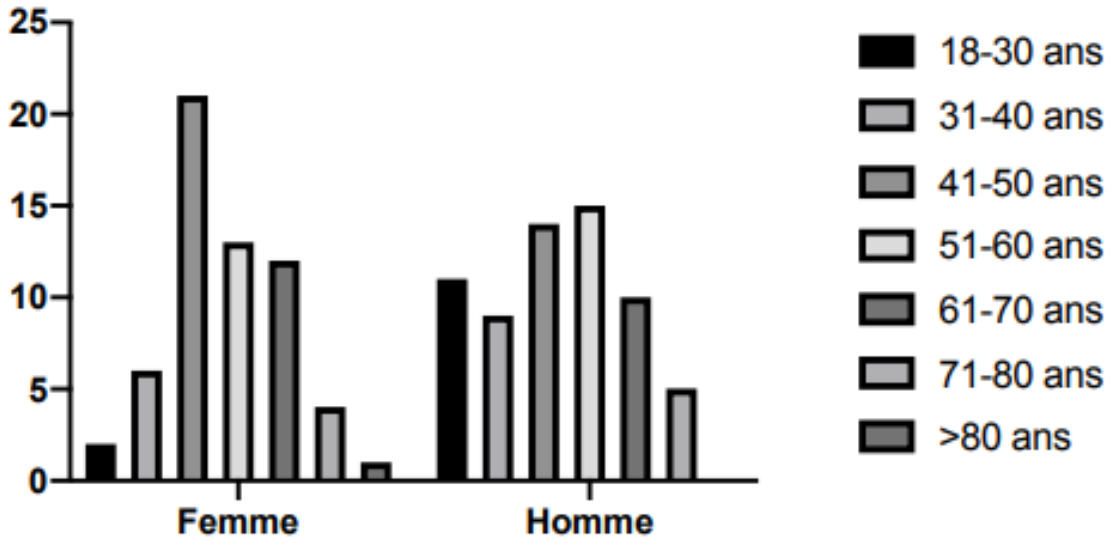


Figure 28: Diagramme de comparaison des moyennes d'âge selon le sexe

1.2 Caractéristiques cliniques

La leucémie myéloïde chronique émerge en trois phases différentes qui se succèdent les unes après les autres, dans notre étude, La phase chronique est le stade dominant dans la plupart des cas, 103 patients parmi les 123 (84%) sont à cette étape-là, suivis par une phase accélérée chez 12 % des patients (15/123) et une crise blastique chez 4 % des patients (5/123) (figure 29). Le rapport entre les hommes et les femmes à chaque stade était de 1,1:1 pour la phase chronique, 1:0 pour la phase accélérée et 1:0 pour la phase blastique.

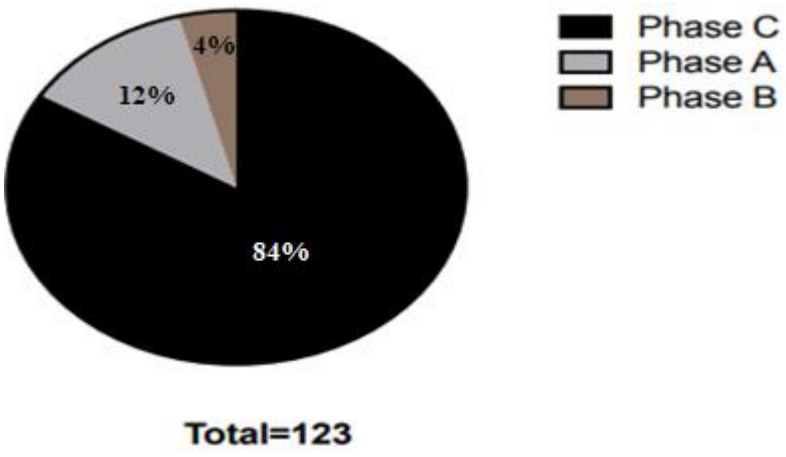


Figure 29: La répartition des phases de la LMC

La cause de cette évolution demeure inconnue. De ce fait, nous nous sommes penchés sur l'analyse des symptômes en fonction des phases de la maladie (Tableau 16), dans l'objectif de discerner une corrélation perceptible et réciproque.

Durant notre étude, plus de 80% de notre population est dans la phase chronique avec un pourcentage majoritaire des hommes atteignant 43,26 % et un pourcentage des femmes qui touche les 40%. Les trois quarts de notre échantillon au long des trois phases sont des patients dont l'âge est supérieur à 45 ans (Annexe 7).

Au cours de l'investigation nous avons considéré la présence/absence de la symptomatologie pendant chaque phase séparée, Les données ont été rassemblées de la base de données médicale (HOSIX) du centre hospitalier universitaire Hassan II Fès, et des dossiers des patients au niveau du service de médecine interne du même hôpital.

Conformément à l'organisation mondiale de la santé la splénomégalie qui est une augmentation du volume de la rate (Maynadié 2017), révélée par l'échographie abdominale confirmant la nature splénique de la masse palpée qui est normalement de 12 à 14 cm pour le grand axe (longueur), 4 à 8 cm pour l'axe transversal (épaisseur), 6 à 12 cm pour l'axe antéropostérieur (largeur)(Pierre Aubry 2018), est un symptôme caractérisant les patients touchés par la LMC. Dans notre cohorte, 49,76% et 17,88% des individus explorés manifestent respectivement une splénomégalie et une hépatosplénomégalie (accroissement simultané de l'ampleur de la rate et du foie), tandis que 25,20% montrent une plénitude abdominale dont plus de la moitié expriment des douleurs abdominales. L'asthénie et l'amaigrissement sont des symptômes réputés chez les patients avec LMC, dans notre population 20,08% présentent une asthénie et 18,73% un amaigrissement (Tableau 16) et (Annexe 7).

Tableau 18: Présentation de l'âge, le sexe, et les symptômes en nombres, et en pourcentage selon la phase de la maladie dans notre population

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

	Oui	3	2,91	0	0	0	0

*(NTP: nombre total des patients, PC: phase chronique, PA: phase accélérée, PB: phase blastique)

Dans notre étude 40% de nos patients , aux alentours de 48% de la population en phase chronique présentent une splénomégalie, autrement dit une hypertrophie de la rate dépassant 5 cm sous l'arc costal, tandis que l'autre moitié des patients présentent une rate modérément hypertrophiée (<5 cm), et 10,57 % de notre cohorte-ce qui veut dire 12,62% des patients en phase chronique- ont une hépatosplénomégalie, tandis que 87,38 % présentent une hépatosplénomégalie modérée ou discrète, ce dernier pourcentage (12,62%) est le même exprimé pour l'anémie (Tableau 19).

Continuellement avec la phase prépondérante l'asthénie et l'amaigrissement sont des symptômes importants exprimés respectivement chez 32,04% et 20,39% des patients.

La plénitude abdominale est notée chez 22,33% des patients dont plus de la moitié proclame des douleurs abdominales. Cette entité correspond exactement à 14,56%, la même proportion des individus rapporte une fièvre et une altération de l'état générale. Des symptômes comme les nausées, l'anorexie, la pâleur cutanée, et l'ichthyose, ont été rapportés chez 4% à 9% des cas. D'autres symptômes plus rares sont signalés chez 2,91% des patients, comme la tachycardie, la toux, la diarrhée et la dyspnée. Cliniquement, lors de la phase chronique de la maladie les sueurs nocturnes et satiété précoce, sont d'autres signes cliniques que l'on peut retrouver.

La phase accélérée est une étape cruciale très symptomatologique présente chez 15 patients de notre population, et caractérisée au niveau de notre étude, par une splénomégalie remarquable touchant 80% de la population et les 20% restant présentent une hépatosplénomégalie. 53,33% des cas manifestent des plénitudes et des douleurs abdominales, 40% demeurent avec une altération de l'état générale, tandis que 26,67% des cas indiquent une asthénie, anémie, et une apyrexie. L'amaigrissement est présent chez 13,33% des patients.

La phase blastique est une crise grave dont 5 cas seulement de notre cohorte sont à ce stade-là, et les 5 patients manifestent une hépatosplénomégalie avec altération de l'état générale (Tableau19).

1.3 Caractéristiques hématologiques

Le plus souvent, la découverte de la maladie est fortuite, liée à une énorme augmentation des leucocytes. Les phases de la LMC sont déterminées sur tout en termes de nombre de cellules souches immatures qu'on appelle les blastes dans la moelle et dans le sang. Plus on retrouve de cellules immatures dans ces tissus, et plus la maladie sera à un stade avancé. L'examen de référence pour évoquer le diagnostic de LMC est l'hémogramme ou NFS (Numération Formule Sanguin), et c'est le premier examen qui sera effectué (Annexe 8).

Tableau 19: Résultats hématologiques de notre étude avec les intervalles des valeurs normales

	Moyenne ± écart-type	**Minima-Maxima**	**Valeurs normales**
Leucocytes (10^9/L)	319,1 ± 172,5	2,9-756	4 - 10
Hémoglobine (g/dL)	5,514 ± 3,644	1,14-18	4,50 - 7,20
Les plaquettes (10^9/L)	387,0 ± 208,1	39-1400	150 - 400
Blastes (%)	6,951 ± 11,55	1-93	0 – 0,26

En règle générale, notre étude montre tout d'abord une forte hyperleucocytose avec un taux moyen de globules blancs de l'ordre de 319,1.10^9/litre plus ou moins 172,5.10^9/litre (une valeur normale doit être entre 4.10^9/litre et 10.10^9/litre) (Tableau 20). Cette hyperleucocytose est spécialement constituée de polynucléaires neutrophiles, mais dont le taux ne sera que de l'ordre de 30 à 50%, car elle est souvent associée à une forte myélémie.

La myélémie est la transition anormale d'éléments immatures de la granulopoïèse (comme les promyélocytes, les myélocytes, les métamyélocytes et à moindre degré les myéloblastes) dans la circulation sanguine. Au niveau de la présente étude nous avons décelé un pourcentage des blastes de l'ordre de 6,951% avec un écart-type allant jusqu'à 11,55% (Tableau 17).

Un syndrome anémique léger est aussi souvent présent dans notre cohorte, et il est très sévère ou bien absent complètement selon les cas. Généralement la moyenne dans notre analyse est de 5,514g/dL plus ou moins 3,644g/dL. (Tableau 20).

Par ailleurs, le taux des plaquettes est souvent légèrement augmenté entre $178,9.10^9$/litre et $595,1.10^9$/litre (les valeurs normales sont comprises entre 150.10^9/litre et 400.10^9/litre), il s'agit d'une hyperplaquettose. Ce paramètre peut parfois être supérieur à 1.10^{12}/litre, parfois normal, ou même exceptionnellement abaissé. (Tableau 20).

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

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

Dans le but de déterminer une association probable entre le type de transcrit BCR-ABL et les données hématologiques et cliniques des patients, nous avons réalisé une étude statistique de corrélation qui vise à comparer les variables entre les deux groupes b3a2 et b2a2. Les patients ayant montré une co-expression des deux variants ont été fusionné avec le groupe des patients b3a2, en raison du faible effectif de ce groupe (Tableau 20).

Tableau 20: Données cliniques et hématologiques fondées sur le type de transcrit BCR-ABL

	Transcrit BCR-ABL		
Variable	b2a2 n=53	b3a2 n=70	*p* value
Age			
Moyenne ± ET	48.45±15.23	51.37±15.36	0.297
Minima-Maxima	18-79	18-86	
Sexe (%)			
Masculin	30.30	69.7	0.143
Féminin	56.52	43.48	
Hémoglobine (g/dL)			
Moyenne ± ET	5.720±3.658	5.357±3.650	0.586
Minima-Maxima	1.18-16.80	1.14-18	
Leucocytes (10^9/L)			
Moyenne ± ET	335.8±181.6	306.5±165.5	0.535
Minima-Maxima	2.9-754	11-765	
Plaquettes (10^9/L)			
Moyenne ± ET	393.8±235.1	381.9±186.7	0.755
Minima-Maxima	49-1400	39-946	
Blastes (%)			
Moyenne ± ET	5.34±6.445	8.17±14.17	0.179
Minima-Maxima	1-35	1-93	

Les résultats obtenus montrent une dominance du transcrit b3a2 par rapport au b2a2. En effet, 53 patients (43%) étaient positifs pour le variant b2a2, tandis que 64 patients (52%) étaient

positifs pour le variant b3a2. Une co-expression des deux transcrits a été également notée chez six patients (5%).

Les conditions de température de l'étape de polymérisation ont été ajustées de façon à permettre aux amorces de s'hybridée durant cette étape. La majorité des amorces ont une température d'hybridation de 62°C. Ceci permet aussi une activité 5-exonucléasique maximale de la Taq polymérase mais, l'efficacité de l'activité de polymérisation de l'enzyme était légèrement réduite à cette température suboptimale. Pour de longs amplicons, une étape d'hybridation/polymérisation plus longue ou encore une augmentation de la concentration en $MgCl_2$ s'avérait nécessaire pour stabiliser l'hybridation des amorces aux séquences cibles.

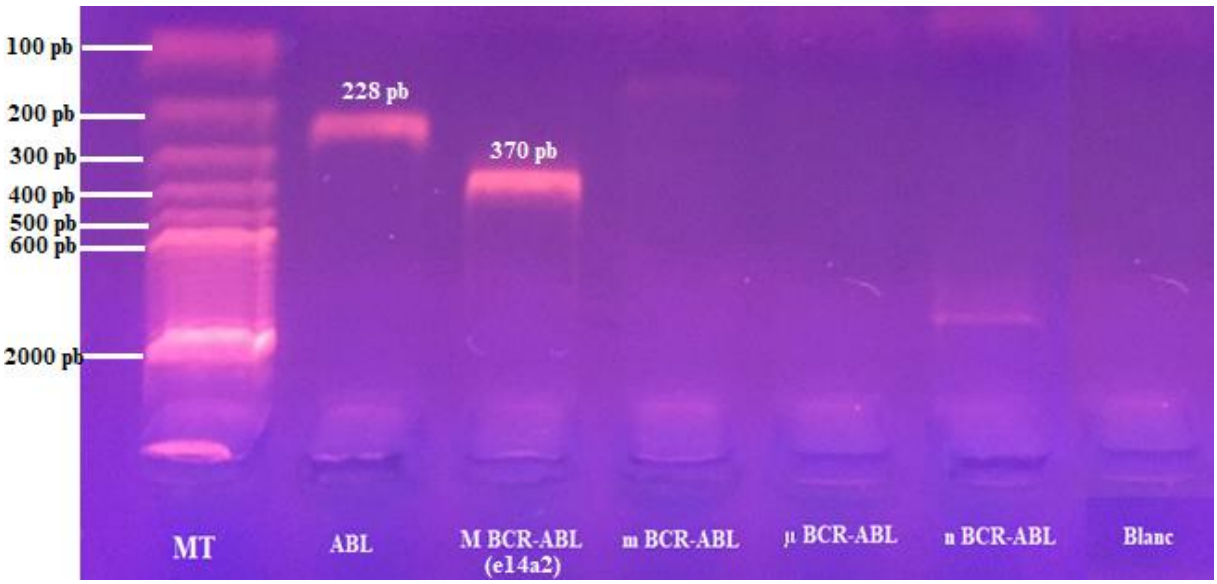


Figure 30: Figure du gel avec - de la gauche à la droite - le marqueur de taille, le gène ABL (gène endogène), Majeur, mineur, micro et nano BCR-ABL

Dans chaque groupe, la majorité des patients étaient en phase chronique (Figure 31).

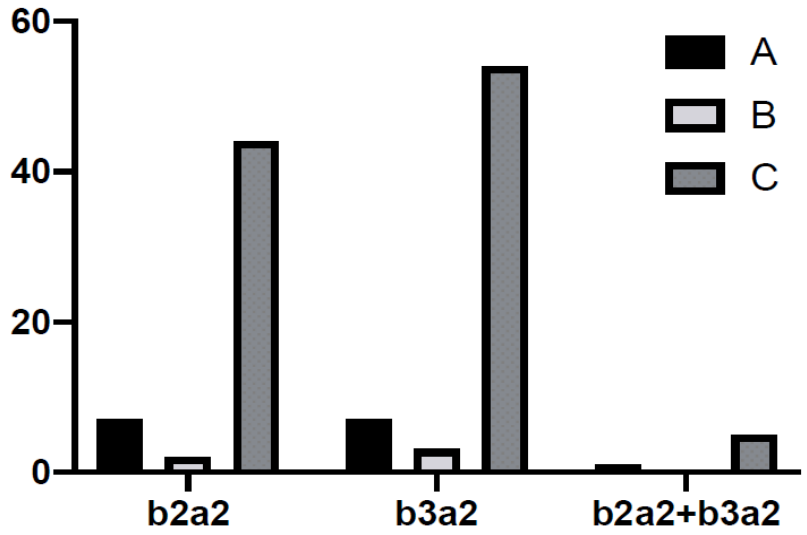


Figure 31: Répartition des phases de la maladie en fonction du type du transcrit BCR-ABL

D'après les résultats obtenus, les patients Hommes expriment le variant b3a2 (57,14 %) par rapport aux femmes (42,86 %). Cependant, les sujets femmes (54,72 %) expriment le transcrit b2a2 plus que les sujets Hommes (45,28 %) (Figure 32). La comparaison de la différence de sexe observé entre les groupes des patients b2a2 et b3a2 en employant le test de khi-carré était statistiquement non significative (p= 0.143) (Tableau 21).

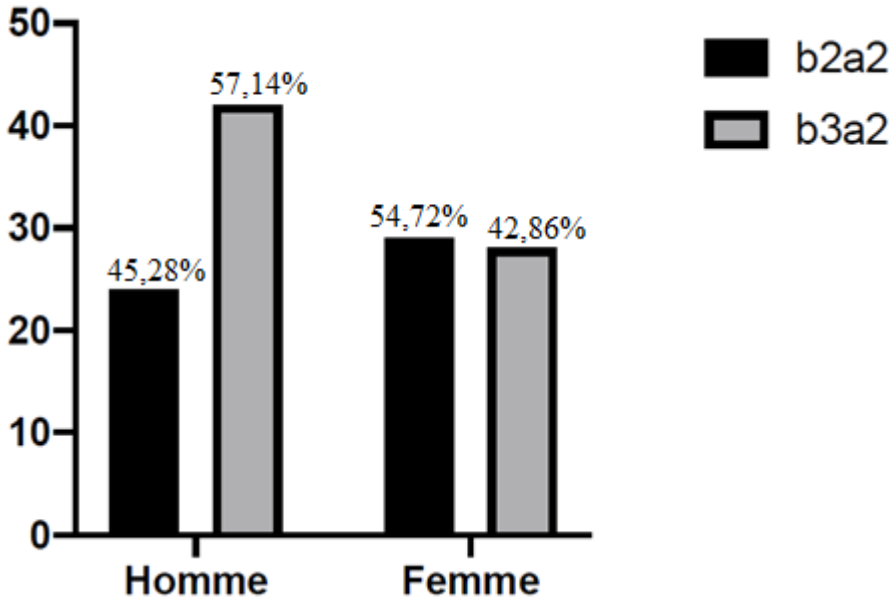


Figure 32: Répartition du sexe en fonction du type de transcrit BCR-ABL

La comparaison des moyennes d'âge entre les deux groupes a montré que les sujets porteurs du transcrit b2a2 (48,45±15,23 ans) étaient plus jeunes que les sujets porteurs du transcrit b3a2 (51,37±15,36 ans) (Figure 33). Cependant, le test t de Student a montré que cette différence est statistiquement non significative (p=0,297) (Tableau 21).

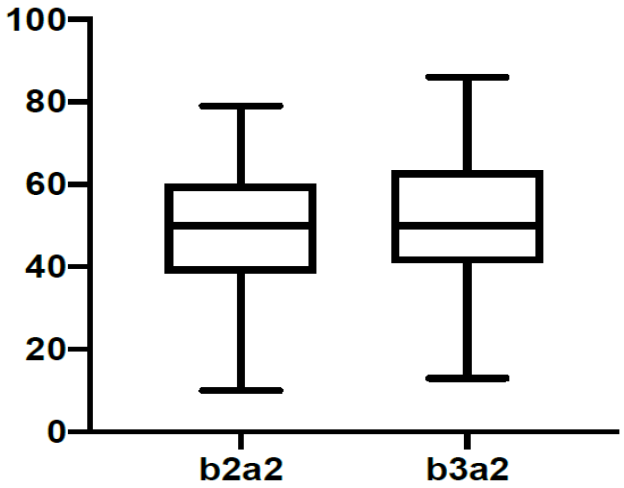


Figure 33: Comparaison de la moyenne d'âge en fonction de type de transcrit BCR-ABL

Concernant le taux des cellules sanguins, les résultats montrent une hyperleucocytose dans le groupe de patients exprimant le transcrit b2a2. En effet, la moyenne du taux des leucocytes dans ce groupe a atteint 335,8±181,6 10^9/l, alors que les patients porteurs du transcrit b3a2 présentaient des valeurs plus faibles (moyenne 306.5±165.5 10^9/L. La comparaison des moyennes par test de t de Student a conclu que la différence observée est statistiquement non significative (p=0.535) (Figure 34).

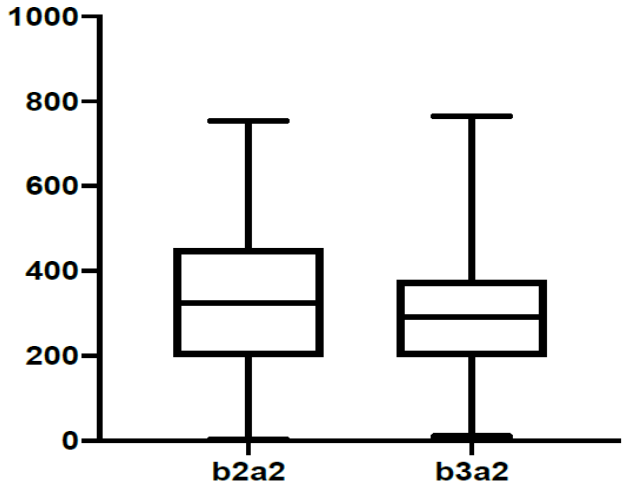


Figure 34: Comparaison du taux moyen des leucocytes en fonction de type de transcrit BCR-ABL

A propos du taux d'hémoglobine, les résultats indiquent une expression modérément élevée d'hémoglobine dans la classe de patients exprimant le transcrit b2a2. D'autre part, la moyenne du taux d'hémoglobine dans ce groupe a atteint 5,720±3,658 g/dL, alors que les patients porteurs du transcrit b3a2 présentaient des valeurs moindres, avec une moyenne de 5.357± 3.650 g/dL. L'analyse comparative des moyennes par test de t de Student a convenu que la différence remarquée est statistiquement non significative (p=0.586) (Figure 35).

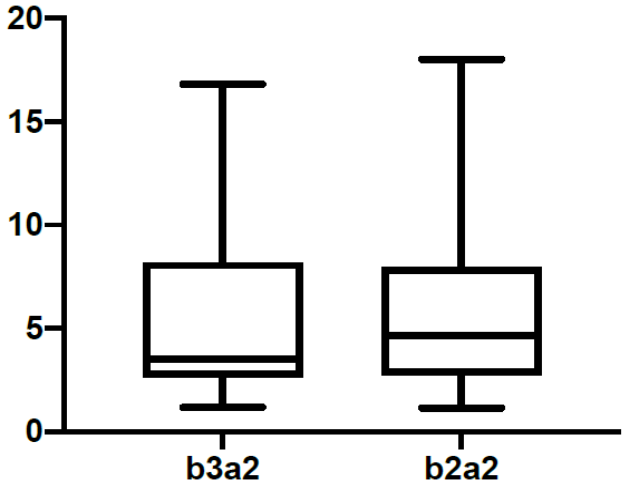


Figure 35: Moyenne du taux d'hémoglobine selon le type de transcrit BCR-ABL

En ce qui concerne le taux des plaquettes, les résultats révèlent une expression majoritaire des plaquettes dans la section de patients exprimant le transcrit b2a2. D'ailleurs, la moyenne du taux des plaquettes dans ce groupe a atteint 393,8±235,1.10^9/L, tandis que les patients titulaires du transcrit b3a2 présentaient des valeurs réduites, avec une moyenne de 381,9±186,7.10^9/L. La comparaison des moyennes par test de Student a conclu que la différence remarquée est statistiquement non significative (p=0.755) (Figure 36).

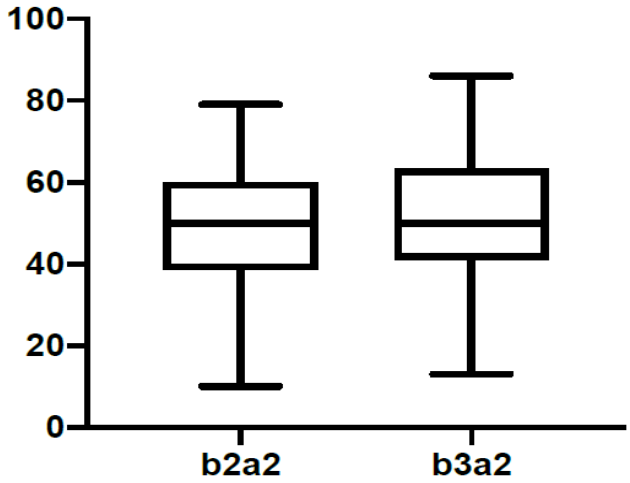


Figure 36: Moyenne du taux des plaquettes selon le type de transcrit BCR-ABL

Au sujet du pourcentage des blastes, les résultats montrent une présence dominante des blastes dans la tranche de patients exprimant le transcrit b3a2. Par ailleurs, la moyenne du taux des blastes dans ce groupe a touché 8,17±14,17.10^9/L, pendant que les patients porteurs du transcrit b2a2 présentaient des valeurs plus faibles avec une moyenne de 5,34±6,445.10^9/L. La comparaison des moyennes par test de Student a montré que la différence observée est statistiquement non significative (p=0.179).

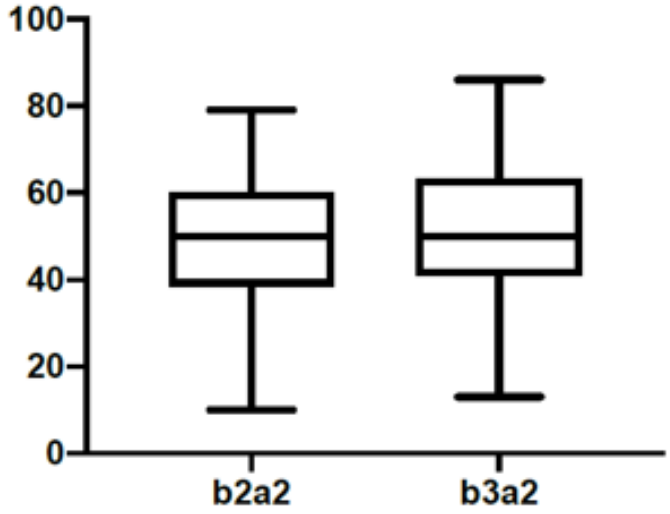


Figure 37: Moyenne du pourcentage des blastes selon le type de transcrit BCR-ABL

La recherche d'une éventuelle association entre la phase de la maladie et la présence/absence de splénomégalie ou hépatosplénomégalie d'une part, et le type de transcrit BCR-ABL d'autre part, nous avons employé le test chi-carré. Les résultats obtenus montrent l'absence de corrélation significative entre ces variables et les variants du BCR-ABL.

3. Suivi de l’évolution de la maladie résiduelle par quantification des marqueurs moléculaires du gène de fusion

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

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

La population étudiée a inclus 90 patients LMC en phase chronique ayant reçu un diagnostic moléculaire de la maladie au préalable. Ils ont reçu un traitement par imatinib (400 mg) durant une année. L’âge moyen de la population était de 51.18 ans avec une légère prédominance du sexe masculin (52.2%).

Nous avons effectué le contrôle de la réponse moléculaire par la RTq-PCR, qui quantifie les transcrits de BCR-ABL par rapport à ABL (gène endogène), ce test doit être répété au moins tous les 3 mois jusqu’à ce que l’on observe une rémission moléculaire majeure, cette dernière est définie par un résultat de RTq-PCR du gène BCR- ABL/ABL inférieur à 0,10 % selon l’échelle internationale.

La réponse moléculaire majeure a été obtenue chez 68 patients (75.5%), tandis que 24.5% des cas ont montré un taux de BCR-ABL supérieur à 0.1%, ce qui est traduit comme absence de rémission moléculaire.

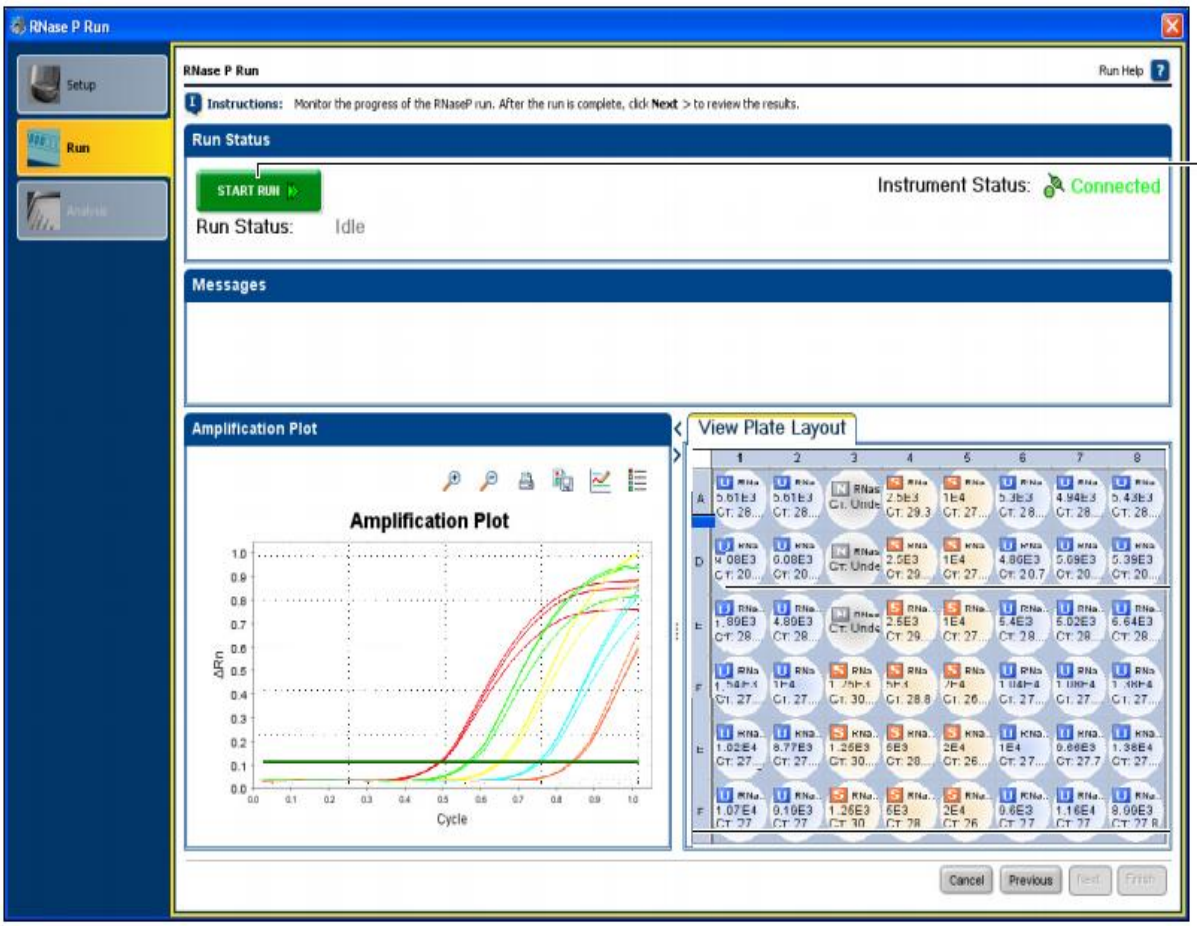


Figure 38: Résultat de la réaction de PCR quantitative en temps réel (RTq-PCR) sur écran (A gauche : Les courbes d'amplification des échantillons des standards, et des négatifs. A droite : Vue de la plate RNase P avec l'emplacement des différents échantillons standards et négatifs)

Une fois la rémission moléculaire majeure obtenue, on donne rendez-vous aux patients pour contrôle moléculaire par RTq-PCR qui doit être réalisé tous les 6 mois.

Le transcrit b3a2 est le variant majoritaire (62%) chez les patients ayant montré une réponse au traitement (Figure 39). L'étude de corrélation entre le type de transcrit et la réponse au traitement a montré que la différence observée est statistiquement non significative (p=0.99) (Tableau 21).

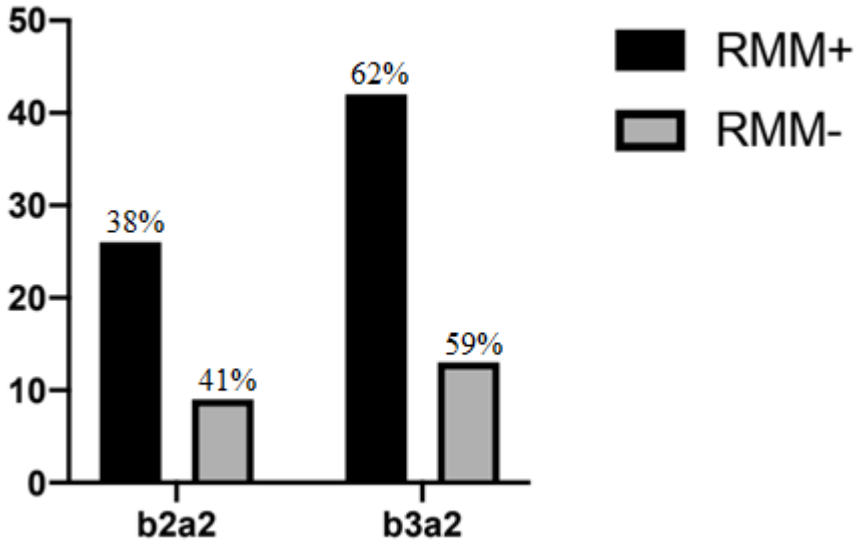


Figure 39: Réponse moléculaire en fonction du type de transcrit BCR-ABL

Tableau 21: Réponse moléculaire en fonction du type de transcrit BCR-ABL

	RMM+	**RMM-**	**p-value**
b3a2	42 (62%)	13 (59%)	0.99
b2a2	26 (38%)	9 (41%)	

Nous avons également étudié une probable association entre la présence de rémission moléculaire et le sexe (Figure 40). Les résultats de l'étude statistique montrent que la réponse moléculaire majeure chez les femmes était similaire à celle des hommes. Malgré que l'absence de cette réponse fût un peu plus élevée chez les hommes que chez les femmes, la différence n'a pas atteint le seuil de signification statistique (p=0.47).

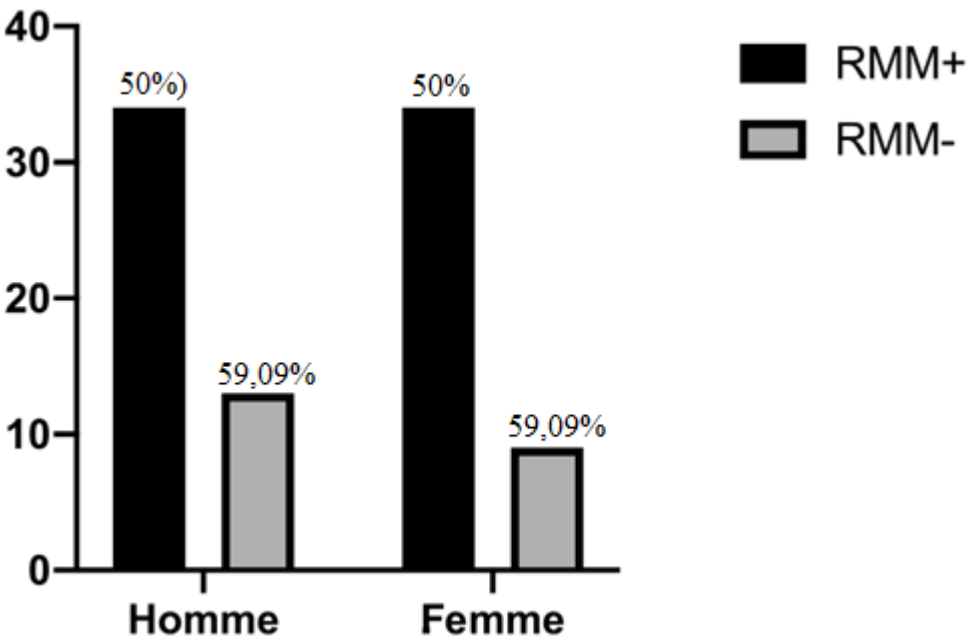


Figure 40: Réponse moléculaire en fonction du sexe des patients

Tableau 22: Réponse moléculaire en fonction du sexe des patients

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

Le tableau 22 montre que le taux des femmes manifestant une réponse moléculaire majeure est équivalent au taux des hommes, avec 34 individus pour chaque sexe. L'absence de la réponse moléculaire chez à peu près 41% des femmes était relativement modeste en comparaison avec celle des hommes révélés chez 59% des cas. On peut ainsi dire que la RMM- a été exprimée chez 13 patients de sexe masculin pour 9 patientes de sexe féminin.

4. Exploration moléculaire des facteurs génétiques responsables de la résistance au traitement

Les cellules de la leucémie myéloïde chronique acquièrent une résistance à la tyrosine kinase par le biais des mutations dans le domaine ABL kinase. La mutation T315I est la mutation la plus célèbre, et est à l'origine de la résistance à l'imatinib, au dasatinib, au nilotinib et au bosutinib, alors que sa sensibilité au ponatinib persiste(Baer et al. 2016).

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

Parmi les vingt-deux patients avec absence de rémission moléculaire, 7 patients ont bénéficié du séquençage de Sanger afin d'analyser le domaine kinase. Les résultats obtenus montrent la présence des mutations de résistance au niveau du transcrit Bcr-Abl chez tous ces patients (100%). La mutation T315I était présente chez 4 patients (57.1%) (Figure 41). Deux patients (28.6%) étaient porteurs de la mutation E255V (Figure 42).

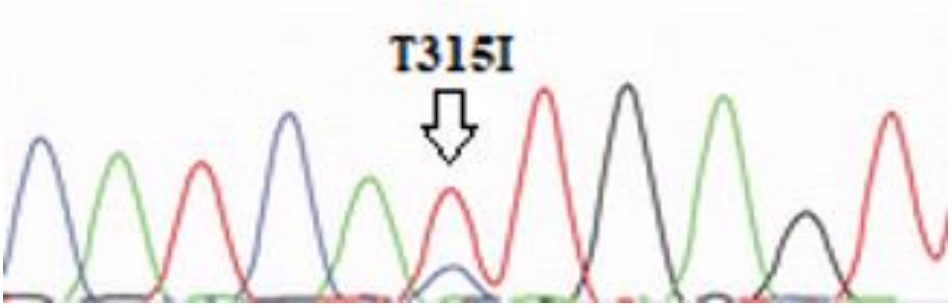


Figure 41: Résultats de l'analyse du séquençage du gène BCR-ABL montrant la présence de la mutation T315I dans le domaine de la kinase ABL

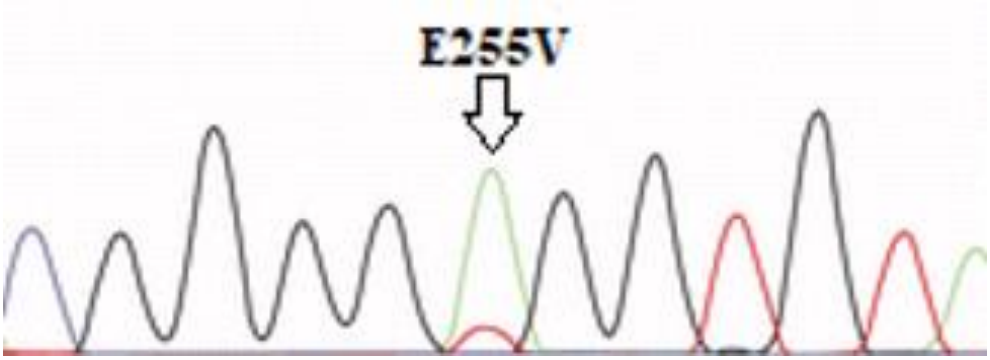


Figure 42: Résultats de l'analyse du séquençage du gène BCR-ABL montrant la présence de la mutation T315I dans le domaine de la kinase ABL

Une patiente malheureusement décédée, a présenté deux mutations, une mutation habituelle la G250E et une deuxième mutation. Les analyses par plusieurs logiciels bio-informatiques, ont conclu que cette mutation est nouvelle et pathogène. Elle fait l'objet d'une publication en cours.

Discussion

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une maladie caractérisée par une translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22, qui donne naissance au gène de fusion BCR-ABL. Les points de cassure du chromosome 22 sont regroupés dans une petite région (5,8 ko), couvrant les exons e12-16 (officiellement désignés b1-5) connus comme la principale région du groupe de points de cassure (M-BCR). Les points de cassure se situent presque toujours entre les exons e13 et e14 ou entre e14 et e15. Bien que les points de cassure du gène ABL soient également variables, en raison des événements d'épissage, l'ARNm transcrit possède une jonction e13a2 (b2a2) ou e14a2 (b3a2). Les transcrits e13a2 et e14a2 BCR-ABL diffèrent en longueur par 75 pb (25 acides aminés). Les deux molécules d'ARNm BCR-ABL codent une protéine kinase de 210 kDa qui est constitutivement active et qui constitue la source de pathogénicité de la maladie.

Au cours des 15 dernières années, l'introduction des techniques d'identification des transcrits du gène de fusion BCR-ABL a permis une évaluation plus précise de la réponse aux traitements spécifiques de la LMC, notamment l'utilisation de la transplantation de cellules souches allogéniques, des inhibiteurs de l'interféron et de la tyrosine kinase. Avec chacune de ces approches thérapeutiques, la détermination du type du transcrit associée au suivi des patients, peut permettre de prédire ceux qui présentent un risque plus élevé de "progression de la maladie".

Nous avons mené cette étude dans le but d'établir, dans un premier temps, le diagnostic moléculaire de 123 patients LMC, en identifiant les types de transcrits BCR-ABL. Dans un second temps, nous avons réalisé une étude de corrélation entre le type de transcrit et les données démographiques, cliniques et hématologiques.

La population étudiée était constituée de 123 patients dans les différentes phases de la maladie. En comparant les caractéristiques de notre population avec ceux des autres populations Nord-Africaine, on observe une certaine convergence en termes de sexe ratio. En effet l'étude de Nachi et al., 2020(Nachi et al. 2020)réalisée sur une population Algérienne montre un sexe ratio (H:F) de 1,04, alors que l'étude de Baccarani et al., 2019 (Baccarani et al. 2019)effectuée sur une très large cohorte provenant des cinq continents, montre un sexe ratio global de l'ordre

de 1,33, avec un ratio de 1,08 dans la population d'origine Africaine, ce qui est similaire au sexe ratio de notre série d'étude.

Concernant l'âge moyen, l'étude tunisienne de Bennour et al., 2013(Bennour et al. 2013)a rapporté un âge moyen de 41,6 ans, alors que Nachi et al. a rapporté une moyenne de 48,5 ans. Ce dernier s'avère assez proche de la moyenne d'âge décrite dans notre étude (50,25 ans). Par contre, nous avons constaté une certaine divergence en ce qui concerne la tranche d'âge prédominante selon le sexe. Ainsi, l'étude de Baccarani et al. montre une prédominance, chez les deux sexes, de la tranche d'âge entre 20 et 39, suivie par la tranche d'âge entre 40 et 59. Alors que dans notre étude nous avons constaté une prédominance remarquable de la tranche d'âge 41 - 50 ans chez les femmes, et des deux tranches 51 - 60 et 41 - 50 chez les hommes. De plus, nous avons constaté une dominance majoritaire des femmes dans notre études au niveau de la tranche d'âge 41 - 50 ans et celle supérieure à 80 ans, par contraste aux résultats de Baccarani et al., qui montrent une prédominance masculine dans les différentes tranches d'âges entre 20 et plus de 80 ans.

De plus, nous avons constaté une dominance majoritaire des femmes dans notre études au niveau de la tranche d'âge 41 - 50 ans et celle supérieure à 80 ans, par contraste aux résultats de Baccarani et al., qui montrent une absence de prédominance féminine dans les différentes tranches d'âges entre 20 et plus de 80 ans.

Environ 90 % des patients atteints de la LMC sont en phase chronique au moment du diagnostic(Lee2000)(Goldman et Druker 2016). Dans notre étude, cette phase renferme 80% des patients étudiés avec un effectif de 103 patients sur un total de 123. La phase accélérée est le stade ou évolution clonale, en d'autre termes le développement d'anomalies chromosomiques en plus du chromosome de Philadelphie est considéré comme une caractéristique(Dwyer et al. 2002). Dans la population de Williams et al. 2013(Williams et al. 2013), la phase accélérée est présente chez 8,57% de la population (trois patients sur 35 de la première cohorte), alors que dans notre population il est présent chez 15 individus (12,20%). Ces différences observées pourraient être due à la différence des tailles des échantillons comparés.

La phase accélérée et la crise blastique sont deux phases cruciales d'évolution graves pour les patients atteignant la LMC, ces deux phases présentent un total de pourcentages relativement proche en comparaison avec l'étude de Danthala et al. 2017 (Danthala et al. 2017)qui énonce 11,41% par rapport 16,26% dans notre étude.

De nombreuses travaux se sont focalisés sur l'étude de l'influence des principaux types de transcrits sur le phénotype de la maladie et la réponse au traitement. Cependant, les résultats de ces études demeurent contradictoires. L'objectif du présent travail est d'examiner l'influence des transcrits Mb3a2 et Mb2a2 sur les paramètres cliniques et biologiques chez des patients atteints de LMC.

Notre étude a inclus 123 patients atteints de LMC en phase chronique, accélérée et blastique. L'ARNm a été extrait à partir du sang périphérique total, puis convertit en ADNc à l'aide d'une reverse transcription. Afin d'identifier les différents transcrits BCR-ABL, nous avons réalisé une PCR-multiplex en utilisant des amorces conçues pour amplifier 14 variants du transcrit BCR-ABL. L'analyse statistique a été réalisée pour étudier l'association entre le type du transcrit et les paramètres hématologiques et cliniques des patients.

Tableau 23: Résultats de l'incidence de 3 types de transcrits de fusion BCR-ABL rapportés dans différents pays des cinq continents (ND : non déclaré)

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

Notre étude est la première de son genre au Maroc, qui vise à rechercher 14 types de transcrits de fusion BCR-ABL de tailles différentes. Cette investigation vise à explorer le profil génétique de la population Marocaine touchée par la LMC. Les résultats obtenus montrent une dominance totale des transcrits b2a2 et b3a2 dans notre population. En effet, 43% des patients exprimaient le transcrit b2a2, 52% des cas portaient le transcrit b3a2, tandis que 5% des sujets ont montré une co-expression des deux transcrits.

En comparant nos résultats avec d'autres études ultérieures, on constate une large discordance en fonction des populations. Dans certaines études le transcrit b3a2 est dominant par rapport à celui de b2a2, et le contraire est vrai dans d'autres études. Les travaux de Castagnetti et al en Italie sur une population de 1494 patients LMC, a montré une incidence de 49% du biomarqueur b3a2 (Castagnetti et al. 2017). De même, Yaghmaie et al a rapporté une fréquence élevée du transcrit b3a2 (73.5%) dans une population de 136 cas LMC(Yaghmaie et al. 2008). Un taux élevé du b3a2 a été également rapporté dans les populations Tunisienne, Brésilienne, Canadienne, Coréenne et d'autres (Tableau 17).

Contrairement à nos résultats, le transcrit de fusion b2a2 constitue le gène le plus exprimé chez quelques populations. En effet, le taux de b2a2 le plus élevé (53.5%) a été rapporté par Jain et al aux États-Unis. L'étude Syrienne menée par Al-Achkar et al en 2016, avait décrit un taux de b2a2 de 42% contre 41% pour b3a2(Al-Achkar et al. 2016).

La co-expression est un évènement rare qui n'a pas été décrits dans toutes les études. Dans le présent travail, la fréquence des transcrits b3a2 et b2a2 en co-expression a atteint 5%. Une incidence similaire a été rapportée par Arun et al dans une population Indienne. Cependant, Al-Achkar et al avait mentionnés un taux de 18% dans la population Syrienne, et qui constitue la valeur la plus élevée jamais rapportée dans la littérature(Al-Achkar et al. 2016).

Les différences structurelles des protéines p210 (c.-à-d. e14a2 et e13a2) peuvent entraîner des activités de tyrosine kinase différentes et donc, théoriquement, les paramètres hématologiques chez les patients atteints de LMC avec les types de transcrits b2a2 et b3a2 peuvent différer. De nombreuses études ont évalué les taux d'hémoglobine, des leucocytes, de myéloblastes, de plaquettes, de la taille de la rate chez des groups patients ayant exprimés des transcrits BCR-ABL différents. Notre étude constitue la première de son genre au Maroc à étudier l'éventuelle association entre le type de transcrit BCR-ABL d'une part, et les données hématologiques et cliniques d'autre part. L'analyse statistique des différentes variables a

montré l'absence de corrélation entre le taux des leucocytes, d'hémoglobine, des plaquettes, des blastes, la phase de la maladie et la présence de splénomégalie et le type du variant BCR-ABL.

Nos résultats concordent avec plusieurs études menées dans ce sens. Notamment, les travaux réalisés par Filho et al sur une population brésilienne constituée de 50 patients LMC, a montré que les différences des données hématologiques et cliniques observées entre les groupes de patients exprimant les deux types de transcrits b3a2 et b2a2 n'a pas atteint la signification statistique. De même pour la comparaison d'âge et du genre entre les deux groupes, aucune différence n'a été décelée(de Almeida Filho et al. 2019).

Une étude Algérienne récente a consolidé ces résultats en rapportant une différence non significative entre les groupes de transcrits et les autres variables (Nachi et al. 2020a). Des conclusions conformes ont été également décrites par Pagnano et ses collègues, qui ont découvert l'absence de corrélation entre le taux des cellules sanguins, la taille de la rate et du foie d'une part, et les transcrits b3a2 et b2a2 d'autre part(Pagnano et al. 2017).

Cependant, rares sont les études qui ont rapporté une différence significative. Une étude Nigérienne récente a montré que les patients exprimant le transcrit a2b2 avaient des taux de plaquettes plus élevés, une différence qui a été statistiquement prouvée (p=0.03)(Owojuyigbe et al. 2020). Une étude Tunisienne a examiné examinons les données sur les corrélations entre le type de variante M-BCR/ABL et le sexe, l'âge et les caractéristiques biologiques correspondants, a trouvé que le taux de plaquettes était plus élevé chez les patients présentant le transcrit b3a2 (p=0.001)(Bennour et al. 2013).

De nombreuses études ont également trouvé une association entre le nombre de leucocytes au moment du diagnostic et les types de transcrits. Dans leur étude, les chercheurs allemands ont démontré que les patients exprimant le variant b2a2 présentaient un taux moyen de leucocytes nettement plus élevé que les patients exprimant le variant b3a2 ($88x10^9$/L par rapport à $65x10^9$/L; P<0,001)(Hanfstein et al. 2014). Une étude publiée récemment au Brésil a également fait état de résultats semblables, et les patients ayant exprimés le transcrit b2a2 avaient un taux de leucocytes moyen nettement plus élevé au moment du diagnostic que les patients exprimant le transcrit b3a2 ($147x10^9$/L contre $129x10^9$/L; P=0.049)(de Almeida Filho et al. 2019).

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

Bien que la majorité des patients atteints de leucémie myéloïde chronique répondent bien au traitement avec des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK), certains patients montrent une mauvaise réponse. De nombreux facteurs peuvent influencer, y compris les différents types de transcrits BCR-ABL. Les études démontrant l'impact du type du transcrit sur la réponse aux ITKs reçu par les patients LMC, ont donné des résultats contradictoires (Ercaliskan et Eskazan 2018)(Greenfield et al. 2019)(Lucas et al. 2009).

Dans notre série le taux de réponse moléculaire majeurs obtenu était de 75.5% sur une durée de 12 mois. En comparant nos résultats avec ceux de la littérature, on observe une légère discordance. En effet, Banford et ses collaborateurs ont rapporté un taux de 50% de RMM sur 12 mois (S. Branford et al. 2003). De même, une étude égyptienne portant sur 95 nouveaux patients a obtenu un taux de 50% avec un temps médian d'obtention de RMM de 12 mois (Hk et al. 2009). Une étude rétrospective réalisée par le Groupe Algérien de travail sur la LMC (GAT-LMC), qui a évalué le traitement par Imatinib chez 327 patients durant 12 mois, a obtenu une rémission moléculaire chez 181 patients (55.4%) (Nachi et al. 2020).

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

Dans l'étude de Lucas et al, les patients exprimant le transcrit b3a2 présentaient des taux de réponse cytogénétique complète supérieurs et obtenaient cette réponse plus rapidement que le groupe b2a2 (P =0,01 et P =0,006, respectivement) dans une cohorte de 78 patients ayant une LMC recevant l'imatinib de première intention (P =0,01 et P =0,006, respectivement)(Lucas et al. 2009).

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

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

Une étude menée en Inde auprès de 87 patients atteints de LMC a démontré que ceux porteurs du variant b2a2 avaient de meilleures réponses lorsqu'ils recevaient de l'imatinib comparativement aux patients porteurs du variant b3a2. Les taux de réponse cytogénétique complète étaient de 59 % contre 28 %, respectivement, en faveur du transcrit b2a2, et la différence était statistiquement significative (P=0.04)(Sharma et al. 2010).

La thérapie aux ITKs a révolutionné la prise en charge et la gestion de patients atteints de LMC en phase chronique. Cependant, certains patients présentent toujours des réponses au traitement défavorable. De nombreux facteurs peuvent jouer un rôle, y compris le type de transcrit BCR-ABL exprimé au départ.

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

Dans la majorité des études, le transcrit b3a2 était associé à des taux de réponse moléculaire plus élevés, alors que certaines études ont démontré le contraire. Pour ce qui est des résultats à long terme, même si certaines études ont démontré une meilleure réponse chez les patients ayant le variant b3a2, la majorité des études ont démontré que le type de transcrit n'a pas d'influence sur la survie sans progression et la survie générale(Ercaliskan et Eskazan 2018).

La raison de la différence de réponse au traitement à l'imatinib ne semble donc pas liée aux différences de transport de l'imatinib entre les types de transcription. Il est toutefois probable que l'effet est dû à des différences dans la cible du médicament. On a constaté que l'activité tyrosine kinase est plus élevée chez les patients b2a2 que chez les patients b3a2 (White et al. 2005). Une dose fixe d'imatinib est capable d'éradiquer l'activité kinase chez les patients b3a2 en comparant avec les patients b2a2. Cela peut expliquer l'incidence plus élevée de la réponse au traitement observée chez les cas b3a2 (Lucas et al. 2009).

Étant donné que le transcrit b3a2 semble être liée à des résultats favorables, le choix de thérapies alternatives comme les 2GTKIs (Inhibiteurs de la Tyrosine Kinase de 2ème Génération) en première ligne de traitement pourrait être une approche convenable chez les patients ayant le transcrit b2a2, qui est généralement associée à une mauvaise réponse. Des essais contrôlés prospectifs et randomisés avec des échantillons de plus grande taille sont encore nécessaires pour déterminer l'impact du type de transcrit sur les résultats à court et à long terme chez les patients atteints de LMC qui reçoivent un traitement ITK(Ercaliskan et Eskazan 2018).

Le développement de la résistance à l'Imatinib chez les patients atteints de LMC a été associé à un large éventail de mécanismes. Il s'agit notamment des voies dépendantes de la BCR-ABL et des voies indépendantes de la BCR-ABL. Les voies dépendantes de la BCR-ABL ont été signalées comme l'un des mécanismes les plus fréquents qui contribuent à la résistance chez les patients de LMC traités avec l'imatinib(Kantarjian et al. 2006). La voie dépendante de la BCR-ABL concerne principalement les mutations du domaine de la tyrosine kinase du gène BCR-ABL (La Rosée et Deininger 2010)(« BCR-ABL Kinase Domain Mutations, Drug Resistance, and the Road to a Cure for Chronic Myeloid Leukemia » 2007). Druker et al. (Druker et al. 1996)a démontré que le blocage de la protéine BCR-ABL dans la conformation inactive par l'imatinib empêche le transfert de phosphate de l'AMP (ATP) vers les substrats et inhibe les voies descendantes. Toutefois, selon Corbin et al. (Corbin et al. 2002), certaines mutations semblent perturber le point de contact critique entre l'imatinib et la BCR-ABL. En outre, d'autres mutations semblent induire une transition de l'état inactif à l'état actif, une conformation que l'imatinib ne pourrait pas lier.

Dans cette étude, 7/22 (32 %) patients atteints de LMC résistants à l'Imatinib ont montré la présence d'une mutation dans leur domaine tyrosine kinase du gène BCR-ABL. En comparant la fréquence des mutations de la présente étude à la fréquence signalée dans d'autres

populations étudiées, on a observé une fréquence plus faible chez les patients atteints de LMC dans notre série.

Selon Kim et al, la fréquence des mutations est corrélée avec la proportion de patients dans les différentes phases de la maladie. Dans l'étude de Kim et al, 25 % des patients LMC résistants à l'Imatinib recrutés étaient en phase chronique (PC), tandis que les 75 % restants étaient en phase accélérée (PA) ou en phase blastique (PB). Par conséquent, Kim et al. ont observé une fréquence élevée (63 %) de mutation chez leurs patients LMC résistants à l'Imatinib(Kim et al. 2009). Ainsi, la fréquence globale relativement faible des mutations dans notre étude par rapport à d'autres études publiées peut s'expliquer par la prédominance des patients de LMC en phase chronique inclus pour l'analyse de mutation. Un faible pourcentage de mutations du domaine de la tyrosine kinase (DTK) (19 %) a également été observé par Branford et al. chez des patients LMC australiens résistants à l'Imatinib. Le faible pourcentage de mutations DTK observé dans l'étude de Brandford et al. (2003) pourrait également être dû au fait que la majorité des patients dépistés se trouvaient dans la phase chronique (Susan Branford et al. 2003). Les résultats de la présente étude ainsi que d'autres rapports cités concordent avec ceux de Branford et al. qui ont indiqué que les pourcentages estimés de patients résistants à l'Imatinib dans la LMC en phase chronique et la LMC en phase accélérée, porteurs de mutations pathogéniques serait d'environ 18 % et 31 % respectivement, alors qu'elle serait de 29 % à 52 % chez les patients atteints de LMC en phase blastique(Susan Branford, Melo, et Hughes 2009).

En ce qui concerne l'analyse de survie, les patients atteints de LMC traités par l'Imatinib et porteurs des mutations du gène BCR-ABL, en particulier la mutation T315I, ont montré une période de survie plus courte que celles avec d'autres types de mutations et celles sans mutations. La localisation de la mutation T315I au site de liaison de l'Imatinib au niveau du domaine de la tyrosine kinase explique fortement la survie plus courte et le mauvais pronostic des patients atteints de LMC avec la mutation T315I. De plus, certains rapports indiquent que les patients atteints de la mutation T315I sont non seulement résistants à l'Imatinib, mais aussi à d'autres ITKs de deuxièmes et troisièmes générations comme le dasatinib(Soverini et al. 2007), le nilotinib(Jabbour et al. 2010) et le bosutinib(Khoury et al. 2012). Ainsi, la mutation T315I confère une véritable résistance aux ITKs et favorise ainsi le raccourcissement de la survie des patients.

L’évaluation des patients atteints de LMC présentant des signes cliniques de résistance aux mutations du gène BCR-ABL est un élément important du suivi de la maladie, afin de déterminer comment les patients réagissent au traitement et comprendre la mutation de la BCR-ABL comme cause de résistance. Non seulement la présence de mutations, mais aussi le changement d’acides aminés devrait être étudiés chez les patients de LMC présentant une résistance à l’Imatinib afin d’optimiser la réponse thérapeutique. Certaines mutations spécifiques de la BCR-ABL ont été associées à un mauvais pronostic, par conséquent, le dépistage des mutations est cliniquement pertinent pour identifier les patients atteints de LMC quisont susceptibles d’avoir de développer une résistance et de faciliter la sélection du traitement subséquent. En outre, la présence de mutations dans différentes régions du domaine tyrosine kinase du gène BCR-ABL conduit à différents niveaux de résistance. Le type de mutation peut potentiellement indiquer si un inhibiteur de la BCR-ABL de deuxième ou de troisième génération ou d’autres stratégies thérapeutiques devrait être administré à de tels patients résistants à l’Imatinib et peut également aider à identifier ceux qui ont besoin d’une augmentation de la dose d’Imatinib.

Conclusion générale et perspectives

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une maladie myéloprolifération caractérisé par une accumulation excessive de substances apparemment anormales des cellules myéloïdes. Elle se produit avec une incidence annuelle de 1 à 1,5 par 100 000 personnes. La LMC est très rarement présente chez les enfants. Dans les pays occidentaux, l'âge médian d'apparition est de 50-60 ans, ce qui reflète l'âge moyen de la population. Bien que les symptômes à la présentation puissent inclure l'asthénie, la perte du poids, la splénomégalie, l'hépatosplénomégalie, et l'anémie, dans les pays plus développés, 50 % des patients sont asymptomatiques et sont diagnostiquées à la suite d'analyses sanguines pour des raisons sans rapport. Plus de 90 % des patients atteints de LMC sont diagnostiqués lorsque leur maladie est dans une phase relativement précoce connue en phase chronique (CP).

Heureusement, le diagnostic est rarement problématique. Il dépend de la démonstration du chromosome de Philadelphie par analyse cytogénétique ou du gène BCR-ABL par réaction de polymérisation en chaîne du produit de la transcription inverse ou encore par hybridation in situ fluorescente.

A travers cette thèse nous avons réalisé une caractérisation démographique, clinique et hématologique d'une population marocaine atteinte de la LMC. Nous avons également étudié le profil génétique de cette population à travers la mise en évidence du chromosome Ph via le caryotype et la cytogénétique moléculaire. Nous avons pu également mettre en place pour la première fois au Maroc une technique multiplex pour 14 transcrits de fusion différents ce qui nous a permis de préciser exactement le type de transcrit présent chez chaque patient ce qui va permettre de les orienter vers une thérapie ciblée permettant d'améliorer leur qualité de vie.

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

Concernant les retombés et intérêts de cette étude en termes de recherche, le profil génétique des patients est devenu visible à la communauté scientifique internationale. Cette étude a permis aux patients de bénéficier d'un diagnostic moléculaire efficace et précis, elle a permis également d'améliorer la prise en charge, et rendre le traitement plus pertinent et plus ciblé.

Les différents tests optimisés via cette thèse ont devenu des analyses de routine au niveau du CHU Hassan II Fès.

Plusieurs familles ont pu bénéficier jusqu'à l'instant de ces différents tests, suite à cette thèse

A la fin de cette thèse, nous recommandations de :

- Rendre systématique la RT-PCR multiplexe afin de confirmer le diagnostic de la LMC et de déterminer le biomarqueur moléculaire nécessaire pour le bon choix des sondes et/ou amorces spécifiques utilisées lors des quantifications des transcrits BCR-ABL.
- Utiliser des protocoles de RTq-PCR standardisés pour le suivi moléculaire, pour pouvoir exprimer les résultats de quantification en ratio (%) avec normalisation de BCR- ABL par rapport au gène de référence ABL, et sa conversion sur une échelle internationale grâce à l'utilisation d'un facteur de conversion comme recommandé par les sociétés savantes Européenne et Américaine.
- Effectuer une quantification tous les 3 mois selon les recommandations de l'ELN afin d'identifier précocement un échappement au traitement.
- Créer des centres régionaux de référence pour faire face aux insuffisances de moyens de diagnostic et de suivi, et permettre l'accès des malades à ces méthodes visant à améliorer la prise en charge de leur maladie.
- Amélioration du plateau technique par l'acquisition d'un séquenceur de nouvelle génération pour pouvoir rechercher les différentes mutations de résistance.

Enfin, le niveau d'adhérence est un élément clef dans la prise en charge de la LMC et un facteur fondamental pour une meilleure efficacité thérapeutique des ITK dans la LMC en phase chronique. Il est donc nécessaire de mettre en place une stratégie d'amélioration de l'adhérence des patients telle que l'accompagnement (observance) par une éducation thérapeutique du patient afin qu'il puisse adhérer pleinement à son traitement et à la prise en charge de sa maladie.

Il est clair aujourd'hui que dans le cadre des réponses sous optimales ou de résistance, une stratégie de recherche de mécanismes de résistance en plus de la recherche des mutations doit être envisagée.

Nos perspectives sont, ainsi, multiples :

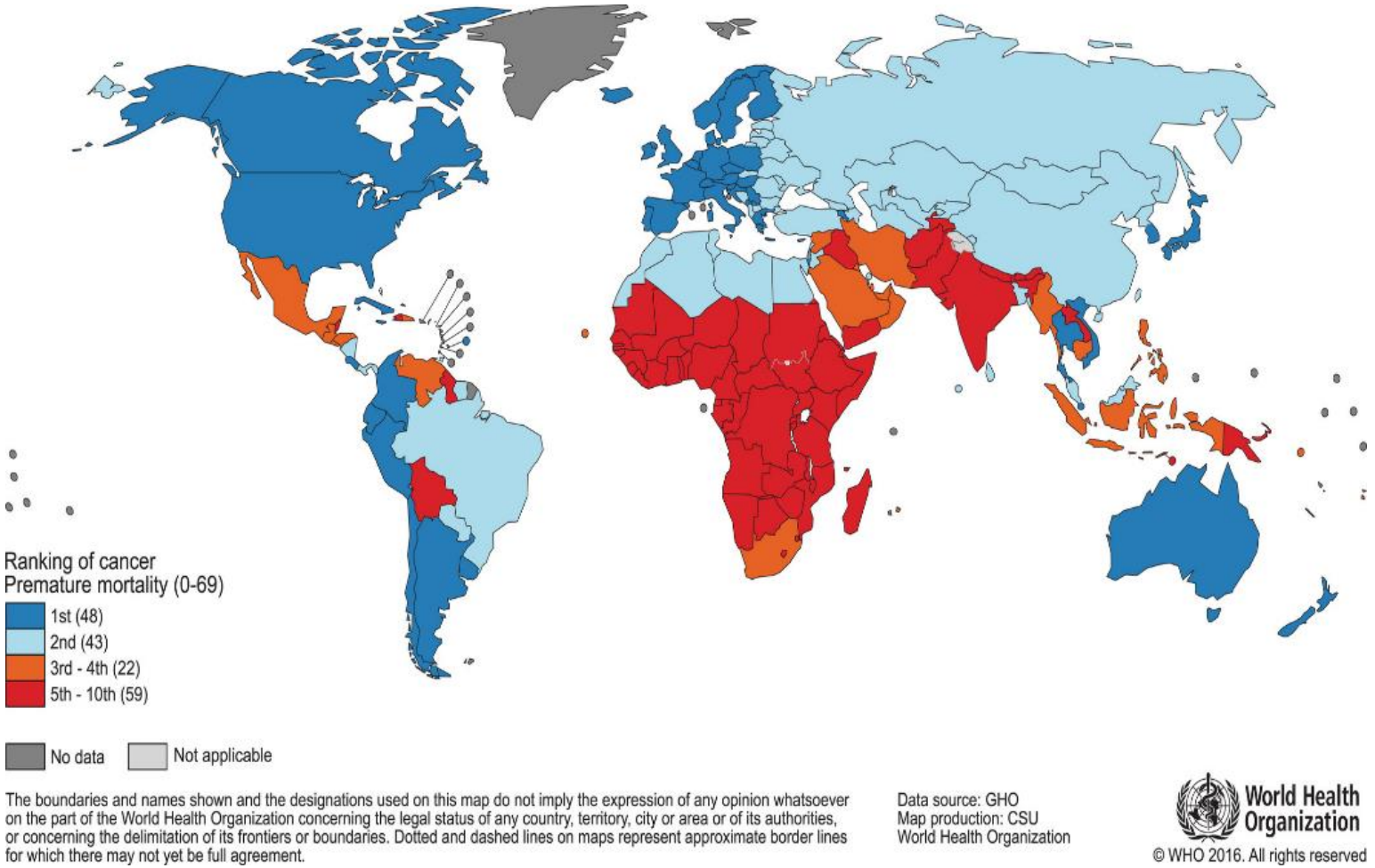
- Vu les relations concentration- effet thérapeutique ou effets indésirables de l'IM, un monitoring des concentrations de l'IM ou des autres ITK s'impose pour d'une part déterminer la concentration plasmatique résiduelle des patients et d'autre part, individualiser en fonction de la concentration trouvée, les posologies, afin d'optimiser l'effet thérapeutique de l'ITK circulant tout en ayant le moins effet toxique. Dans ce contexte nous envisageons donc de lancer le dosage plasmatique de l'IM et des autres ITK par HPLC.
- Un autre domaine de recherche devrait être amélioré et qui concerne l'identification de marqueurs génétiques impliqué dans la réponse moléculaire. Ainsi la mise en évidence de ces marqueurs génétiques permettra d'identifier les individus ayant plus de chance d'obtenir les meilleures réponses et ceux à haut risque de développer une résistance.
- Plusieurs pistes restent à développer pour essayer d'apporter des explications par-rapport à la différence de réponse qui existe entre les deux types de transcrit majeurs. Une piste de recherche plus approfondie doit s'ouvrir vers une meilleure compréhension notamment du contrôle immunologique de la maladie.

Un des mécanismes biochimiques responsables de l'instabilité génétique et donc de la résistance serait l'augmentation du stress oxydatif de la cellule cancéreuse généré par la production d'espèces oxygénées activées (ROS, pour reactive oxygen species). D'autre part, il semble que l'expression de BCR-ABL augmente la production de ROS qui sont à l'origine de mutations ponctuelles et également de cassures doubles brins d'ADN. De plus, Le rôle de radicaux libres dans le développement des mutations a été confirmé par la genèse uniquement dans le compartiment des cellules souches de ROS dans un modèle murin de LMC en phase chronique, ce qui a abouti à l'émergence de mutations d'ABL (Giotopoulos et al. 2015). Ce ci ouvre donc la possibilité de développer d'autres voies de recherche.

Nous espérons que les expériences que j'ai réalisées au cours de ma Thèse pourront également être utiles pour répondre à ces questions.

Annexes

Annexe 1



Annexe 1: Carte mondiale présentant le classement national du cancer comme cause de décès à moins de 70 ans en 2015. Le nombre de pays représentés dans chaque groupe de classement est indiqué dans la légende. Source : Organisation mondiale de la santé.

Annexe 2

Estimated New Cases

Males				Females		
Prostate	164,690	19%		Breast	266,120	30%
Lung & bronchus	121,680	14%		Lung & bronchus	112,350	13%
Colon & rectum	75,610	9%		Colon & rectum	64,640	7%
Urinary bladder	62,380	7%		Uterine corpus	63,230	7%
Melanoma of the skin	55,150	6%		Thyroid	40,900	5%
Kidney & renal pelvis	42,680	5%		Melanoma of the skin	36,120	4%
Non-Hodgkin lymphoma	41,730	5%		Non-Hodgkin lymphoma	32,950	4%
Oral cavity & pharynx	37,160	4%		Pancreas	26,240	3%
Leukemia	35,030	4%		Leukemia	25,270	3%
Liver & intrahepatic bile duct	30,610	4%		Kidney & renal pelvis	22,660	3%
All Sites	**856,370**	**100%**		**All Sites**	**878,980**	**100%**

Estimated Deaths

Males				Females		
Lung & bronchus	83,550	26%		Lung & bronchus	70,500	25%
Prostate	29,430	9%		Breast	40,920	14%
Colon & rectum	27,390	8%		Colon & rectum	23,240	8%
Pancreas	23,020	7%		Pancreas	21,310	7%
Liver & intrahepatic bile duct	20,540	6%		Ovary	14,070	5%
Leukemia	14,270	4%		Uterine corpus	11,350	4%
Esophagus	12,850	4%		Leukemia	10,100	4%
Urinary bladder	12,520	4%		Liver & intrahepatic bile duct	9,660	3%
Non-Hodgkin lymphoma	11,510	4%		Non-Hodgkin lymphoma	8,400	3%
Kidney & renal pelvis	10,010	3%		Brain & other nervous system	7,340	3%
All Sites	**323,630**	**100%**		**All Sites**	**286,010**	**100%**

Annexe 2: Dix principaux types de cancer pour l'estimation des nouveaux cas de cancer et des décès par sexe, États-Unis, 2018

Annexe 3

DÉSIGNATION DES MALADIES	DÉLAI DE PRISE EN CHARGE	LISTE INDICATIVE DES TRAVAUX SUSCEPTIBLES DE PROVOQUER CES MALADIES
Hypoplasies et aplasies médullaires isolées ou associées (anémie ; leuconeutropénie ; thrombopénie) acquises primitives non réversibles .	3 ans (sous réserve d'une durée d'exposition de 6 mois)	Opérations de production, transport et utilisation du benzène et autres produits renfermant du benzène, notamment : - production, extraction, rectification du benzène et des produits en renfermant ; - emploi du benzène et des produits en renfermant pour la production de leurs dérivés, notamment en organosynthèse ; - préparation des carburants renfermant du benzène, transvasement, manipulation de ces carburants, travaux en citerne ; - emplois divers du benzène comme dissolvant des résines naturelles ou synthétiques ; - production et emploi de vernis, peintures, émaux, mastics, encre, colles, produits d'entretien renfermant du benzène ; - fabrication de simili-cuir ; - production, manipulation et emploi des dissolutions de caoutchouc naturel ou synthétique, ou des solvants d'avivage contenant du benzène ; - autres emplois du benzène ou des produits en renfermant comme agent d'extraction, d'élution, d'imprégnation, d'agglomération ou de nettoyage et comme décapant, dissolvant ou diluant ; - opérations de séchage de tous les produits, articles, préparations, substances où le benzène (ou les produits en renfermant) est intervenu comme agent d'extraction, d'élution, de séparation, d'imprégnation, d'agglomération, de nettoyage, de concentration, et comme décapant, dissolvant ou diluant ; - emploi du benzène comme déshydratant des alcools et autres substances liquides ou solides ; - emploi du benzène comme dénaturant ou réactif de laboratoire - poste de nettoyage, curage, pompage des boues de fosses de relevage dans le traitement des eaux usées de raffinerie
Syndromes myélodysplasiques acquis et non médicamenteux	3 ans	
Leucémies aiguës myéloblastique et lymphoblastique à l'exclusion des leucélmuies aiguës avec des antécédents d'hémopathies.	20 ans (sous réserve d'une durée d'exposition de 6 mois)	
Syndromes myéloprolifératifs.	20 ans (sous réserve d'une durée d'exposition de 6 mois)	
Nota.- Pour le détail des syndromes myélodysplasiques et myéloprolifératifs, il convient de se référer à la classification en vigueur des tumeurs des tissus hématopoïétiques et lymphoïdes de l'Organisation mondiale de la santé (OMS)		

Annexe 3: Hémopathies provoquées par le benzène et tous les produits en renfermant élaboré par l'INRS (Régime général tableau 4)

Annexe 4

موافقة المريض بعد التوعية من أجل الدراسة في الجينات

لمـــــرض "الخباثة الدموية"

الإسم الشخصي والعائلي للمريض.....

إقـــــــــرارّ المريـــــــض

أقر، أنا الموقع(ة) أدناه المريض(ة) ..... **أقر بموافقتي الإرادية** على مشاركتي في **دراسة "علم الوراثة الخلوية و علم الاحياء الجزيئي للخباثة الدموية".**

كما أقر بأنني تلقيت التوضيحات اللازمة لفهم طبيعة هذه الدراسة والهدف منها.

حرر في: ..... بتاريخ.....

توقيـــــع الأب أو الوليّ:

إقـــــــــرار الطبيـــــــــب

أقر أنا الطبيب.....بأنني شرحت بالقدر الوافي لِلمريض(ة) طبيعة هذه الدراسة والهدف منها وانه وافق بمحض إرادته على المشاركة فيها.

حرر في: ..... بتاريخ.....

توقيع الطبيب:

Formulaire de consentement du patient Adulte

après explication de la nature de l'étude sur les Hémopathies Malignes

Nom et prénom du patient (e) ……

Consentement du patient :

J'approuve, patient (e) ..... mon accord pour la participation volontaire dans l'étude « Cytogénétique et Biologie Moléculaire des Hémopathies Malignes », comme j'approuve que j'ai reçu les explications nécessaires pour comprendre la nature de cette étude et son objectif.

Fait le : …../…../……, à :…….

La signature du patient(e):

Consentement du médecin :

J'approuve Dr. …….. que j'ai expliqué au patient (e) la nature de cette étude, et qu'il avait accepté volontairement d'y participer.

Fait le : …../…../……, à :…….

La signature du médecin:

UNITE DE GENETIQUE MEDICALE ET D'ONCOGENETIQUE

FICHE DE RECUIL DES DONNEES

Hémopathie maligne de type* : .....

Dossier Genetique : **Dossier clinique :** **IP :**

***les éléments étoilés à remplir obligatoirement**

Nom, Prénom :

Date de naissance* :

Age * :

N° Tel* :

Stade de la leucémie* :

Syndrome associé :

Profession* :

Facteurs de risque (hors âge) :

Prélèvement sanguin (2 tubes EDTA de 4 ml)* **Fait le .....**

Propositus ☐ **Père** ☐ **Mère** ☐

Autres :.....☐.....

Fait à Fès, le ..... **Signature et cachet du médecin :**

Annexe 4: Formulaire de consentement du patient en arabe et en français et fiche de recueil des données

Annexe 5

FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE FES
LE CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE HASSAN II FES
COMITE D'ETHIQUE HOSPITALO-UNIVERSITAIRE FES

Fès le,20/07/2017

A

Messieurs les Professeurs
OULDIM Karim et EL AZAMI EL IDRISSI Mohammed
Faculté de Médecine et Pharmacie de Fès

AVIS DU COMITE D'ETHIQUE HOSPITALO-UNIVERSITAIRE FES

Partie I : Titre et référence du protocole

Le comité a été saisi à nouveau le mois de Mai 2017

Une demande d'avis pour un projet de recherche intitulé: "**Cytogénétique et biologie moléculaire des hémopathies malignes**", classé sous le N°**14/16**

Dont le promoteur est : Faculté de Médecine et Pharmacie de Fès

Adresse : Faculté de Médecine et Pharmacie de Fès

Partie II : Documents

Le comité a examiné les documents relatifs à ce projet en séance :

-Protocole de recherche,	✓
-Questionnaire de l'étude	✓
-Curriculum vitae de l' investigateur principal de l'étude	✓
-Formulaire de consentement éclaire des patients, en français et en arabe	✓
-Fiche d'information en français et en arabe	✓

Partie III : Investigateurs impliqués dans l'essai

- **Pr OULDIM Karim** : Pr Agrégé Génétique Médicale, CHU Hassan II.
- **Pr EL AZAMI EL IDRISSI Mohammed** : Vice Doyen à la Recherche Scientifique et la Coopération et Professeur Habilité en Immunologie, FMPF.

Secrétariat : Bureau de département, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès BP.1893 ; Km2.200 Route de sidi Harazem-Fès
Tél : 05 35 61 93 18/19/20 Fax : 05 35 61 93 21 Email : comite.ethique.fes@usmba.ac.ma

1/2

Partie IV : Délibération

Le comité a, par la suite, délibéré le 20/07/2017

Ont participé à la délibération :

▪ Nom : HIDA	Prénom : Moustapha	Titre : Pédiatrie
▪ Nom : EL RHAZI	Prénom : Karima	Titre : Epidémiologiste
▪ Nom : BENNANI	Prénom : Bahia	Titre : Biologiste
▪ Nom : ABABOU	Prénom : Mohammed	Titre : Sociologue
▪ Nom : ACHOUR	Prénom : Sanae	Titre : Toxicologue
▪ Nom : BELAHSEN	Prénom : Mohammed Faouzi	Titre : Neurologue

A l'unanimité des membres présents, le comité a adopté la délibération suivante :

Avis Favorable.

Partie V : Référence du comité

Le comité suit une procédure de qualité pour son fonctionnement, et se base pour ses délibérations sur la déclaration d'Helsinki version 2008, la dernière version du texte de l'ICH concernant les bonnes pratiques cliniques, la directive Européenne (réf : 2001/20/CE), la décision du ministre de la santé N°02/DRC/00 du 03/12/2012, relative aux Recherches Biomédicales.

Le président du Comité d'Ethique
Pr. HIDA Moustapha

Secrétariat : Bureau de département, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès BP.1893 ; Km2.200 Route de sidi Harazem-Fès
Tél : 05 35 61 93 18/19/20 Fax : 05 35 61 93 21 Email : comite.ethique.fes@usmba.ac.ma

Annexe 5: Approbation du comité d'éthique hospitalo-universitaire Fès

Annexe 6

Annexe 6: Références des kits et de l'automate du séquençage par Sanger

A. Kit de purification du produit PCR :

- L'ExoSap-IT® qui est constitué principalement de deux enzymes:
  - ✓ L'exonucléase S1 qui dégrade tous les brins monocaténaires et donc toutes les amorces.
  - ✓ La phosphatase alcaline qui va déphosphoryler tous les dNTP qui n'étaient pas incorporés dans la réaction précédente.

B. Kit de la réaction de séquence

- Kit de la réaction de séquence ABI®BigDye® Terminator V1.1 cycle sequencing Kits qui contient principalement :
  - ✓ Taq polymérase
  - ✓ dNTP
  - ✓ ddNTP marqués
  - ✓ Tampon
  - ✓ MgCL2

C. Kit de purification du produit de la réaction de séquence

- Kit "BigDye® XTerminator™ purification Kit" contenant :
  - ✓ SAM™Solution (tampon)
  - ✓ BigDye®XTerminator™Solution (résines)

D. Le séquenceur

- L'automate du séquençage est de type AppliedBiosystems 3500Dx Genetic Analyser
  - Le logiciel de conversion et visualisation des séquences est SequencingAnalysisSeqA v.5.4 (AppliedBiosystems)

Annexe 7

Variable (%)	Population générale N=123	PC (n=103)	PA (n=15)	PB (n=5)
Age (Ans)	<45	20,15 %	5,72 %	0,88 %
	>45	60,24 %	9,79 %	3,32 %
Sexe	Homme	43,26 %	5 %	3,42 %
	Femme	40 %	7,47 %	1 %
Asthénie	Non	56,92 %	8,94 %	4,06 %
	Oui	16,83 %	3,25 %	0,00 %
Splénomégalie	Non	43,90 %	2,44 %	4,06 %
	Oui	40 %	9,76 %	0,00 %
Hépatosplénomégalie	Non	73,17 %	9,76 %	0,00 %
	Oui	10,57 %	2,44 %	4,06 %
Amaigrissement	Non	66,67 %	10,57 %	4,06 %
	Oui	17,10 %	1,63 %	0,00 %
AEG	Non	71,55 %	7,32 %	0,00 %
	Oui	12,20 %	4,89 %	4,06 %
Fièvre	Non	71,55 %	12,20 %	4,06 %
	Oui	12,20 %	0,00 %	0,00 %
épistaxis	Non	81,30 %	12,20 %	4,06 %
	Oui	2,44 %	0,00 %	0,00 %
Plénitude abdominal	Non	65,04 %	5,70 %	4,06 %
	Oui	18,70 %	6,50 %	0,00 %
Douleurs abdominales	Non	71,55 %	5,70 %	4,06 %
	Oui	12,20 %	6,50 %	0,00 %
Anémie	Non	73,17 %	8,94 %	4,06 %
	Oui	10,57 %	3,25 %	0,00 %
Dyspnée	Non	81,30 %	12,20 %	4,06 %
	Oui	2,44 %	0,00 %	0,00 %
Diarrhée	Non	81,30 %	12,20 %	4,06 %
	Oui	2,44 %	0,00 %	0,00 %
Apyrexie	Non	82,87 %	8,94 %	4,06 %
	Oui	0,81 %	3,25 %	0,00 %
Toux	Non	81,30 %	12,20 %	4,06 %
	Oui	2,44 %	0,00 %	0,00 %
Nausée	Non	79,67 %	12,20 %	4,06 %
	Oui	4,06 %	0,00 %	0,00 %
Anorexie	Non	78,05 %	12,20 %	4,06 %
	Oui	5,70 %	0,00 %	0,00 %
Pale skin	Non	78,05 %	12,20 %	4,06 %
	Oui	5,70 %	0,00 %	0,00 %
Ichthyoses/ Ecchymose	Non	76,42 %	12,20 %	4,06 %
	Oui	7,32 %	0,00 %	0,00 %
C-Hépatites	Non	81,30 %	12,20 %	4,06 %
	Oui	2,44 %	0,00 %	0,00 %
Tachycardie	Non	81,30 %	12,20 %	4,06 %
	Oui	2,44 %	0,00 %	0,00 %

Annexe 7: Tableau des symptômes selon la phase de la LMC présentant le pourcentage de l'âge, le sexe, et les symptômes selon la phase de la maladie chez la population générale

Annexe 8



LCAM

Laboratoire Central d'analyses Médicales

CHEF DE SERVICE DU LABORATOIRE

Pr.[redacted]

HEMATOLOGIE

[redacted]

HEMOGRAMME-SUR AUTOMATE SYSMEX XE2000

	Résultat	Valeurs Normales	Etat	Résultats Antérieurs
NUMERATION ERYTHROCYTAIRE				
HEMATIES	2,29 10^6/uL	(4,20 - 5,70)		
HEMOGLOBINE	7,00 g/dL	(14,00 - 17,00)		
HEMATOCRITE	18,7 %	(37,00 - 46,00)		
VGM	81,7 fL	(85,00 - 95,00)		
TCMH	30,6 pg	(27,00 - 32,00)		
CCMH	37,4 g/dL	(32,00 - 36,00)		
CV HEMATIES	13,0 %	(9,00 - 17,00)		
FORMULE LEUCOCYTAIRE				
LEUCOCYTES	377,31 10^3/uL	(4,00 - 10,00)		
POLY.NEUTROPHILES	166,02 10^3/uL	(2,00 - 7,00)		
NEUT%	44,0 %			
POLY.EOSINOPHILES	0,00 10^3/uL	(0,05 - 0,30)		
	0,0 %			
POLY.BASOPHILES	0,00 10^3/uL	(0,01 - 0,05)		
	0,0 %			
LYMPHOCYTES	7,55 10^3/uL	(0,90 - 5,20)		
	2,0 %			
MONOCYTES	3,77 10^3/uL	(0,10 - 1,00)		
	1,0 %			
CELLULES IMMATURES				
BLASTES	7,55 10^3/uL	(0,00 - 1 000,00)		
	2,00 %			
PROMYÉLOCYTES	33,96 10^3/uL	(0,00 - 1 000,00)		
	9,00 %			
MYÉLOCYTES	60,37 10^3/uL	(0,00 - 1 000,00)		
	16,00 %			
MÉTAMYÉLOCYTES	98,10 10^3/uL	(0,00 - 1 000,00)		
	26,00 %			
NUMERATION PLAQUETTAIRE				
PLAQUETTES	206 10^3/uL	(150,00 - 400,00)		
VPM	10,4 fL	(9,00 - 13,00)		

VT-validé techniquement

VB-validé biologiquement

signature

[redacted]

Ceci est une signature electronique

Page 1 sur 3

Annexe 8: Exemple d'hémogramme ou NFS (Numération Formule Sanguine) d'une patiente atteinte de LMC en phase Chronique, montrant une forte hyperleucocytose

Références

Akinyemiju, Tomi F. 2012. “Socio-Economic and Health Access Determinants of Breast and Cervical Cancer Screening in Low-Income Countries: Analysis of the World Health Survey.” *PLoS ONE* 7(11): 3–10.

Al-Achkar, Walid, Faten Moassass, Nagham Youssef, et Abdulsamad Wafa. 2016. « Correlation of P210 BCR-ABL Transcript Variants with Clinical, Parameters and Disease Outcome in 45 Chronic Myeloid Leukemia Patients ». *Journal of B.U.ON.: Official Journal of the Balkan Union of Oncology* 21 (2): 444-49.

Al-Faluji, Abdulwahab A. R., Salih Hussein Ali, and Arkan A. Jasem Al-Esawi. 2012. “Incidence of Cancer in Fallujah above 10 Years Age with over View of Common Cancers in 2011.” *Health* 04(09): 591–96.

Albano, F. et al. 2010. “Genomic Segmental Duplications on the Basis of the t(9;22) Rearrangement in Chronic Myeloid Leukemia.” *Oncogene* 29(17): 2509–16.

Alikian, Mary et al. 2017. “Molecular Techniques for the Personalised Management of Patients with Chronic Myeloid Leukaemia.” *Biomolecular Detection and Quantification* 11: 4–20. http://dx.doi.org/10.1016/j.bdq.2017.01.001.

Almeida Filho, T. P. de, P. A. Maia Filho, Maritza Cavalcante Barbosa, Luana Letícia Alves Dutra, Marilena Facundo de Castro, Fernando Barroso Duarte, Acy Telles de Souza Quixadá, et Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes. 2019. « Does BCR-ABL Transcript Type Influence the Prognosis of Patients in Chronic Myelogenous Leukemia Chronic Phase? » *Hematology, Transfusion and Cell Therapy* 41 (2): 114-18. https://doi.org/10.1016/j.htct.2018.10.003.

An, Xin et al. 2010. “BCR-ABL Tyrosine Kinase Inhibitors in the Treatment of Philadelphia Chromosome Positive Chronic Myeloid Leukemia: A Review.” *Leukemia Research* 34(10): 1255–68. http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2010.04.016.

Ankathil, Ravindran, Husin Azlan, Abu Abdullah Dzarr, and Abdul Aziz Baba. 2018. “Pharmacogenetics and the Treatment of Chronic Myeloid Leukemia: How Relevant Clinically? An Update.” *Pharmacogenomics* 19(5): 475–93.

Apperley, Jane F. 2015. “Chronic Myeloid Leukaemia.” *The Lancet* 385(13): 1447–59. http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62120-0.

Assouline, S., and J. H. Lipton. 2011. “Monitoring Response and Resistance to Treatment in Chronic Myeloid Leukemia.” *Current Oncology* 18(2): e71. /pmc/articles/PMC3070714/?report=abstract (December 3, 2020).

Attaullah, Mohammad et al. 2018. “Serum Organochlorine Pesticides Residues and Risk of Cancer: A Case-Control Study.” *Saudi Journal of Biological Sciences* 25(7): 1284–90.

Baccarani, Michele et al. 2009. “Chronic Myeloid Leukemia: An Update of Concepts and Management Recommendations of European LeukemiaNet.” *Journal of Clinical Oncology* 27(35): 6041–51.

———. 2013. “European LeukemiaNet Recommendations for the Management of Chronic Myeloid Leukemia: 2013.” *Blood* 122(6): 872–84.

———. 2019. “The Proportion of Different BCR-ABL1 Transcript Types in Chronic Myeloid Leukemia . An International Overview.” *Leukemia* 10(1038): 1–12.

Baccarani, Michele, Gianantonio Rosti, and Simona Soverini. 2019. “Chronic Myeloid Leukemia : The Concepts of Resistance and Persistence and the Relationship with the BCR-ABL1 Transcript Type.” *Leukemia*. http://dx.doi.org/10.1038/s41375-019-0562-1.

Baccarani, Michele, Fausto Castagnetti, Gabriele Gugliotta, Gianantonio Rosti, Simona Soverini, Ali Albeer, et Markus Pfirrmann. 2019. « The proportion of different BCR-ABL1 transcript types in chronic myeloid leukemia. An international overview ». *Leukemia* 10 (1038): 1-12. https://doi.org/10.1038/s41375-018-0341-4.

Baer, Constance, Wolfgang Kern, Sarah Koch, Niroshan Nadarajah, Sonja Schindela, Manja Meggendorfer, Claudia Haferlach, et Torsten Haferlach. 2016. « Ultra-deep sequencing leads to earlier and more sensitive detection of the tyrosine kinase inhibitor resistance mutation T315I in chronic myeloid leukemia ». *Haematologica* 101 (7): 830-38. https://doi.org/10.3324/haematol.2016.145888.

« Bcr-Abl Kinase Domain Mutations, Drug Resistance, and the Road to a Cure for Chronic Myeloid Leukemia ». 2007. *Blood* 110 (7): 2242-49. https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-066936.

Bennour, Ayda, Ines Ouahchi, Bechir Achour, Monia Zaier, Abderrahim Khelif, Yosra Ben Youssef, Ali Saad, et Halima Sennana. 2013. « Analysis of the clinico-hematological relevance of the breakpoint location within M- BCR in chronic myeloid leukemia ». *Medical oncology* 30 (348): 1-6. https://doi.org/10.1007/s12032-012-0348-z.

Branford, S., Z. Rudzki, A. Harper, A. Grigg, K. Taylor, S. Durrant, C. Arthur, et al. 2003. « Imatinib Produces Significantly Superior Molecular Responses Compared to Interferon Alfa plus Cytarabine in Patients with Newly Diagnosed Chronic Myeloid

Leukemia in Chronic Phase ». *Leukemia* 17 (12): 2401-9. https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403158.

Branford, Susan, Junia V. Melo, et Timothy P. Hughes. 2009. « Selecting Optimal Second-Line Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy for Chronic Myeloid Leukemia Patients after Imatinib Failure: Does the BCR-ABL Mutation Status Really Matter? » *Blood* 114 (27): 5426-35. https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-215939.

Branford, Susan, Zbigniew Rudzki, Sonya Walsh, Ian Parkinson, Andrew Grigg, Jeff Szer, Kerry Taylor, et al. 2003. « Detection of BCR-ABL Mutations in Patients with CML Treated with Imatinib Is Virtually Always Accompanied by Clinical Resistance, and Mutations in the ATP Phosphate-Binding Loop (P-Loop) Are Associated with a Poor Prognosis ». *Blood* 102 (1): 276-83. https://doi.org/10.1182/blood-2002-09-2896.

Baeker Bispo, Jordan A., Paulo S. Pinheiro, and Erin K. Kobetz. 2020. "Epidemiology and Etiology of Leukemia and Lymphoma." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 10(6): 1–22.

Baer, Constance et al. 2016. "Ultra-Deep Sequencing Leads to Earlier and More Sensitive Detection of the Tyrosine Kinase Inhibitor Resistance Mutation T315I in Chronic Myeloid Leukemia." *Haematologica* 101(7): 830–38.

Bennour, Ayda et al. 2013. "Analysis of the Clinico-Hematological Relevance of the Breakpoint Location within M- BCR in Chronic Myeloid Leukemia." *Medical oncology* 30(348): 1–6.

Boddu, Prajwal et al. 2017. "Life after Ponatinib Failure : Outcomes of Chronic and Accelerated Phase CML Patients Who Discontinued Ponatinib in the Salvage Setting." *Leukemia & Lymphoma* 0(0): 1–11. https://doi.org/10.1080/10428194.2017.1379076.

Bower, Hannah et al. 2016. "Life Expectancy of Patients With Chronic Myeloid Leukemia Approaches the Life Expectancy of the General Population." *American Society of Clinical Oncology* 34(24): 2851–58.

Boyd, James C. 2010. "Defining Laboratory Reference Values and Decision Limits: Populations, Intervals, and Interpretations." *Asian Journal of Andrology* 12(1): 83–90.

Brück, Oscar et al. 2018. "Immune Cell Contexture in the Bone Marrow Tumor Microenvironment Impacts Therapy Response in CML." *Leukemia* 32(7): 1643–56. http://dx.doi.org/10.1038/s41375-018-0175-0.

Bruzzoni-Giovanelli, Heriberto et al. 2015. "Genetic Polymorphisms Associated with Increased

Risk of Developing Chronic Myelogenous Leukemia." *Oncotarget* 6(34): 36269–77.

Busby, Chris, Malak Hamdan, and Entesar Ariabi. 2010. "Cancer, Infant Mortality and Birth Sex-Ratio in Fallujah, Iraq 2005-2009." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7(7): 2828–37.

Castagnetti, Fausto, Gabriele Gugliotta, Massimo Breccia, Alessandra Iurlo, Luciano Levato, Francesco Albano, Paolo Vigneri, et al. 2017. « The BCR-ABL1 Transcript Type Influences Response and Outcome in Philadelphia Chromosome-Positive Chronic Myeloid Leukemia Patients Treated Frontline with Imatinib ». *American Journal of Hematology* 92 (8): 797-805. https://doi.org/10.1002/ajh.24774.

Chandra, H. Sharat et al. 2011. "Philadelphia Chromosome Symposium: Commemoration of the 50th Anniversary of the Discovery of the Ph Chromosome." *Cancer Genetics* 204(4): 171–79. http://dx.doi.org/10.1016/j.cancergen.2011.03.002.

Chen, Wanqing et al. 2016. "Cancer Statistics in China, 2015." *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 66(2): 115–32.

Chereda, Bradley, and Junia V Melo. 2015. "Natural Course and Biology of CML." *Annals of Hematology* 94(2): 107–21.

Chomel, Jean-claude. 2017. "Biologie Moléculaire de La Leucémie Myéloïde Chronique : Dernières Avancées." *Revue Francophone des Laboratoires* 492: 33–40. http://dx.doi.org/10.1016/S1773-035X(17)30162-4.

Chomel, Jean Claude, Djamel Aggoune, Nathalie Sorel, and Ali G. Turhan. 2014. "Leucémie Myéloïde Chronique." *Medecine/Sciences* 30(4): 452–61.

Chowdhury, Subhankar, and Partha pratim Chakraborty. 2019. "A Study to Determine the Clinical, Hematological, Cytogenetic, and Molecular Profile in CML Patient in and around Eastern UP, India." *Journal of Family Medicine and Primary Care* 8(7): 2450–55. http://www.jfmpc.com/article.asp?issn=2249-4863;year=2017;volume=6;issue=1;spage=169;epage=170;aulast=Faizi.

Cilloni, Daniela, and Giuseppe Saglio. 2012. "Molecular Pathways: BCR-ABL." *Clinical Cancer Research* 18(4): 930–37.

Cohen, George B., Ruibao Ren, and David Baltimore. 1995. "Modular Binding Domains in Signal Transduction Proteins." *Cell* 80(2): 237–48.

Colditz, Graham A., Thomas A. Sellers, and Edward Trapido. 2006. "Epidemiology - Identifying the Causes and Preventability of Cancer?" *Nature Reviews Cancer* 6(1): 75–

83.

Corbin, Amie S., Elisabeth Buchdunger, Furet Pascal, et Brian J. Druker. 2002. « Analysis of the Structural Basis of Specificity of Inhibition of the Abl Kinase by STI571* ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (35): 32214-19. https://doi.org/10.1074/jbc.M111525200.

Daniel A. Arber, Attilio Orazi, Robert Hasserjian, J¨urgen Thiele, Michael J. Borowitz, Michelle M. Le Beau, Clara D. Bloomfield, Mario Cazzola, and James W. Vardiman. 2016. "The 2016 Revision to the World Health Organization (WHO) Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia." : 2391–2405.

Danisz, Katarzyna, and Janusz Blasiak. 2013. "Role of Anti-Apoptotic Pathways Activated by BCR/ABL in the Resistance of Chronic Myeloid Leukemia Cells to Tyrosine Kinase Inhibitors." *Acta Biochimica Polonica* 60(4): 503–14.

Danthala, Madhav, Sadashivudu Gundeti, Siva Prasad Kuruva, Krishna Chaitanya Puligundla, Praveen Adusumilli, Ashok Pillai Karnam, Stalin Bala, Meher Lakshmi Konatam, Lakshmi Srinivas Maddali, et Raghunadha Rao Digumarti. 2017. « Generic Imatinib in Chronic Myeloid Leukemia : Survival of the Cheapest ». *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia* 17 (7): 457-62. https://doi.org/10.1016/j.clml.2017.05.006.

Druker, Brian J., Shu Tamura, Elisabeth Buchdunger, Sayuri Ohno, Gerald M. Segal, Shane Fanning, Jürg Zimmermann, et Nicholas B. Lydon. 1996. « Effects of a Selective Inhibitor of the Abl Tyrosine Kinase on the Growth of Bcr–Abl Positive Cells ». *Nature Medicine* 2 (5): 561-66. https://doi.org/10.1038/nm0596-561.

Dwyer, Michael E O, Michael J Mauro, Gwen Kurilik, Motomi Mori, Suzanne Balleisen, Susan Olson, Ellen Magenis, Renaud Capdeville, et Brian J Druker. 2002. « The impact of clonal evolution on response to imatinib mesylate (STI571) in accelerated phase CML ». *CLINICAL OBSERVATIONS, INTERVENTIONS,AND THERAPEUTIC TRIALS* 100 (5): 1628-33. https://doi.org/10.1182/blood-2002-03-0777.Reprints.

Danthala, Madhav et al. 2017. "Generic Imatinib in Chronic Myeloid Leukemia : Survival of the Cheapest." *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia* 17(7): 457–62.

Davis, Amanda S., Anthony J. Viera, and Monica D. Mead. 2014. "Leukemia: An Overview for Primary Care." *American Family Physician* 89(9): 731–38.

Deininger, M. W.N., J. M. Goldman, and J. V. Melo. 2000. "The Molecular Biology of Chronic Myeloid Leukemia." *Blood* 96(10): 3343–56.

Delacrétaz, F. et al. 1987. "Histopathology of Myelodysplastic Syndromes. The FAB Classification (Proposals) Applied to Bone Marrow Biopsy." *American Journal of Clinical*

Pathology 87(2): 180–86.

DeSantis, Carol E. et al. 2019. “Cancer Statistics for African Americans, 2019.” *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 69(3): 211–33.

Desmet, François Olivier et al. 2009. “Human Splicing Finder: An Online Bioinformatics Tool to Predict Splicing Signals.” *Nucleic Acids Research* 37(9): 1–14.

Dine, G. et al. 2013. “Maladie Résiduelle et Leucémie Myéloïde Chronique.” *Immuno-Analyse et Biologie Specialisee* 28(4): 201–6. http://dx.doi.org/10.1016/j.immbio.2013.03.006.

Dos Santos, Patrick Wellington da Silva et al. 2020. “Transcriptome and DNA Methylation Changes Modulated by Sulforaphane Induce Cell Cycle Arrest, Apoptosis, DNA Damage, and Suppression of Proliferation in Human Liver Cancer Cells.” *Food and Chemical Toxicology* 136(October 2019): 111047. https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.111047.

Dwyer, Michael E O et al. 2002. “The Impact of Clonal Evolution on Response to Imatinib Mesylate (STI571) in Accelerated Phase CML.” *CLINICAL OBSERVATIONS, INTERVENTIONS,AND THERAPEUTIC TRIALS* 100(5): 1628–33.

Eichhorst, B. et al. 2020. “Chronic Lymphocytic Leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for Diagnosis, Treatment and Follow-Up.” *Annals of Oncology* 32(1): 23–33. https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.09.019.

Émile, Carole. 2004. “La PCR En Temps Réel: Principes et Applications.” *Option/Bio* 2(322): 7.

ESMO (European Socity for Medical Oncology). 2013. “File:///D:/Nouveau Dossier (3)/Rapport/Qu’est-Ce Que La LMC.Pdf.” *un guide pour les patients* 1: 27.

Ercaliskan, Abdulkadir, et A. Emre Eskazan. 2018. « The Impact of BCR-ABL1 Transcript Type on Tyrosine Kinase Inhibitor Responses and Outcomes in Patients with Chronic Myeloid Leukemia ». *Cancer* 124 (19): 3806-18. https://doi.org/10.1002/cncr.31408.

Etten, Richard A. Van. 1999. “Cycling, Stressed-out and Nervous: Cellular Functions of of c-Abl.” *Trends in cell biology* 9(5): 179–86.

Flis, Sylwia, and Tomasz Chojnacki. 2019. “Chronic Myelogenous Leukemia, a Still Unsolved Problem: Pitfalls and New Therapeutic Possibilities.” *Drug Design, Development and Therapy* 13: 825–43.

Garcia-Horton, Alejandro, and Jeffrey H. Lipton. 2020. “Treatment Outcomes in Chronic Myeloid Leukemia: Does One Size Fit All?” *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 18(10): 1421–28.

Ghosh, Matthew S. Hayden, Sankar. 2004. “Signaling to NF-KappaB.” *GENES & DEVELOPMENT* 18(4): 2195–2224.

Gianelli, Umberto, Alessandra Iurlo, Daniele Cattaneo, and Giorgio Lambertenghi-Deliliers. 2014. “Cooperation between Pathologists and Clinicians Allows a Better Diagnosis of Philadelphia Chromosome-Negative Myeloproliferative Neoplasms.” *Expert Review of Hematology* 7(2): 255–64.

Gibson, Ursula E M, Christian A Heid, and P Mickey Williams. 1996. “A Novel Method for Real Time Quantitative RT-PCR.” *GENOME RESEARCH* 1054(9803): 995–1001.

Giotopoulos, George et al. 2015. “A Novel Mouse Model Identifies Cooperating Mutations and Therapeutic Targets Critical for Chronic Myeloid Leukemia Progression.” *Journal of Experimental Medicine* 212(10): 1551–69.

Goldman, John M, and Brian J Druker. 2016. “Chronic Myeloid Leukemia : Current Treatment Options.” *Blood journal* 98(7): 2039–43.

Gratwohl, Alois, and Geneviève Favre. 2005. “La Leucémie Myéloïde Chronique.” *Revue Medicale Suisse* 1(24): 1631–35.

Greenfield, Graeme, Ross McMullan, Nuala Robson, Julie McGimpsey, Mark Catherwood, et Mary Frances McMullin. 2019. « Response to Imatinib therapy is inferior for e13a2 BCR-ABL1 transcript type in comparison to e14a2 transcript type in chronic myeloid leukaemia ». *BMC Hematology* 19 (1): 7. https://doi.org/10.1186/s12878-019-0139-2.

Groffen, John et al. 1984. “Philadelphia Chromosomal Breakpoints Are Clustered within a Limited Region, Bcr, on Chromosome 22.” *Cell* 36(1): 93–99.

Hantschel, Oliver. 2012. “Structure, Regulation, Signaling, and Targeting of Abl Kinases in Cancer.” *Genes and Cancer* 3(5–6): 436–46.

Hanfstein, Benjamin, Michael Lauseker, Rüdiger Hehlmann, Susanne Saussele, Philipp Erben, Christian Dietz, Alice Fabarius, et al. 2014. « Distinct Characteristics of E13a2 versus E14a2 BCR-ABL1 Driven Chronic Myeloid Leukemia under First-Line Therapy with Imatinib ». *Haematologica* 99 (9): 1441-47. https://doi.org/10.3324/haematol.2013.096537.

Hk, Mahmoud, El Nahas Y, Abdel Moaty M, Abdel Fattah R, El Emary M, et El Metnawy W. 2009. « Kinetics of BCR-ABL Transcripts in Imatinib Mesylate Treated Chronic Phase CML (CPCML), A Predictor of Response and Progression Free Survival. » *International Journal of Biomedical Science : IJBS* 5 (3): 223-28.

Hebeda, Konnie et al. 2021. “Progression, Transformation, and Unusual Manifestations of Myelodysplastic Syndromes and Myelodysplastic-Myeloproliferative Neoplasms: Lessons Learned from the XIV European Bone Marrow Working Group Course 2019.” *Annals of Hematology* 100(1): 117–33.

Hehlmann, Rüdiger, Susanne Saußele, Astghik Voskanyan, and Richard T Silver. 2016. “Management of CML-Blast Crisis.” *Best Practice & Research Clinical Haematology* 49: 1–13.

Heisterkamp, Nora et al. 1983. “Localization of the C-Abl Oncogene Adjacent to a Translocation Break Point in Chronic Myelocytic Leukaemia.” *Nature* 306(5940): 239–42.

Hélène Losson, Michael Schnekenburger, and Marc Diederich Mario Dicato. 2020. “HDAC6—An Emerging Target Against Chronic Myeloid Leukemia?” *Cancers* 12(318): 1–31.

Hijiya, Nobuko et al. 2016. “Perspectives Pediatric Chronic Myeloid Leukemia Is a Unique Disease That Requires a Different Approach.” *Blood Cancer Journal* 127(4): 392–99.

Hochhaus, A. et al. 2017. “Treatment-Free Remission Following Frontline Nilotinib in Patients with Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase: Results from the ENESTfreedom Study.” *Leukemia* 31(7): 1525–31.

Hochhaus, Andreas. 2007. “Chronic Myeloid Leukaemia.” *Lancet* 370: : 342–350.

Hoffmann, V. S. et al. 2015. “The EUTOS Population-Based Registry: Incidence and Clinical Characteristics of 2904 CML Patients in 20 European Countries.” *Leukemia* 29(6): 1336–43.

Hossein, Mohammad, Mohammad Ali, and Shekoufeh Nikfar. 2017. “Comparative Safety and Efficacy of Tyrosine Kinase Inhibitors (TKIs) in the Treatment Setting of Different Types of Leukemia , and Different Types of Adenocarcinoma.” 95(September): 1556–64.

Jabbour, E., A. Hochhaus, J. Cortes, P. La Rosée, et H. M. Kantarjian. 2010. « Choosing the Best Treatment Strategy for Chronic Myeloid Leukemia Patients Resistant to Imatinib: Weighing the Efficacy and Safety of Individual Drugs with BCR-ABL Mutations and Patient History ». *Leukemia* 24 (1): 6-12. https://doi.org/10.1038/leu.2009.193.

Jain, Preetesh et al. 2013. “Early Responses Predict Better Outcomes in Patients with Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia: Results with Four Tyrosine Kinase Inhibitor Modalities.” *Blood* 121(24): 4867–74.

Kantarjian, Hagop M., Moshe Talpaz, Francis Giles, Susan O'Brien, et Jorge Cortes. 2006. « New Insights into the Pathophysiology of Chronic Myeloid Leukemia and Imatinib Resistance ». *Annals of Internal Medicine* 145 (12): 913-23. https://doi.org/10.7326/0003-4819-145-12-200612190-00008.

Khoury, H. Jean, Jorge E. Cortes, Hagop M. Kantarjian, Carlo Gambacorti-Passerini, Michele Baccarani, Dong-Wook Kim, Andrey Zaritskey, et al. 2012. « Bosutinib Is Active in Chronic Phase Chronic Myeloid Leukemia after Imatinib and Dasatinib and/or Nilotinib Therapy Failure ». *Blood* 119 (15): 3403-12. https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-390120.

Kim, Soo-Hyun, Dongho Kim, Dong-Wook Kim, Hyun-Gyung Goh, Se-Eun Jang, Jeong Lee, Wan-Seok Kim, Il-Young Kweon, et Sa-Hee Park. 2009. « Analysis of Bcr-Abl Kinase Domain Mutations in Korean Chronic Myeloid Leukaemia Patients: Poor Clinical Outcome of P-Loop and T315I Mutation Is Disease Phase Dependent ». *Hematological Oncology* 27 (4): 190-97. https://doi.org/10.1002/hon.894.

Knutsen, Turid. 2011. "The Philadelphia Chromosome: Celebration of the 50th Anniversary of Its Discovery." *Journal of the Association of Genetic Technologists* 37(1): 5–10.

Konopka, James B., Susan M. Watanabe, and Owen N. Witte. 1984. "An Alteration of the Human C-Abl Protein in K562 Leukemia Cells Unmasks Associated Tyrosine Kinase Activity." *Cell* 37(3): 1035–42.

Lam, Clara J.K. et al. 2020. "Using the SEER-Medicare Data to Assess Incident Chronic Myeloid Leukemia and Bladder Cancer Cases Missed by Cancer Registries." *Journal of the National Cancer Institute - Monographs* 2020(55): 31–38.

Landbouw, Centrale. 1988. "THE GENETIC BASIS OF CHRONIC MYELOGENOUS AND ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA."

Laneuville, Pierre. 1995. "Abl Tyrosine Protein Kinase." *Seminars in Immunology* 7(4): 255–66.

La Rosée, Paul, et Michael W. Deininger. 2010. « Resistance to Imatinib: Mutations and Beyond ». *Seminars in Hematology*, Chronic Myeloid Leukemia in the Imatinib Era, 47 (4): 335-43. https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2010.06.005.

Lee, Stephanie J. 2000. « Chronic myelogenous leukaemia ». *British Journal of Haematology*, n° 111: 993-1009.

Lavoie, Josée N. et al. 1996. "Cyclin D1 Expression Is Regulated Positively by the

P42/P44(MAPK) and Negatively by the P38/HOG(MAPK) Pathway." *Journal of Biological Chemistry* 271(34): 20608–16.

Lee, Stephanie J. 2000. "Chronic Myelogenous Leukaemia." *British Journal of Haematology* (111): 993–1009.

Lucas, Claire M., Robert J. Harris, Athina Giannoudis, Andrea Davies, Katy Knight, Sarah J. Watmough, Lihui Wang, et Richard E. Clark. 2009. « Chronic myeloid leukemia patients with the e13a2 BCR-ABL fusion transcript have inferior responses to imatinib compared to patients with the e14a2 transcript ». *Haematologica* 94 (10): 1362-67. https://doi.org/10.3324/haematol.2009.009134.

Van Maele-Fabry, Geneviève, Sophie Duhayon, and Dominique Lison. 2007. "A Systematic Review of Myeloid Leukemias and Occupational Pesticide Exposure." *Cancer Causes and Control* 18(5): 457–78.

Van Maele-Fabry, Geneviève, Sophie Duhayon, Claire Mertens, and Dominique Lison. 2008. "Risk of Leukaemia among Pesticide Manufacturing Workers: A Review and Meta-Analysis of Cohort Studies." *Environmental Research* 106(1): 121–37.

Mahon, François Xavier et al. 2018. "Treatment-Free Remission after Second-Line Nilotinib Treatment in Patients with Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase Results from a Single-Group, Phase 2, Open-Label Study." *Annals of Internal Medicine* 168(7): 461–70.

Manivannan, P., and H. Subramanian. 2019. "Diagnosis of Myeloproliferative Neoplasms: Current Perspectives from Recent Research." *Hematopathology*: 211–30.

Masic, Izet. 2019. "The Most Influential Scientists in the Development of Public Health (2): Rudolf Ludwig Virchow (1821-1902)." *Materia Socio Medica* 31(2): 151.

Maynadié, Marc. 2017. "Révision de La Classification Des Syndromes Myéloprolifératifs Selon l ' OMS En 2016." *Revue Francophone des Laboratoires* (492): 25–28.

Mazumdar, Claire et al. 2015. "Leukemia-Associated Cohesin Mutants Dominantly Enforce Stem Cell Programs and Impair Human Hematopoietic Progenitor Differentiation." *Cell Stem Cell* 17(6): 675–88.

McCord, Rachel Patton, and Adayabalam Balajee. 2018. "3D Genome Organization Influences the Chromosome Translocation Pattern." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1044: 113–33.

Meral Günes, Adalet et al. 2021. "Features and Outcome of Chronic Myeloid Leukemia at Very Young Age: Data from the International Pediatric Chronic Myeloid Leukemia Registry."

Pediatric Blood and Cancer 68(1): 1–8.

Miller, Kimberly D. et al. 2020. “Cancer Statistics for Adolescents and Young Adults, 2020.” *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 70(6): 443–59.

Mittal, Sahil, Randy Mifflin, and Don W. Powell. 2009. “Cancer Stem Cells: The Other Face of Janus.” *American Journal of the Medical Sciences* 338(2): 107–12. http://dx.doi.org/10.1097/MAJ.0b013e3181ad5865.

Modugno, Michele. 2014. “New Resistance Mechanisms for Small Molecule Kinase Inhibitors of Abl Kinase.” *Drug Discovery Today: Technologies* 11(1): 5–10. http://dx.doi.org/10.1016/j.ddtec.2013.12.001.

Mundt, Kenneth A. et al. 2017. “Does Occupational Exposure to Formaldehyde Cause Hematotoxicity and Leukemia-Specific Chromosome Changes in Cultured Myeloid Progenitor Cells?” *Critical Reviews in Toxicology* 47(7): 592–602. https://doi.org/10.1080/10408444.2017.1301878.

Musselman, Jessica R.B. et al. 2013. “Risk of Adult Acute and Chronic Myeloid Leukemia with Cigarette Smoking and Cessation.” *Cancer Epidemiology* 37(4): 410–16. http://dx.doi.org/10.1016/j.canep.2013.03.012.

Nachi, Mourad, Ibtissem Kihel, Badra Entasoltane, Mohamed Brahimi, Nabil Yafour, Djaoued Guella, Amine Abed, et Mohamed A Bekadja. 2020a. « Impact of the major BCR-ABL1 transcript type on clinical and biological parameters and molecular response in patients with chronic myeloid leukemia ». *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy* 1658 (3876): 8-12. https://doi.org/10.1016/j.hemonc.2020.08.003.

———. 2020b. « Impact of the Major BCR-ABL1 Transcript Type on Clinical and Biological Parameters and Molecular Response in Patients with Chronic Myeloid Leukemia ». *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy*, septembre. https://doi.org/10.1016/j.hemonc.2020.08.003.

Nachi, Mourad et al. 2020. “Impact of the Major BCR-ABL1 Transcript Type on Clinical and Biological Parameters and Molecular Response in Patients with Chronic Myeloid Leukemia.” *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy* 1658(3876): 8–12. https://doi.org/10.1016/j.hemonc.2020.08.003.

Namayandeh, Seyedeh Mahdieh et al. 2020. “GLOBAL Leukemia in Children 0-14 Statistics 2018, Incidence and Mortality and Human Development Index (HDI): GLOBOCAN Sources and Methods.” *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 21(5): 1487–94.

Neul, Claudia et al. 2016. “Impact of Membrane Drug Transporters on Resistance to Small-Molecule Tyrosine Kinase Inhibitors.” *Trends in Pharmacological Sciences* xx. http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2016.08.003.

Nowell, Peter C. 2007. “Discovery of the Philadelphia Chromosome: A Personal Perspective.” *Journal of Clinical Investigation* 117(8): 2033–35.

O’Dwyer, Michael E. et al. 2002. “The Impact of Clonal Evolution on Response to Imatinib Mesylate (STI571) in Accelerated Phase CML.” *Blood* 100(5): 1628–33.

Pages, G. et al. 1993. “Mitogen-Activated Protein Kinases P42(Mapk) and P44(Mapk) Are Required for Fibroblast Proliferation.” *Cell Biology* 90(18): 8319–23.

Pallera, Arnel et al. 2016. “NCCN Guidelines® Insights: Chronic Myeloid Leukemia, Version 1.2017: Featured Updates to the NCCN Guidelines.” *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network* 14(12): 1505–12.

Pagnano, Katia Borgia Barbosa, Eliana Cristina Miranda, Márcia Torresan Delamain, Gislaine Oliveira Duarte, Erich Vinicius de Paula, Irene Lorand-Metze, et Carmino Antonio de Souza. 2017. « Influence of BCR-ABL Transcript Type on Outcome in Patients With Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia Treated With Imatinib ». *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* 17 (11): 728-33. https://doi.org/10.1016/j.clml.2017.06.009.

Pendergast, Ann Marie et al. 1993. “BCR-ABL-Induced Oncogenesis Is Mediated by Direct Interaction with the SH2 Domain of the GRB-2 Adaptor Protein.” *Cell* 75(1): 175–85.

Pierre Aubry, Bernard-Alex Gaüzère. 2018. “Diagnostic d ’ Une Splénomégalie Sous Les Tropiques.” *Médecine Tropicale*: 1–4.

Preudhomme, Claude et al. 2010. “Imatinib plus Peginterferon Alfa-2a in Chronic Myeloid Leukemia.” *New England Journal of Medicine* 363(26): 2511–21.

Owojuyigbe, Temilola O., Muheez A. Durosinmi, Ramoni A. A. Bolarinwa, Lateef Salawu, Norah O. Akinola, Abdulwaheed A. Ademosun, et Oluwayomi T. Bosede. 2020. « Distribution of BCR-ABL1 Transcript Variants in Nigerians with Chronic Myeloid Leukemia ». *Indian Journal of Hematology & Blood Transfusion: An Official Journal of Indian Society of Hematology and Blood Transfusion* 36 (4): 646-51. https://doi.org/10.1007/s12288-020-01264-1.

Raitano, Arthur B., Jocelyn R. Halpern, Tina M. Hambuch, and Charles L. Sawyers. 1995. “The Bcr-Abl Leukemia Oncogene Activates Jun Kinase and Requires Jun for Transformation.”

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92(25): 11746–50.

Rea, D. et al. 2012. "First-Line Imatinib Mesylate in Patients with Newly Diagnosed Accelerated Phase-Chronic Myeloid Leukemia." *Leukemia* 26(10): 2254–59.

Registry, Rabat Cancer. 2020. "International Agency for Research on Cancer, Globocan 2018: Morocco." *World Health Organization* 136: 19–20.

Robert, Jacques. 2011. "Les Inhibiteurs de Tyrosine Kinase Tyrosine Kinase Inhibitors." *Bulletin du Cancer* 98(11): 1321–34. http://dx.doi.org/10.1684/bdc.2011.1472.

Sadakane, Atsuko et al. 2019. "Radiation and Risk of Liver, Biliary Tract, and Pancreatic Cancers among Atomic Bomb Survivors in Hiroshima and Nagasaki: 1958-2009." *Radiation research* 192(3): 299–310.

Sharma, Pratibha, Lalit Kumar, Sujata Mohanty, et Vinod Kochupillai. 2010. « Response to Imatinib Mesylate in Chronic Myeloid Leukemia Patients with Variant BCR-ABL Fusion Transcripts ». *Annals of Hematology* 89 (3): 241-47. https://doi.org/10.1007/s00277-009-0822-7.

SEC. 1973. "A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia Identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining." *Nature* 243(290): 109–16.

Simonsson, Bengt et al. 2011. "Combination of Pegylated IFN-A2b with Imatinib Increases Molecular Response Rates in Patients with Low- or Intermediate-Risk Chronic Myeloid Leukemia." *Blood* 118(12): 3228–35.

Sorel, Nathalie, Émilie Cayssials, Françoise Brizard, and Jean Claude Chomel. 2017. "Actualisation Des Traitements et Du Suivi Moléculaire Dans La Prise En Charge de La Leucémie Myéloïde Chronique." *Annales de Biologie Clinique* 75(2): 129–45.

Soverini, Simona et al. 2011. "BCR-ABL Kinase Domain Mutation Analysis in Chronic Myeloid Leukemia Patients Treated with Tyrosine Kinase Inhibitors: Recommendations from an Expert Panel on Behalf of European LeukemiaNet." *Blood* 118(5): 1208–15.

Soverini, Simona, Sabrina Colarossi, Alessandra Gnani, Fausto Castagnetti, Gianantonio Rosti, Costanza Bosi, Stefania Paolini, et al. 2007. « Resistance to Dasatinib in Philadelphia-Positive Leukemia Patients and the Presence or the Selection of Mutations at Residues 315 and 317 in the BCR-ABL Kinase Domain ». *Haematologica* 92 (3): 401-4. https://doi.org/10.3324/haematol.10822.

Steelman, L. S. et al. 2004. "JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in Cell Cycle Progression and Leukemogenesis." *Leukemia* 18(2): 189–218.

Stucchi, Giulia, Natale Battevi, Silvia Cairoli, and Dario Consonni. 2000. “The Hallmarks of Cancer.” *La Medicina del lavoro* 100(4): 57–70.

Talpaz, M. et al. 2013. “Re-Emergence of Interferon-α in the Treatment of Chronic Myeloid Leukemia.” *Leukemia* 27(4): 803–12.

Tefferi, Ayalew. 2021. “Primary Myelofibrosis: 2021 Update on Diagnosis, Risk-Stratification and Management.” *American Journal of Hematology* 96(1): 145–62.

Thomas, Kali S. et al. 2020. “Home Health Use Following a Cancer Diagnosis among Patients Enrolled in Medicare Advantage and Traditional Medicare: Findings from the Newly Linked SEER-Medicare and Home Health OASIS Data.” *Journal of the National Cancer Institute - Monographs* 2020(55): 53–59.

Tong, Yong-qing et al. 2018. “New Rapid Method to Detect BCR-ABL Fusion Genes with Multiplex RT-QPCR in One-Tube at a Time.” *Leukemia Research* 69(January): 47–53. https://doi.org/10.1016/j.leukres.2018.04.001.

Weerkamp, F. et al. 2009. “Flow Cytometric Immunobead Assay for the Detection of BCR-ABL Fusion Proteins in Leukemia Patients.” *Leukemia* 23(6): 1106–17.

Williams, Loretta A et al. 2013. “Measuring the Symptom Burden Associated with the Treatment of Chronic Myeloid Leukemia Measuring the Symptom Burden Associated with the Treatment of Chronic Myeloid Leukemia.” *Blood journal Journal* 122(5): 641–47.

Wong, Stephane, and Owen N Witte. 2004. “THE BCR-ABL STORY: Bench to Bedside and Back. IDENTIFICATION OF THE CHROMOSOMAL ABNORMALITY AND CELLULAR ORIGIN OF THE HUMAN DISEASE CHRONIC MYELOGENOUS LEUKEMIA (CML).” *Annual review of Immunology* 22(4): 247–306.

White, Deborah, Verity Saunders, A. Bruce Lyons, Susan Branford, Andrew Grigg, L. Bik To, et Timothy Hughes. 2005. « In Vitro Sensitivity to Imatinib-Induced Inhibition of ABL Kinase Activity Is Predictive of Molecular Response in Patients with de Novo CML ». *Blood* 106 (7): 2520-26. https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1103.

Williams, Loretta A, Araceli G Garcia Gonzalez, Patricia Ault, Tito R Mendoza, Mary L Sailors, Janet L Williams, Furong Huang, et al. 2013. « Measuring the symptom burden associated with the treatment of chronic myeloid leukemia Measuring the symptom burden associated with the treatment of chronic myeloid leukemia ». *Blood journal Journal* 122 (5): 641-47. https://doi.org/10.1182/blood-2013-01-477687.

Yaghmaie, Marjan, Seyed H. Ghaffari, Ardashir Ghavamzadeh, Kamran Alimoghaddam, Mohammad Jahani, Seyed-Asadollah Mousavi, Masoud Irvani, Babak Bahar, et Isa Bibordi. 2008. « Frequency of BCR-ABL Fusion Transcripts in Iranian Patients with Chronic Myeloid Leukemia ». *Archives of Iranian Medicine* 11 (3): 247-51. https://doi.org/08113/AIM.003.Yun, Xinming, Wenbing Rao, Ciying Xiao, and Qingchun Huang. 2017. "Apoptosis of Leukemia K562 and Molt-4 Cells Induced by Emamectin Benzoate Involving Mitochondrial Membrane Potential Loss and Intracellular Ca2+ Modulation." *Environmental Toxicology and Pharmacology* 52(January): 280–87.

Zhang, Ji et al. 2019. "Differential Expression Profiles and Functional Analysis of Plasma MiRNAs Associated with Chronic Myeloid Leukemia Phases." *Future Oncology* 15(7): 763–76.

Zitvogel, Laurence et al. 2016. "Immunological Off-Target Effects of Imatinib." *Nature Reviews Clinical Oncology* 13(7): 431–46. http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.41.