

UNIVERSITE DES SCIENCES, DES TECHNIQUES ET DES TECHNOLOGIES
DE BAMAKO (USTTB)



U.S.T.T.B

Faculté de Médecine et
d'Odontostomatologie



ANNEE UNIVERSITAIRE 20 - 20

N°.....

THESE

**Exploration Cytogénétique de la Leucémie Myéloïde Chronique par
la Technique FISH Au MALI**

Présentée et soutenue publiquement le.../... /2020 Devant la Faculté de Médecine et
d'Odontostomatologie (FMOS)

Par

M. SIDIBE Cheick Oumar

Pour obtenir le grade de Docteur en Médecine
(Diplôme d'Etat)

JURY

Président : Pr. Sekou Fantamady TRAORE

Membre : Dr. Moussa BATHILY

Directeur : Pr. Mahamadou TRAORE

Co-Directeur : Dr Oumar SAMASSEKOU

Dédicace :

Je dédie ce travail

A ma mère Sadio DIALLO

Chère mère, c'est dans les larmes que je me mets devant mon ordinateur pour taper ces quelques mots en guise de reconnaissance pour l'affection, la tendresse et l'amour dont vous nous avez toujours entourés, pour le sacrifice et le dévouement dont vous avez toujours fait preuve, pour l'encouragement sans limite que vous ne cessez de manifester, pour ces nombreuses bénédictions que vous ne cessez de prodiguer. Aucun mot ne peut exprimer nos sentiments profonds d'amour, de respect et de reconnaissance. Merci pour votre amour, votre présence, vos conseils et votre soutien infaillible. Ce travail est le vôtre, nous vous le dédions avec tout notre amour.

Puisse ALLAH vous bénir de sa grâce infinie et de sa miséricorde, nous aider à conserver les valeurs que vous nous avez inculquées, nous permettre d'être ensemble longtemps dans la santé afin que vous puissiez profiter des fruits de votre labeur.

A mon père feu Idrissa Sory SIDIBE

Ce n'est pas sans émotion que nous évoquons ici votre mémoire. Vous avez fait votre première hospitalisation quand nous faisons le numerus clausus et vous êtes parti quand nous avons validé la thérapeutique. L'épreuve a été dure pour ne pas dire insupportable, au point que nous nous demandons des fois à quoi nous ont servi toutes ces années études.

Nous sommes au regret que vous ne soyez pas là aujourd'hui pour savourer ce travail qui est le fruit de votre bénédiction, de votre éducation, et vos conseils bien prodigués.

De votre vivant vous étiez très décidés à œuvrer pour notre réussite et vous nous avez toujours mis dans les conditions les meilleurs possibles pour y parvenir mais vous voilà absent ce jour tant souhaité.

Vous avez su créer en nous l'amour du travail bien fait, et vous nous avez aussi appris que le courage et la persévérance sont la clé du succès tout en nous éduquant avec rigueur mais aussi avec amour.

Nous pleurons toujours dans le cœur au fond duquel l'oubli ne saurait avoir place.

Nous ne pouvons jamais tout dire mais sachez que nous resterons sur le droit chemin que vous nous avez enseigné jusqu'à notre dernier souffle (S'IL PLAÎT A DIEU)

Reposez en paix cher père et nous implorons le tout puissant à chaque instant du reste de notre existence que le paradis soit votre dernière demeure. **AMEEN**.

A mes frères et sœurs : Youssouf, Doussou (Batoma) Amsetou (Mami), Sory (Nfa) Ousmane (Ladji) et Amsetou (Haoussa)

Toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut... Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance que nous portons à votre égard.

C'est vrai que l'être humain suit son destin, mais sans vous ce travail ne serait sans doute pas acquis au jour d'aujourd'hui. Vous avez été là à chaque moment de ma vie pour nous guider et nous soutenir dans le droit, diligenter les moments les plus difficiles.

Trouvez ici l'expression de nos sentiments fraternels, recevez ainsi toute notre gratitude. Qu'Allah vous comble de sa grâce et de sa miséricorde.

Remerciement

A ALLAH Subhana wa ta'ala Le Tout Miséricordieux, Le Très Miséricordieux de qui par sa grâce, sa miséricorde, sa clémence et sa bonté nous a permis d'être là où nous sommes.

Louange à LUI, bénédiction et salut sur son bien aimé **Muhammad**, sur sa famille, sur ses compagnons ainsi que tous ceux qui L'auront suivi jusqu'au dernier jour.

A mes mères Ba Assan Djiré, Gabdo Traoré et Djidi Tamboura et leurs familles respectives

Vous m'avez toujours soutenu à toutes les étapes de ma vie surtout dans les moments les plus difficiles. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de longévité.

A mes tontons Deby Sory Sidibé et Amadou Sory Sidibé et leurs familles respectives

Ce travail est aussi le vôtre, chers tontons, je vous remercie pour vos bénédictions vos soutiens et encouragement, je ne saurais quels mots utiliser pour exprimer ma satisfaction à votre égard. Vous avez comblé le vide laissé par votre grand frère.

Qu'Allah vous garde longtemps parmi nous dans la santé et dans la satisfaction.

A ma tante Aissata Sidibé et à son mari Abdine Guindo

Vous m'avez accepté chez vous du début de mon cursus universitaire jusqu'aujourd'hui et vous m'avez toujours traité au même pied d'égalité que vos propres enfants. Soyez en remercier. L'aboutissement de ce travail est aussi le fruit de vos efforts.

A mes Beau Frères Daouda Diarra et Bekaye Haidara

Je vous remercie pour tous les soutiens que vous nous avez apportés. Tant dans la joie que dans la tristesse vous avez été là pour nous. Recevez ici toute notre gratitude et notre reconnaissance

A mes nièces et neveux

Sadio Haidara, Adam Haidara, Kadidia Haidara, et Ousmane Diarra, je vous aime tous. Des fois, rien qu'en pensant à vous, je souris.

A mes amis d'enfance Souleymane Karembé et Bakary O Diarra

Notre amitié était en fait une fraternité avec la devise « toujours ensemble, pour tous, et partout ». Ce travail vous appartient, veuillez recevoir, chers grands frères, toute ma gratitude.

A mes amis et compagnons de tous les jours Jean Kassogué, Boubacar Santara et Bourama A Kamia

Chers frères, je ne saurais utiliser les mots les plus adaptés pour vous remercier. De ce fait, juste un mot, Qu'ALLAH nous guide vers le droit chemin. Merci pour tout le soutien.

A mes amis

Bakary Diarra, Dramane Sagara, Aba Touré, Soumaila Niangaly, Yousouf Sangaré, Bougadary traoré, Djibril Djankoumba, Mama Samssekou, Nouhoum Samassekou, Amadou Sarampo, Aly Alhassane Traoré, Aboubacar Sagara, Ahmed Mohamed Konaté, Salif Thiam, Damou Diakité, Mohamed Tapily, Abdrahamane Guindo, Cheick Oumar Sangaré, Moctar Traoré, Mahamane Traoré, Mahamane B Traoré, Aly Kourounté

Ce travail vous appartient. Veuillez recevoir toute ma reconnaissance.

A toute l'équipe de Neurogénétique : Pr Guinto Cheick Oumar, Pr Mahamadou Traore, Pr Souleymane Coulibaly, Dr Sango Hammadoun A, Dr Guida Landouré, Dr Samassékou Oumar, Dr Seybou H Diallo, Dr Coulibaly Thomas, Dr Coulibaly Souleymane dit Papa, Dr Diallo Salimata, Dr Cissé Lassana, Dr Diarra Salimata, Dr. Taméga Abdoulaye, Dr. Yalcouyé Abdoulaye, Dr. Bocoum Abdoulaye, Dr. Dembéle Mohamed Emile, Dr. Fousseyni Kané , Dr. Oumou Traoré, Dr Adama Témé, Dr Alex joel, Kadidiatou Diallo, Issouf Ballo, Soumaila Niaré, Modibo Goita, Amoro Traoré, Ousmane Doumbia, Demba Samaké, Christine Ongoiba, Salia Bamba,

A vos cotés, j'ai compris que tout seul je vais vite mais ensemble on va loin. Vous avez cultivé en moi l'esprit d'équipe et le sens de la collaboration. Ces années passées à vos cotés ont été riches en enseignement. Je vous remercie infiniment.

Au personnel du Service de Neurologie du CHU du Point G

Pr. Cheick Oumar Guinto : Cher maitre nous avons été fasciné par votre sens élevé de la pédagogie mêlé à l'humour pour rendre plus digeste ce que vous transmettez. Nous gardons de vous l'image d'un Maître soucieux d'assurer une formation de qualité à ses élèves. Votre savoir-faire, votre sens critique, votre amour du travail bien accompli font de vous un grand homme de science. Nous sommes très heureux de pouvoir être compté parmi vos disciples. Nous prions Dieu pour qu'il vous garde parmi nous pendant longtemps et dans la santé.

Dr Guida Landouré : Séduit par vos qualités d'homme de science, votre raisonnement, et votre clairvoyance, vous avez dès lors suscité notre admiration et le désir d'être compté parmi vos élèves. Avec le temps nous découvrîmes un Maître plein d'humanisme, d'humilité, de spiritualité, et d'une simplicité exemplaire. Nous avons appris à vos côtés ce qu'est la rigueur scientifique, la détermination dans le travail, le patriotisme, l'essence de la justice, de la droiture, de l'esprit d'équipe etc. Veuillez trouver ici le témoignage de notre reconnaissance et de notre profond attachement. Qu'ALLAH vous donne une longue vie plein de bonheur, de santé et de succès.

Dr Coulibaly Thomas : Cher Maître nous nous souvenons encore de ses moments où vous nous dispensiez vos leçons avec beaucoup de pragmatisme et d'humour lors des visites matinales des patients. L'étendue de vos connaissances et la façon dont vous le transmettez ont sans doute suscité notre admiration. Merci d'avoir été là à chaque fois que nous en avons eu besoin. Trouvez ici l'expression de notre profonde admiration.

Aux docteurs et anciens collègues internes du Service de Neurologie du CHU du Point G : Dr. Karambé Mamadou, Dr. Sissoko Adama, Dr. Coulibaly Thomas, Dr. Cissé Lassana, Dr. Coulibaly Toumany, Dr. Bagayoko Hamidou, Dr. Dicko Ousmane, Dr. Sacko Mahamadou, Dr. Alex Joël, Dr. César Donald, Dr. Samir Hassana, Dr. Mohmath Josias, Dr. Cissé Aba, Dr. Dagnon Fatoumata, Mody Dramé

Nous saisissons l'occasion pour remercier Dieu de nous avoir permis de nous rencontrer et d'avoir toujours été là les uns pour les autres. A vous tous, nous souhaitons un avenir plein de joie, de bonheur et de succès tout en vous témoignant notre profonde gratitude

A tout le personnel du Service de Neurologie du CHU du Point G : infirmiers, aides-soignants et techniciens de surface.

A tout le personnel de l'Institut National de recherche en Santé Publique : Spécialement Pr Traoré, Dr Haidara, Oumou Ndiaye, Desiré Dembélé de l'unité de cytogénétique et de biologie de la reproduction

Pr Sacko, Mr Dolo, Mr Hassane, et les autres personnels de l'unité de parasitologie

Merci d'avoir fait de cet environnement de travail commun une famille où l'on se sent comme chez soi

A tous les membres de l'Association Malienne de Déficience Mentale (AMALDEM)

A tous les membres du Réseau des Etudiants en Médecine de l'Afrique de l'Ouest (REMAO)

A l'Association des Etudiants Ressortissants de la Régions de Mopti et Sympathisant (AERMOS)

A l'Association des amis de la culture Peulh FMPOS (Jeunesse Tabital Pulaaku)

A la jeunesse parlementaire de Mopti

A toute la Neuvième Promotion du Numerus Clausus en Médecine

A l'équipe de la présentation scientifique a la FMPOS

Au conseil de jeunes de Mopti (spécialement mes collègues dans le bureau de 2007 à 2012)

A mes collègues dans le Bureau du Parlement des Enfants de Mopti (2005-2007)

A tous mes illustres maîtres de la faculté de Médecine et d'Odontostomatologie : merci pour l'enseignement et le savoir prodigués, sans quoi je ne serai ici

A tous ceux dont les noms n'ont pas été cités mais qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail.

HOMMAGE AUX MEMBRES DU JURY

A notre Maitre et Président du jury

Pr TRAORE Sekou Fantamady

- **PhD en entomologie**
- **Professeur titulaire en entomologie médicale,**
- **Responsable du cours de biologie cellulaire à la FAPH**
- **Co-directeur du MRTC**
- **Directeur du département d'entomologie et des maladies à transmission vectorielle**

Cher maitre, nous avons été émerveillé par la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de présider ce jury. Votre simplicité, votre disponibilité et votre esprit de collaboration nous ont beaucoup marqué. Vos qualités scientifiques incontestables font de vous un des juges idéals pour ce travail. Nous sommes reconnaissants pour l'encadrement reçu, de votre dévouement à la transmission du savoir.

Veillez recevoir cher Maitre, l'expression sincère de notre profond respect et nos remerciements.

A notre Maitre et Juge

Dr BATHILY Moussa

- **Spécialiste en Hématologie**
- **Praticien Hospitalier au CHU Point-G**

Vous nous faites un grand honneur en acceptant de siéger dans ce jury

Nous vous remercions de votre disponibilité et votre esprit de collaboration, qui nous ont beaucoup marqué. Nous profitons de ce passage pour vous remercier pour le support matériel mis à notre disposition pour la réalisation de ce travail.

Vos qualités scientifiques incontestables font de vous un des juges idéals pour ce travail auquel vous avez déjà beaucoup apporté.

Bienvenues seront vos critiques qui ne peuvent que contribuer à améliorer ce modeste travail

Permettez-nous en ce moment solennel de vous exprimer nos sincères remerciements.

A notre Maitre et Co-directeur de Thèse

Dr SAMASSEKOU Oumar

- Spécialiste en génétique génomique (MD, PhD);
- Maitre-Assistant à la FMOS ;
- Membre de la Société Malienne de Génétique Humaine;
- Membre de la Société Africaine de Génétique Humaine;
- Membre du consortium Human Hereditary and Health in Africa (H3Africa).

Cher maître, vous nous avez toujours manifesté un attachement et une sympathie auxquels nous n'avons jamais su répondre en totalité. L'intégrité, l'assiduité, le courage, le sens élevé de la responsabilité, le souci du travail bien fait sont des qualités que vous incarnez et qui ont forcé notre admiration. Vous nous avez inculqué le savoir-faire et le savoir être. Votre simplicité, votre modestie, votre dynamisme, votre générosité envers les patients démunis, votre esprit d'équipe, votre attachement à la recherche scientifique font de vous un modèle à suivre pour nous la jeune génération.

Nous ne pourrons jamais vous remercier assez pour tout ce que vous avez fait pour nous.

Nous avons appris à vos côtés ce que sont la rigueur scientifique et la détermination dans le travail.

Tout au long de votre enseignement nous avons été fascinés par votre sens élevé de la pédagogie mêlé à votre modestie pour rendre plus digeste ce que vous transmettez.

L'amabilité et la spontanéité avec lesquelles vous avez dirigé ce travail nous honorent.

Trouvez ici l'expression de nos remerciements les plus distingués.

A notre Maitre et Directeur de Thèse

Pr TRAORE Mahamadou

- Directeur de recherche à l'INRSP ;
- Chef du département de formation à l'INRSP
- Chef du département de cytogénétique et de biologie de la reproduction
- Professeur de génétique à l'USTTB ;
- Co-investigateur de l'étude sur les pathologies neurologiques héréditaires au Mali ;
- Président de la Société Malienne de Génétique Humaine ;
- Membre du consortium Human Hereditary and Health in Africa (H3Africa);
- Membre de la Société Africaine de Génétique Humaine ;
- Membre de la Société Malienne de Neurosciences.

Dès nos premiers cours de génétique, votre particularité nous a séduit et a, dès lors, suscité en nous le désir d'être compté parmi vos élèves. Grâce à la confiance que vous avez eue en nous, pour nous confier ce travail, notre rêve s'est réalisé. Ceci nous a permis auprès de vous de comprendre la délicatesse du geste et de la parole (Ethique) dans ce métier. En plus de l'enseignement scientifique remarquable reçu, vous avez fixé en nous, à jamais, quatre vertus qui nous paraissent indispensables à une vie socioprofessionnelle active et bien remplie : la persévérance, la conviction dans tout ce que l'on fait, la franchise et par-dessus tout, l'humilité. Tout au long de ce travail nous avons été émus par votre disponibilité, votre modestie, votre sens de responsabilité, votre gentillesse, votre patience, votre rigueur scientifique, vos qualités humaines et pédagogiques qui font de vous un modèle à suivre. A votre côté nous avons été à l'école de la vie et de la science. Vous nous avez enseigné tel qu'un père enseigne ses enfants sans oublier toute la générosité qui va avec.

Cher Maitre, nous sommes fiers d'avoir été un de vos élèves et nous manifesterons le désir de continuer à demeurer auprès de vous pour apprendre la science.

Soyez rassuré, cher Maître de notre entière disponibilité et de notre profonde gratitude.

Qu'Allah vous garde encore longtemps auprès de nous et en bonne santé pour que nous puissions continuer à bénéficier de vos enseignements.

LISTES DES FIGURES

Figure 1: Schéma de l'hématopoïèse avec les différents stades de fabrication des cellules sanguines.	13
Figure 2: Les grandes étapes de la leucémogénèse	14
Figure 3: Présentation du gène ABL	15
Figure 4: Présentation du gène BCR	16
Figure 5: Présentation du gène de fusion BCR-ABL1 dans ses différentes formes	17
Figure 6: Présentation de la protéine BCR-ABL et ses différents domaines	18
Figure 7: Présentation du chromosome Philadelphie sur le Caryotype à la phase chronique de la LCM	24
Figure 8 : Le résultat FISH de la translocation t(9;22):	25
Figure 9: Illustration du principe de FISH.....	36
Figure 10: Représentation graphique des sondes utilisées pour les chromosomes 9 et 22 dans la LMC	42
Figure 11: Représentation de la translocation t(9;22) en métaphase et dans le noyau	43
Figure 12: Répartition des patients en fonction du sexe	50
Figure 13: Répartition des patients selon l'âge.....	51
Figure 14 : Représentation du signal atypique (2R3V1F).....	65
Figure 15: Présentation des noyaux interphasiques du variant complexe du patient(P6)	67
Figure 16: Métaphase montrant les différents signaux observés chez le patient (P2).....	69
Figure 17: Métaphase montrant les différents signale observé chez le patient (P2)	69
Figure 18: Métaphase montrant les différents signale fusion.....	69

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Classification pronostic avec l'indice de Sokal.....	29
Tableau II: Classification pronostic avec l'indice de Hasford	30
Tableau III: Les différents types d'inhibiteur de la tyrosine kinase (ITK)	32
Tableau IV: Définition de la réponse hématologique, cytogénétique et moléculaire	33
Tableau V: Définition des critères de réponses aux ITKs utilisés en première ligne de traitement	34
Tableau VI: Répartition des patients qui sont venus pour le diagnostic selon l'âge...	52
Tableau VII: Répartition des patients en fonction du motif de consultation.....	52
Tableau VIII: Répartition des patients en suivi en fonction des données de la NFS..	53
Tableau IX: Répartition des données de la NFS des patients qui sont venus pour le diagnostic.....	54
Tableau X : Répartitions des patients en fonction de la réussite de la culture cellulaire	55
Tableau XI: Répartition des patients en fonction des résultats du test génétique.....	55
Tableau XII: Répartition des patients en fonctions des variantes cytogénétiques	56
Tableau XIII: Répartition des patients en fonction des résultats cytogénétiques.....	57
Tableau XIV: Répartition des patients qui sont venus pour le diagnostic en fonction des résultats cytogénétiques	58
Tableau XV: Répartition des patients en suivi en fonction des résultats cytogénétiques	58
Tableau XVI: Profil clinico-biologique des patients présentant des signaux atypiques	59
Tableau XVII: Répartition des cas atypiques en fonction de la proportion de différents types cellulaires	60

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

ABL1:	ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc :	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ARNm :	Acide RiboNucléique messenger
ATP:	Adénosine TriPhosphate
BCR:	BCR activator of RhoGEF and GTPase
CS :	Cellule Souche
CSH :	Cellule Souche Hématopoïétique
ELN :	European LeukemiaNet
Fig :	Figure
FISH :	Fluorescence In Situ Hybridation
g :	gramme
g/dl:	gramme par décilitre
g/l :	gramme par litre
g/jr :	gramme par jour
Hb :	Hémoglobine
IM :	Imatinib Mesulat
ITK :	Inhibiteur de la tyrosine Kinase
K :	Potassium
KCl :	Chlorure de potassium
KD :	kiloDalton

LNA :	Locked nucleic Acide
LMC :	Leucémie Myéloïde Chronique
LMMC :	Leucémie MyéloMonocytaire Chronique
Mbcr :	Major breakpoint cluster region
mbcr :	minor breakpoint cluster region
ME:	Milieu Extracellulaire
mg/jr:	milligramme par jour
MI :	Milieu Intracellulaire
mm ³ :	millimètre cube
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PCR :	Polymerase Chain Reaction
Ph:	Philadelphie
PM:	Poids Moléculaire
PNA:	Acide Nucleique Peptidique
Tab :	Tableau
TK:	Tyrosine Kinase
µbcr:	micro breakpoint cluster region

TABLE DES MATIERES

1	INTRODUCTION:.....	7
2	OBJECTIFS :.....	8
2.1	OBJECTIF GENERAL :.....	8
2.2	OBJECTIF SPECIFIQUE :.....	8
3	GÉNÉRALITES :.....	9
3.1	Généralités sur la Leucémie Myéloïde Chronique :.....	9
3.1.1	Définition :.....	9
3.1.2	Epidémiologie :.....	9
3.1.3	Intérêt :.....	10
3.1.4	Rappel :.....	11
3.1.5	Diagnostic :.....	20
3.1.6	Traitement:.....	28
3.2	Généralités sur l'hybridation <i>in situ</i> en fluorescence.....	35
3.2.1	Définition :.....	35
3.2.2	But :.....	35
3.2.3	Principes :.....	35
3.2.4	Sondes utilisées.....	36
3.2.5	Étapes :.....	37
3.2.6	Application :.....	39
3.2.7	Avantages et limites :.....	40
3.2.8	La FISH dans la LMC.....	41
4	METHODOLOGIE :.....	45
4.1	Cadre de l'étude :.....	45
4.2	Type et Période d'étude :.....	45
4.3	Population d'étude :.....	45
4.4	Échantillonnage :.....	45
4.4.1	Critères d'inclusion :.....	45
4.4.2	Critères de non-inclusion :.....	46

4.5	La procédure de collecte des données :.....	46
4.5.1	L'information :.....	46
4.5.2	Enrôlement et consentement :.....	46
4.5.3	L'examen génétique :.....	46
4.5.4	Les variables :.....	49
4.5.5	Recueil et analyses des données.....	49
4.6	Les limites :.....	49
4.7	Aspect éthique :.....	49
5	RESULTATS :.....	50
5.1	Données sociodémographiques :.....	50
5.1.1	Sexe :.....	50
5.1.2	Age :.....	51
5.2	Données cliniques :.....	52
5.2.1	Diagnostic :.....	52
5.2.2	La Numération Formule sanguin (NFS) :.....	53
5.2.3	Résultats génétiques :.....	55
6	COMMENTAIRES ET DISCUSSION :.....	62
7	CONCLUSION :.....	70
8	RECOMMANDATIONS :.....	71
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES :.....	70
	FICHE SIGNALITIQUE :.....	86
	SERMENT D'HIPPOCRATE.....	88

1 INTRODUCTION:

La Leucémie myéloïde chronique est une hémopathie maligne du groupe des syndromes myéloprolifératifs. Elle est principalement caractérisée par une prolifération monoclonale des précurseurs de la lignée granuleuse.

Elle représente 15 % des leucémies avec une médiane d'âge de 55 ans en Europe et 65 ans aux U.S.A. Au Mali, la LMC représente environ 16 % des hémopathies malignes et 42,10 % des leucémies et survient plus entre 40 et 49 ans (1,2).

Pendant longtemps, la principale cause de cette maladie était encore un mystère, jusqu'à la découverte, en 1960 par deux chercheurs américains, d'un petit chromosome 22 qu'ils ont baptisé Chromosome Philadelphie référant à la ville où ils ont fait la découverte (3). Ensuite, il s'est avéré que cela était la conséquence d'une translocation entre le chromosome 9 et le chromosome 22 entraînant la fusion de deux gènes (*BCR et ABLI*), devenu, depuis lors, le principal marqueur de la maladie (3).

Ainsi, le diagnostic de la maladie se fait par la mise en évidence du petit Chromosome 22 ou la présence du gène de fusion *BCR-ABL1*. Le rôle de ce gène de fusion dans la leucémogénèse a longuement été étudié et a permis de mettre en place des thérapies ciblant essentiellement ce gène.

Les thérapies ciblées ont permis d'obtenir des résultats encourageants dans la prise en charge de la LCM, mais elle peut récidiver en cas d'arrêt de traitement ou de résistance thérapeutique. Ainsi, l'évolution de la maladie et le suivie se font par des examens cytogénétiques et de génétique moléculaire, faisant de ces tests génétiques un des outils incontournables dans la prise en charge de la LMC.

Au Mali, malgré les avancées dans la prise en charge de la LMC, le bilan génétique essentiel pour le diagnostic et le suivi thérapeutique fait encore défaut. Le but de la présente étude est de mettre en place (ou instituer) la technique FISH dans le diagnostic et le suivi thérapeutique de la LMC et de déterminer les variants génétiques responsables de la LMC au Mali.

2 OBJECTIFS :

2.1 OBJECTIF GENERAL :

Développer la technique FISH pour le diagnostic et le suivi thérapeutique de la LMC au Mali.

2.2 OBJECTIF SPECIFIQUE :

- Déterminer le diagnostic cytogénétique de la LMC par la technique FISH,
- Évaluer le pronostic cytogénétique des patients atteints de la LMC sous traitement par la technique FISH
- Déterminer le profil cytogénétique du réarrangement du gène de fusion *BCR/ABL1* chez les patients atteints de LMC.

3 GÉNÉRALITES :

3.1 Généralités sur la Leucémie Myéloïde Chronique :

3.1.1 Définition :

Les leucémies (du grec leukos, blanc, et haima, sang) sont des pathologies hématologiques caractérisées par une prolifération anormale de cellules à l'origine des leucocytes (4,5). Les principales entités cliniques de leucémie sont définies en fonction du type de cellule proliférative (leucémies myéloïdes et leucémies lymphoïdes) et de leur évolution clinique (aiguë ou chronique).

La Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) est un syndrome myéloprolifératif associé à la présence du chromosome Philadelphie ou la fusion des gènes *BCR/ABL1* (6). Elle est caractérisée par une prolifération clonale excessive de la lignée myéloïde associée à une réduction de l'apoptose (7).

3.1.2 Epidémiologie :

La LMC représente environ 15% des leucémies chez l'adulte (8). C'est une pathologie rare avec une incidence annuelle d'environ 1,6 cas par 100.000 habitants dans le monde (9). Il y'a une légère prédominance masculine, soit un sex-ratio de 1,6 en faveur des hommes (10). Ces données convergent avec celles des USA et de l'Europe où le taux d'incidence est de 1,5 cas pour 100.000 personnes aux USA, et en Europe il est de 1,23 pour 100 000 chez l'homme et de 0,98 pour 100 000 chez la femme, soit un sexe ratio de 1,25 en faveur des hommes (8,11).

L'âge médian de survenue est de 60 à 65 ans (8,12), donc c'est une pathologie beaucoup plus fréquente chez les adultes. Cependant, toutes les tranches d'âge peuvent être concernées par la maladie et certaines études ont rapporté que les cas pédiatriques représenteraient 2 à 5% (13).

En Afrique, les enquêtes épidémiologiques réalisées dans certains pays sur les hémopathies malignes ont rapporté une fréquence plus élevée notamment en Côte d'Ivoire où le taux d'incidence est 5,09 nouveaux cas par an, soit une prévalence de

0,99% (14), et aussi au Cameroun où la LMC représente 42,10% des leucémies et 13,9% des hémopathies (15). Les données épidémiologiques du Niger reflètent la même réalité où la LMC représente 18,88% des hémopathies malignes 25,37% des leucémies avec une sex-ratio de 1,83 en faveur des hommes (16).

Au Mali, la dernière enquête épidémiologique sur les hémopathies malignes réalisée dans deux services de prise en charge des hémopathies, sur une durée de 8 ans, a retrouvé que la LMC représente 16,67% des hémopathies malignes, 42,3% des leucémies, avec un sexe ratio (femme/homme) de 1,2 contrairement aux autres pays où le sex-ratio est en faveur des hommes. Aussi, la classe d'âge de 40 à 49 ans est la plus représentée au moment du diagnostic (1,2,17), comme dans beaucoup d'autre pays africain

Ces particularités épidémiologiques sont importantes pour la planification d'une stratégie de diagnostic, de traitement et de suivi des patients, mais aussi la recherche d'un possible facteur susceptible de prédisposer à la maladie y compris un facteur génétique.

3.1.3 Intérêt :

3.1.3.1 Epidémiologique :

La LMC est une maladie rare conformément à la définition des maladies rares donné par le groupe RAREcare (<http://www.rarecare.eu>) c'est-à-dire moins de 6 nouveaux cas par an par 100 000 habitants. En Afrique, les données épidémiologiques ne contrastent pas souvent avec celles de l'Europe ou des USA.

3.1.3.2 Clinique :

Le diagnostic, le traitement et le suivi de la LMC se font par des examens génétiques lesquels ne sont pas souvent disponibles dans les pays en voie développement, rendant ainsi la prise en charge difficile et chère.

3.1.3.3 Thérapeutique :

Les thérapies ciblées, notamment les inhibiteurs de la tyrosine kinase (ITKs), ont permis d'obtenir des résultats encourageants dans la prise en charge de la LMC, mais le coût et la disponibilité de ces médicaments posent un problème de traitement de cette pathologie dans les pays à revenu faible.

3.1.3.4 Psychosocial :

La LMC a un important impact psychosocial du fait même de la connotation sociale de la maladie liée à ses caractéristiques intrinsèques : c'est un cancer, c'est une maladie inguérissable, la prise en charge est coûteuse. Ces caractéristiques peuvent entraîner la stigmatisation et causant ainsi la dépression et l'anxiété chez les patients

3.1.4 Rappel :

3.1.4.1 Rappel Historique :

La LMC a été premièrement décrite par Hughes Bennett en 1840, un médecin d'Edinburgh, qui pensait que la maladie était une infection. Lorsqu'il étudiait des patients décédés, ils constata un lien entre les signes cliniques : la splénomégalie, l'hépatomégalie et le sang qu'il qualifie de « suppurant » ou même de « sang blanc » (18). Quelques semaines plus tard, R. Virchow, qui a publié un cas similaire, a postulé que la maladie n'était pas infectieuse et a estimé que la cause de la maladie était une altération dans l'hématopoïèse. Il a inventé le terme descriptif « Weisses blut » ou « sang blanc » qui est devenu en allemand « Leukamie » (18).

En 1846, Fuller a décrit le premier cas de diagnostic chez un patient vivant et le terme de « leucocythaemia » a été proposé en 1848. Neumann, en 1870, affirme que l'origine des cellules responsables de cette pathologie est la moelle osseuse (19).

La prochaine étape importante dans l'histoire de la LMC s'est produite 100 ans plus tard. Au début des années 1960 et avec l'apparition de la cytogénétique, deux chercheurs de Philadelphie : Peter Nowell et David Hungerford ont identifié un chromosome de

petite taille dans les cellules tumorales des patients atteints de LMC. Ils ont donné le nom de la ville d'origine de sa découverte: le chromosome Philadelphie (Ph), et ce fut la première fois qu'une anomalie chromosomique ait été associée à une maladie maligne (20).

Ensuite, en 1973, Janet Rowley a reconnu que le chromosome Philadelphie était en effet le produit d'une translocation réciproque avec échange de matériel chromosomique entre les bras longs des chromosomes 9 et 22 (19).

La présence de la translocation $t(9;22)$ dans presque toutes les cellules de la moelle osseuse des patients atteints de LMC a montré que cette anomalie génétique était impliquée dans l'initiation de la maladie. Grâce à la biologie moléculaire au début des années 1980, on a identifié deux gènes : *BCR* et *ABL1*, qui encadrent le point de fusion de la translocation (21). En 1998, le premier médicament anti tyrosine kinase [imatinib (Glivec)] a été commercialisé et ce dernier va agir précisément au niveau de la protéine BCR-ABL1 (18).

3.1.4.2 Rappel sur l'Hématopoïèse :

L'organisme humain est constitué de milliards de cellules lesquelles s'organisent pour former des tissus qui forment à leur tour des organes et des appareils. Il existe deux principaux types de cellule : les cellules adhérentes et les cellules circulantes.

Les principales cellules circulantes se trouvent dans le sang et assurent ainsi les fonctions physiologiques reliées à la circulation sanguine. Ces cellules sont : les érythrocytes, les granulocytes, les monocytes, les lymphocytes et les plaquettes (22,23). La production de toutes ces cellules est assurée par une petite colonie de cellules souches hématopoïétiques (24).

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont les précurseurs de toutes les cellules sanguines. Elles sont localisées dans la moelle osseuse et possèdent deux principales propriétés qui sont : l'autorenouveaulement et la différenciation. L'autorenouveaulement permet aux CSH de se renouveler pour maintenir leurs nombres constants dans la moelle afin d'assurer ainsi le renouvellement continue de toutes les cellules sanguines. La différenciation assure la transformation des CSH en différentes cellules sanguines matures, et ce processus de différenciation des CSH en cellules matures est appelé hématopoïèse (25).

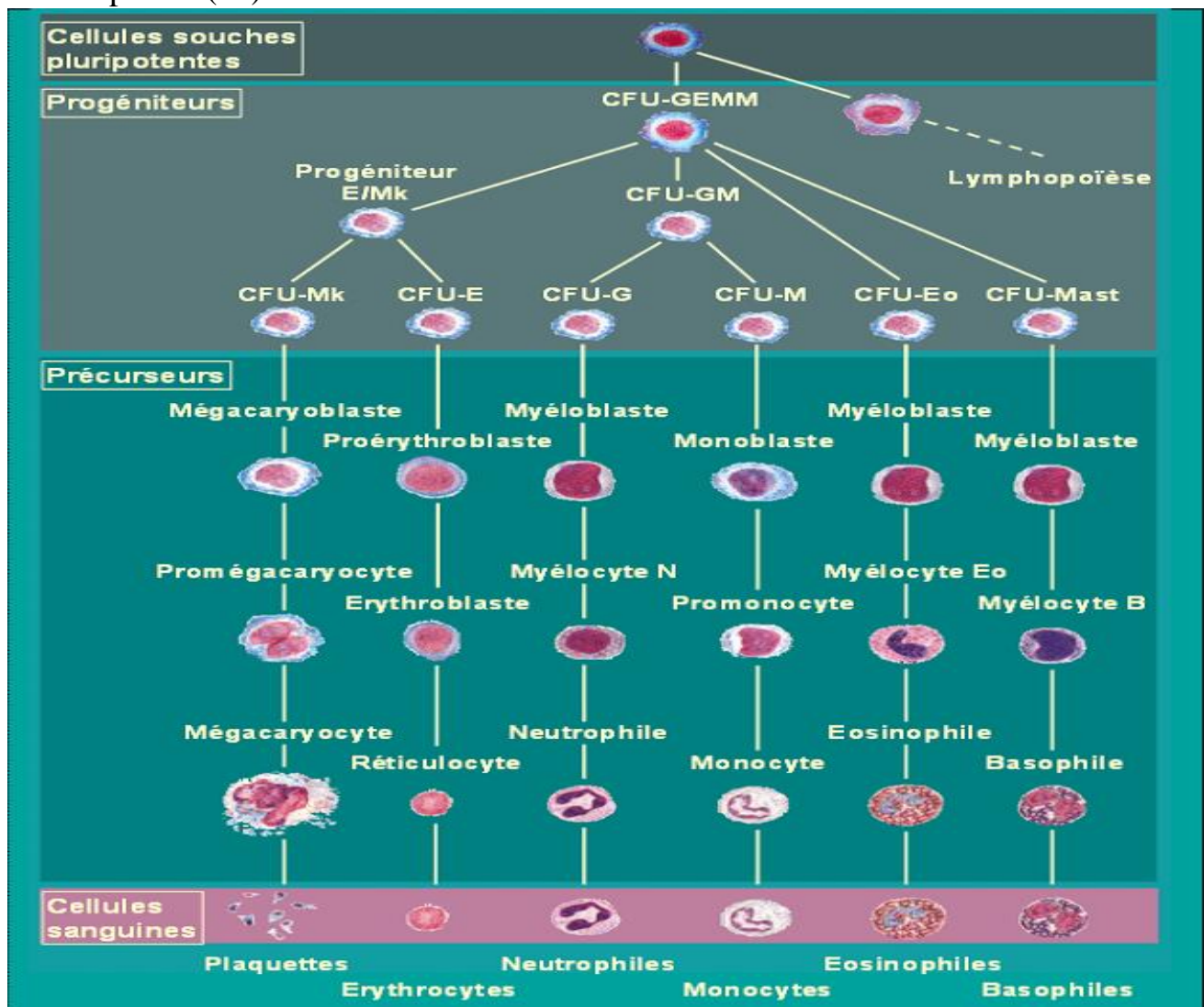


Figure 1: Schéma de l'hématopoïèse avec les différents stades de fabrication des cellules sanguines. (24)

L'hématopoïèse a lieu dans la moelle osseuse où se trouvent les CSH, qualifiées de cellules pluripotentes à cause de leurs potentialités de donner plusieurs types de cellules.

Au cours de l'hématopoïèse, on peut distinguer 4 types de compartiments cellulaires (Figure 1). Le compartiment des cellules souches où les cellules ont la capacité d'autorenouveaulement. A ce compartiment, suit celui des progéniteurs où les cellules ont une capacité de prolifération plus élevée que les cellules souches (CS), et cette capacité de prolifération diminue au cours de la maturation. Le troisième compartiment est celui des précurseurs et est constitué de cellules sanguines jeunes localisées dans la moelle. Le compartiment des cellules matures est constitué de cellules issues des précurseurs qui ont acquis des spécificités leur permettant de remplir des fonctions spécifiques pour chaque type de cellules.

La régulation de l'ensemble du processus hématopoïétique se fait par l'intermédiaire des facteurs de croissance hématopoïétique (CFU) qui agissent de façon ordonnée sur les cellules progénitrices pour stimuler ou stopper le processus de production de cellules (23,26).

3.1.4.3 Rappel Physiopathologique :

La pathogenèse de la LMC peut se résumer de manière simple comme laisse présager la Figure 2.

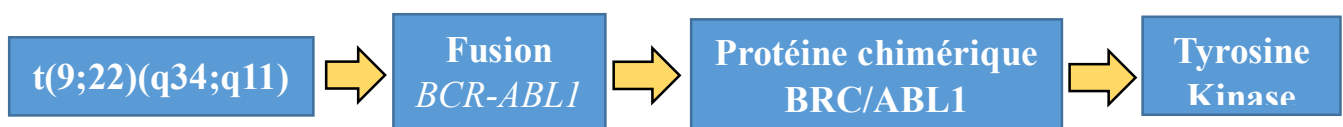


Figure 2: Les grandes étapes de la leucémogénèse

La LMC est une pathologie acquise d'origine génétique caractérisée par une translocation entre les chromosomes 9 et 22 $t(9;22)(q34.12;q11.23)$ et cette translocation aboutit à la formation d'un petit chromosome 22 (chromosome Philadelphie) ou du gène de fusion *BCR-ABL1*. Ce gène est transcrit en un ARNm qui code une protéine chimérique, la protéine BCR-ABL1 ayant une importante activité tyrosine kinase (TK) constitutive qui active différentes voies de signalisation responsables des caractéristiques cytologiques de la maladie : prolifération excessive,

inhibition de l'apoptose, perte de l'Inhibition de contactimmortalité répliative, instabilité génétique.

3.1.4.3.1 Présentation du gène *ABL1* :

Le gène *ABL1* tire son nom du virus d'Abelson de la leucémie murine. Chez l'homme, l'oncogène *ABL* est situé sur le bras long du chromosome 9 (q34), et il est exprimé dans une grande variété de types cellulaires dont les lignées hématopoïétiques, la rate, le thymus, le testicule (27). Ce gène occupe un locus de 230 kb et comporte 12 exons dont 2 alternatives de l'exon 1 (1A et 1B). Il est transcrit en deux ARNm de 6 ou 7 kb selon que l'exon 1A ou 1B soit alternativement transcrit, et code pour une protéine de 145 KD (Figure3)

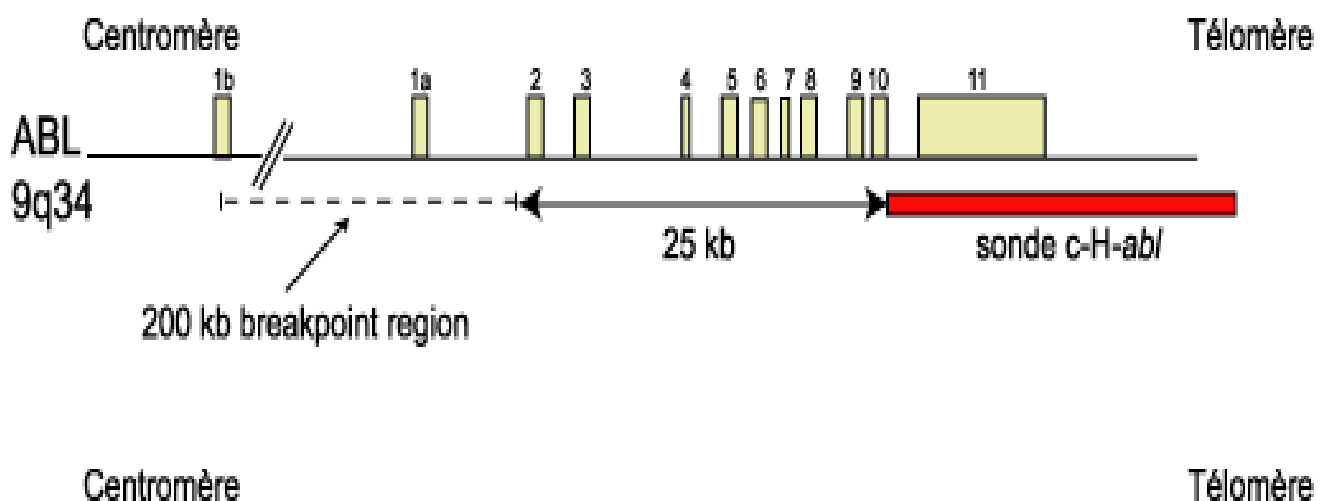


Figure 3: Présentation du gène *ABL* (28).

Le Gène *ABL* et l'emplacement des deux points de cassure possibles : au niveau de l'intron séparant les exons 1A et 1B ou entre les exons 1A et a2

Les cassures chromosomiques sur le gène *ABL1* se font en des points variables de la région 5' du gène mais le plus souvent au niveau de l'intron 1 (27).

3.1.4.3.2 Présentation du gène *BCR* :

Le nom du gène *BCR* provient de la détermination du point de cassure du chromosome 22 dans la LMC, qui intéresse une région très limitée, dénommée « breakpoint cluster

region » (27). Le gène *BCR* occupe un locus de 135kb et comprend 23 exons. Les 5 exons à l'intérieur de la zone de cassure Mbc (major breakpoint cluster region) correspondent aux exons 12 à 16. Ils sont aussi appelés b1, b2, b3, b4 et b5 (28). Il est transcrit en ARNm de 4,5 ou 6,7 kb et code une protéine cytoplasmique de 160 kb d'expression ubiquitaire.

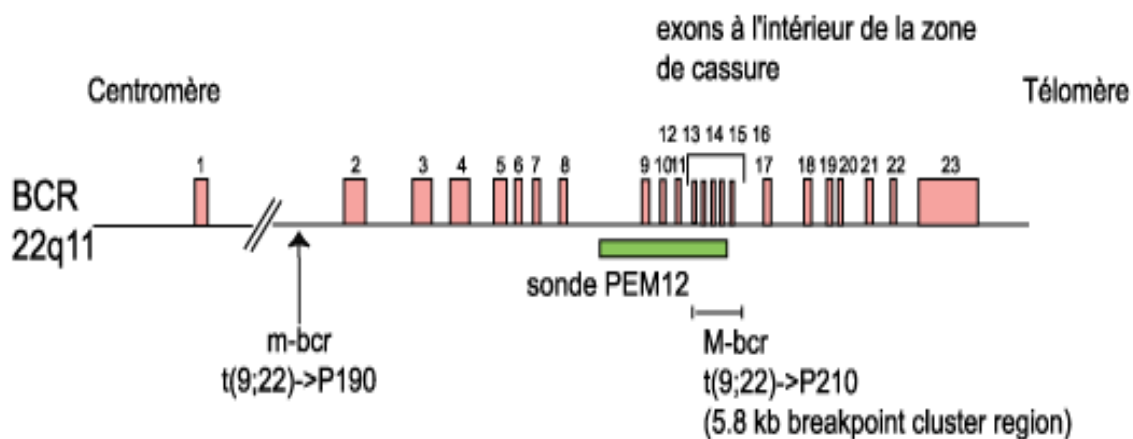


Figure 4: Présentation du gène *BCR* (28)

Gène BCR et les différents points de cassure. Chez la plupart des patients, ils sont localisés en M-bcr

Les cassures chromosomiques de la LMC surviennent presque exclusivement dans la région de 5,8 kb du gène *BCR*, appelée région M-bcr, en dehors des exons, et essentiellement entre les exons 13 et 14 ou 12 et 13. Néanmoins, des cassures sont possibles dans chacune des cinq zones définies dans le M-bcr. La cassure peut également se situer au niveau de l'intron 1, appelé minor breakpoint cluster (m-bcr) ou au niveau de l'exon 19, micro breakpoint cluster (μ bcr) (29).

Ces différents types de réarrangement peuvent entraîner la production de différentes protéines de poids moléculaire différent avec comme conséquence une activité tyrosine Kinase plus ou moins intense (5).

3.1.4.3.3 Présentation du gène de fusion *BCR-ABL* :

La translocation t(9 ;22) entraîne la formation d'un gène de fusion sur le chromosome 22 et ce gène de fusion hybride comporte la partie 5' du gène *BCR* et la partie 3' du gène *ABL1* (30).

Ce gène *BCR-ABL1* hybride est transcrit en ARNm de 8,5 kb lequel est traduit en une protéine hybride p210 (appelée également oncoprotéine P210 ou P210 BCR-ABL) composé de deux variants différents de 25 acides aminés selon que l'exon b3 est incorporé ou non dans le gène hybride (30). En cas de cassure type m-bcr, les exons 2 à 11 disparaissent du chromosome 22, et le transcrit obtenu est plus court (7 kb) (Figure5) (27).

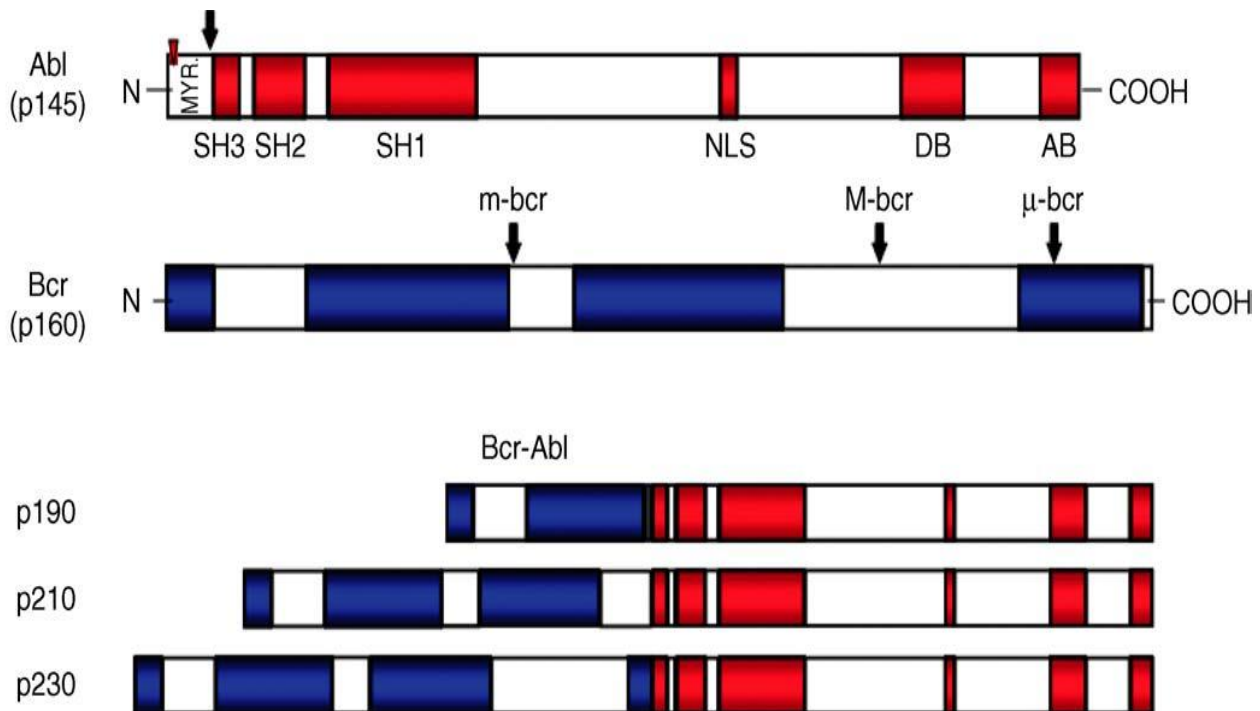


Figure 5: Présentation du gène de fusion *BCR-ABL1* dans ses différentes formes (2). Les différents types de *BCR-ABL1* en fonction des points de cassure. Les différents points de cassure dans le gène *BCR* conduisent à la synthèse de trois variants protéiques différents (5).

3.1.4.3.4 Protéine de fusion ou protéine hybride P210 ou protéine BCR-ABL1 :

La translocation des chromosomes 9 et 22 forme donc un gène anormal, appelé gène *BCR-ABL1*, issu de la fusion des gènes *ABL1* et *BCR*. Ce nouveau gène va coder pour une nouvelle protéine anormale, appelée protéine de fusion BCR-ABL1. Comme nous l'avons déjà mentionné ci-dessus, il peut y avoir différents points de cassure au niveau du gène *BCR* entraînant la formation de 3 types de protéines différentes dépendamment du point de cassure impliqué (31). Lors des recombinaisons, les protéines chimériques BCR-ABL1 issues de Mbcf, mbcf ou μ bcf présentent respectivement un poids moléculaire de 210, 190 ou 230 KD (Figure 6). Ces protéines ne diffèrent entre elles que par leur contenu en domaines de la protéine BCR (32). La protéine BCR-ABL1 qui est présente chez 95% des patients est de p210 (Figure 5) (correspondant aux transcrits a2b2 et a2b3). Cette protéine de fusion p210 BCR-ABL1 hérite donc à la fois des domaines de phosphorylation de la protéine ABL1, mais également des autres domaines que l'on retrouve sur la protéine BCR (27,33,34).

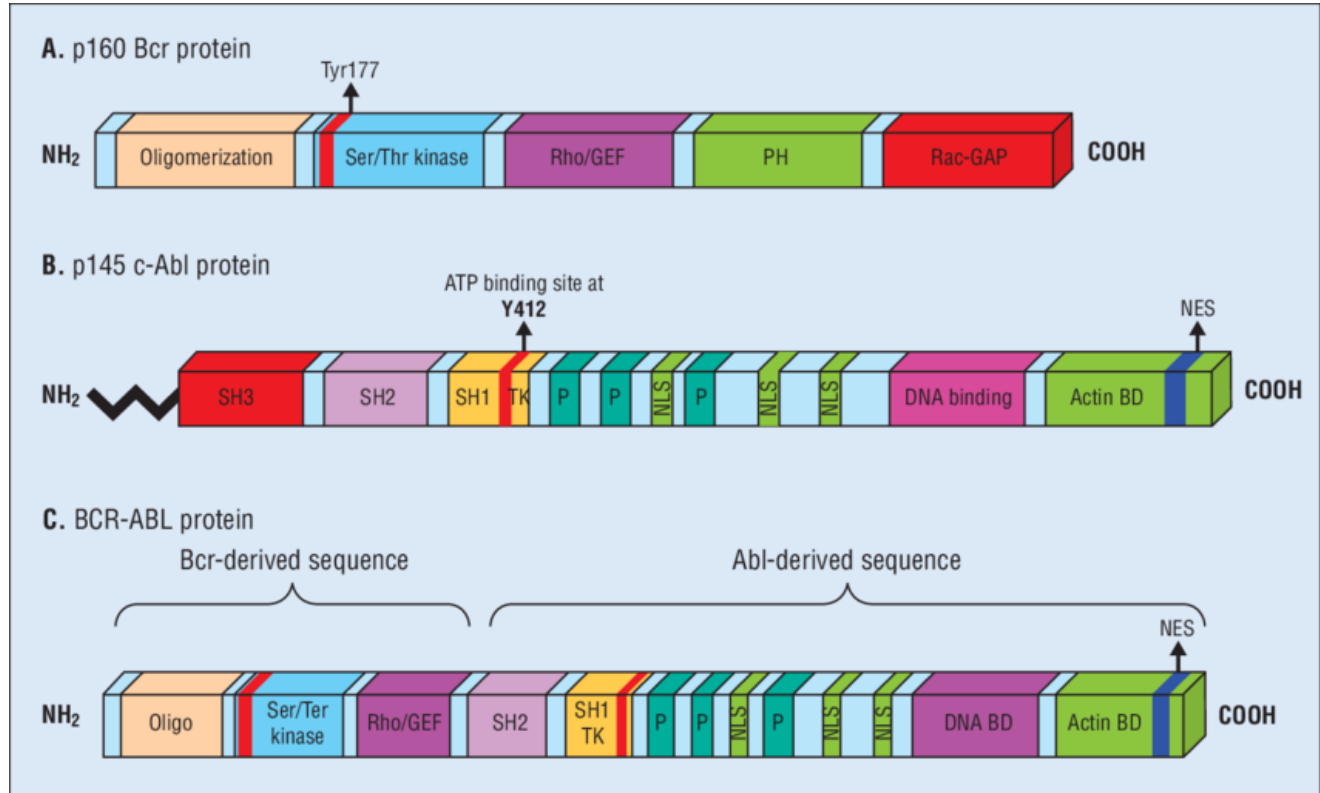


Figure 6: Présentation de la protéine BCR-ABL et ses différents domaines
 La protéine BCR-ABL avec ses domaines issus des gènes BCR et ABL et en fonction du point de cassure (35)

Ainsi dans la partie BCR, on retrouve :

- un domaine d'oligomérisation
- une tyrosine en position 177 qui engage BCR-ABL1 dans la voie de signalisation RAS-MAPK grâce à la protéine Grb2 (13).
- le domaine sérine-thréonine kinase qui sert de site de liaison aux motifs SH2 d'ABL1.

Dans la partie ABL1, on retrouve :

- un domaine d'homologie avec les protéines Src (SH)
- les domaines régulateurs SH2 et SH3
- le domaine tyrosine kinase ou SH1, particulièrement impliqué dans le pouvoir transformant de BCR-ABL1 (36).
- les séquences de localisation nucléaire (NLS)
- des sites de liaison à l'ADN et à l'actine
- des séquences d'exportation nucléaire (NES)

La dérégulation de l'activité tyrosine kinase interfère avec les signaux cellulaires normaux impliqués dans le processus de prolifération, d'adhésion cellulaire, de différenciation et d'apoptose en phosphorylant différents complexes protéiques (27).

Ceci a pour conséquences :

- L'altération des propriétés d'adhésion des cellules tumorales immatures ou progénitrices leucémiques au stroma médullaire
- L'activation de signaux mitotiques induisant une prolifération cellulaire accrue
- Une inhibition de l'apoptose
- La dégradation des protéines Abl1 et Abl2 (Abl-interactor proteins) par le protéasome entraîne une levée de l'inhibition de l'activité tyrosine kinase d'ABL1. On peut citer également la dégradation de protéines participant à la réparation de l'ADN, ce qui peut expliquer en partie l'instabilité génétique des cellules Ph+ conduisant vers la crise blastique (5).

3.1.5 Diagnostic :

3.1.5.1 Diagnostic Positif :

3.1.5.1.1 Circonstance de découverte :

Le début de la maladie est silencieux et difficile à préciser, marqué par une évolution lente. Au début, la symptomatologie n'est pas assez spécifique et, dans environ 50% des cas, la découverte est fortuite à la suite d'un bilan de santé de routine, parfois devant des manifestations cliniques mineures (la fatigue, l'asthénie, les vertiges etc.) et rarement à l'occasion de complications liées au syndrome de leucostase (8).

L'évolution naturelle de la maladie comprend trois phases de gravité croissante : la phase chronique, la phase accélérée et la phase blastique, et chacune d'elles est caractérisée par des aspects cliniques et biologiques bien définis.

3.1.5.1.2 Signes Cliniques :

3.1.5.1.2.1 Phase Chronique :

Cette phase peut parfois passer discrètement, elle dure en moyenne 4 à 5 ans. C'est pendant cette phase que la maladie s'installe de façon insidieuse et environ 90% des diagnostics sont posés à ce stade. Durant cette phase, la maladie est très souvent asymptomatique, les manifestations cliniques lorsqu'elles sont présentes sont classées en trois grands types de syndrome :

- Syndrome anémique, se manifestant par l'asthénie, l'amaigrissement, les sueurs, le vertige, la sensation de satiété parfois fébricule...
- Syndrome tumoral : splénomégalie presque constante (50%) du fait d'une hyperproduction excessive de leucocytes, souvent associée à une hépatomégalie donnant une sensation de pesanteur abdominale ou autres signes digestifs.
- Syndrome de leucostase : marqué très souvent par un priapisme (12,13).

Devant ces signes, sont généralement proposés l'hémogramme et le myélogramme qui indiquent des anomalies permettant d'orienter le diagnostic.

3.1.5.1.2.2 Phase d'accélération (PA) :

Environ 10% des cas de diagnostic sont portés pendant cette phase, elle dure environ un an (sans traitement cette phase ne dépasse pas 6mois) et correspond au passage de la phase chronique vers la phase blastique (38,39). Pendant la PA, la population de leucocyte anormale est très augmentée dans le sang et dans la moelle avec souvent l'apparition de nouvelles anomalies cytogénétiques (40). Elle se caractérise notamment par une résistance progressive à la thérapie (8).

La symptomatologie n'est pas assez spécifique et correspond souvent à une aggravation des signes cliniques et biologiques observés au début de la maladie et accompagnés souvent par d'autres signes. Cette phase évoque une progression de la maladie et constitue ainsi un marqueur de mauvais pronostic.

3.1.5.1.2.3 Phase blastique :

C'est le stade ultime de la maladie, elle ressemble à une leucémie myéloïde aiguë. Cette phase survient après un délai moyen de 4 ans d'évolution de la maladie, et aboutit à la mort du sujet 2 à 6 mois suivant le diagnostic de la crise blastique (10). Le tableau clinique correspond à une majoration des signes de la phase accélérée comme (altération de l'état général, splénomégalie, anémie, thrombopénie, fibrose médullaire) et souvent accompagné des signes d'insuffisance médullaire et des signes du syndrome tumoral (fièvre, hépatomégalie, adénopathies, douleurs osseuses) (39). Elle peut survenir de manière explosive, c'est-à-dire de la phase chronique à la phase aiguë sans passer par la phase accélérée. La définition de cette phase est biologique, et la présence d'anomalies chromosomiques additionnelles est trop fréquente réduisant ainsi la possibilité d'obtenir la phase chronique qui se traduit par la résistance aux différentes thérapies (8,31).

Beaucoup de patients diagnostiqués à cette phase ont des anomalies chromosomiques additionnelles telles que la présence d'un second chromosome Philadelphie, la trisomie 8, ou isochromosome 17, etc plus ou moins impliquées dans le processus de résistance aux traitements par les inhibiteurs de la tyrosine kinase

3.1.5.1.3 Signes biologiques :

3.1.5.1.3.1 Bilan hématologique :

3.1.5.1.3.1.1 Phase chronique :

Tel que défini par l’OMS, l’hémogramme et le myélogramme permettent de poser le diagnostic de la LMC (même si la confirmation diagnostic reste génétique) par des anomalies cytologiques variables observées dans différentes phases de la maladie.

- L’hémogramme :

Permet d’orienter le diagnostic en montrant une hyperleucocytose à prédominance surtout granulocytaire (au moment du diagnostic le taux des leucocytes est généralement de l’ordre $100 \cdot 10^9$ /litre pour une normale comprise entre $4 \cdot 10^9$ /litre et $10 \cdot 10^9$ /litre) une anémie (taux d’hémoglobine inférieur à 11g/dl), une thrombocytose (comprise entre $400 \cdot 10^9$ /litre à $700 \cdot 10^9$ /litre pour une valeur normale comprise entre $150 \cdot 10^9$ /litre et $400 \cdot 10^9$ /litre) (8,30).

- Myélogramme :

Le Myélogramme est l’autre examen qui permet d’appuyer l’hypothèse de diagnostic de la LMC en montrant une hyperplasie du tissu myéloïde. L’hyperplasie concerne surtout la lignée granuleuse (environ 95%) et le nombre de blastes présents n’est pas assez significatif (inférieur à 5%) (8,10).

Cette phase est définie par l’OMS par les critères suivants :

- Inférieur à 15% de blastes dans le sang périphérique et la moelle osseuse,
- Inférieur à 30% de blastes et de promyélocytes dans le sang périphérique et dans la moelle osseuse,
- Inférieur à 20% de polynucléaires basophiles dans le sang périphérique,
- Supérieur ou égale à 100×10^9 /L (égal à $\geq 100\,000$ /mm³) de plaquettes.

Il n’y a pas de signe d’envahissement leucémique extramédullaire, à l’exception d’une hépato-splénomégalie (38,41).

3.1.5.1.3.1.2 Phase Accélérée :

Les critères de diagnostic de cette phase sont également définis par l’OMS de la même façon que la phase chronique (38,41) :

- Persistance ou augmentation de la splénomégalie, ne répondant pas au traitement
 - Persistante ou augmentation du nombre des leucocytes au-delà de $10 \cdot 10^9/l$, ne répondant pas au traitement
 - Persistance ou augmentation de la thrombocytose ($> 1000 \cdot 10^9/L$), ne répondant pas au traitement
-
- Persistance d’une thrombopénie $< 100 \cdot 10^9/L$, sans lien avec le traitement
 - Présence d’au moins 20% de basophiles dans le sang
 - Présence de 10-19% dans le sang et ou la moelle osseuse
 - Présence d’anomalies cytogénétiques clonales additionnelles au Ph1.

3.1.5.1.3.1.3 Phase blastique:

Selon l’OMS, la phase blastique doit répondre aux critères suivants (38,41) :

- Présence de 20% ou plus de blastes dans la moelle osseuse
- Présence de Plus de 30% de blastes et promyélocytes dans la moelle ou dans le sang.

Plus ou moins associé à la forme tumorale extramédullaire

3.1.5.1.3.2 Bilans génétiques :

3.1.5.1.3.2.1 Caryotype :

Le caryotype est l’examen de première intention en cas de suspicion de diagnostic, devant les signes cliniques et les anomalies cytologiques, pour confirmer le diagnostic et pour évaluer la réponse au traitement (5,13). Le caryotype, réalisé sur un prélèvement du sang ou de la moelle (sur 20 mitoses pour le diagnostic et 20 à 30 mitoses pour le suivi), permet dans 95% des cas de mettre en évidence la présence de chromosome Ph

(un petit chromosome 22), et un chromosome 9 allongé, issu d'une translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22, qui, sur le plan moléculaire, contribue à la formation du gène chimérique *BCR-ABL1* (7,34,42,43) (Figure7).

Il permet également une analyse pangénomique et donc la détection des anomalies chromosomiques associées (13).

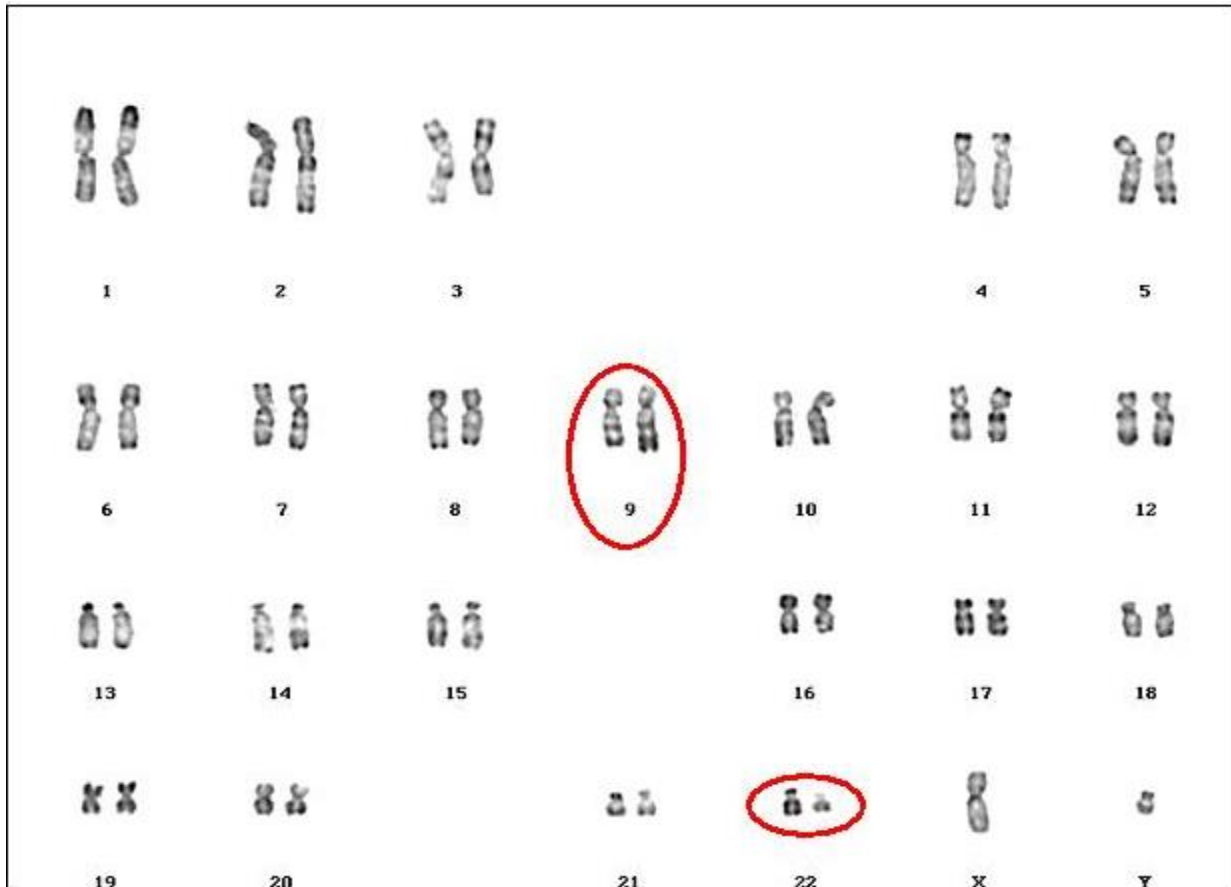


Figure 7: Présentation du chromosome Philadelphie sur le Caryotype à la phase chronique de la LCM (41).

Cependant la translocation peut parfois apparaitre complexe, impliquant plus de 2 chromosomes ou des insertions, dans ce cas le remaniement est cryptique limitant ainsi le pouvoir diagnostique du Caryotype (42).

Ces anomalies chromosomiques complexes au caryotype sont des facteurs de mauvais pronostic et sont très généralement liées à une accélération de la maladie vers la phase blastique dont l'issue est très souvent fatal (44).

Les inconvénients de cette technique sont également liés à son faible pouvoir de résolution (<5Mb), à l'obtention d'un nombre conséquent de cellules en mitose, à la présence de chromosome Ph (alors dans 5% des cas de LMC, le chromosome Ph est absent) (42,45).

3.1.5.1.3.2.2 FISH (Hybridation in situ en fluorescence) :

Cette technique est basée sur la propriété des séquences de l'ADN de se fixer spécifiquement à leurs séquences complémentaires (42).

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

La FISH n'est pas systématique dans le diagnostic de la LMC, cependant elle est nécessaire dans le cas des LMC à chromosome Ph négatif, et doit être couplée au caryotype dans des conditions particulières, par exemple quand l'anomalie est trop complexe pour visualiser un chromosome Ph, ou lorsqu'il n'y a pas de mitose après la culture. Il s'agit d'une technique assez ciblée, elle ne permet pas une analyse pangénomique, et donc ne permet la détection d'anomalie chromosomique additionnelle (46).

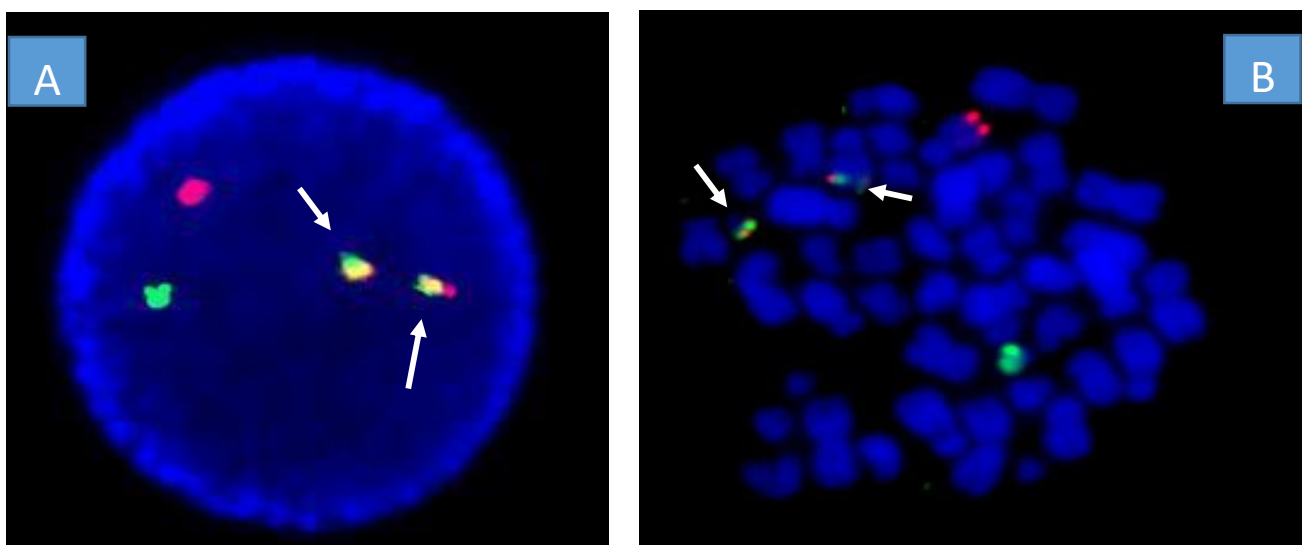


Figure 8 : Le résultat FISH de la translocation t(9;22): *A* : FISH interphasique (47), *B* : FISH métaphasique (illustration du métaphase d'un de nos patient présentant la translocation t(9,22)) avec la sonde dual FISH.

Selon les recommandations de l'ELN, la FISH doit être proposée en première intention dans les conditions suivantes :

- Présence d'une variante de t(9,22)
- Présence de chromosome Ph masqué
- Échec de caryotype
- Pour le suivi afin confirmer une rémission cytogénétique complète et pour évaluer une réponse partielle (44,45).

Ainsi l'intérêt de la FISH par rapport au caryotype est sa sensibilité plus élevée pour le diagnostic et le suivi, sa capacité de diagnostiquer les formes complexes de la LMC à chromosome Philadelphie négatif, et également de remplacer le caryotype dans les cas d'échec de la culture cellulaire.

Cette technique est plus rapide, moins laborieuse et permet l'analyse d'un nombre conséquent de cellules que le caryotype conventionnel (33).

Elle ne permet pas en revanche de visualiser les anomalies cytogénétiques additionnelles (10).

3.1.5.1.3.2.3 Polymerase Chain Reaction (PCR):

La PCR permet de mettre en évidence la présence de transcrit *BCR/ABL1* dans le prélèvement de la moelle ou dans le sang, le résultat s'exprime par le pourcentage de copies *BCR-ABL1/ABL1* (43). Cet examen est très important surtout pour le suivi des patients sous traitement car il permet d'évaluer la maladie résiduelle minimale dans le sang ou dans la moelle afin de déterminer la réponse aux traitements. La PCR est très sensible avec sa capacité de détecter une cellule leucémique parmi 100.000 (48). A l'heure actuelle c'est l'examen de choix pour le suivi moléculaire des patients atteints de LMC (13).

3.1.5.2 Diagnostic étiologique :

Aucune étiologie ni de facteur génétique n'est identifiée à l'origine de la LMC. Cependant, on note une augmentation du risque de la maladie après chaque 10 an à partir de 30 ans et aussi une fréquence plus élevée chez l'homme que chez la femme.

Certaines études ont montré une augmentation du nombre de LMC chez les personnes exposées aux radiations ionisantes et au benzène (49,50). Cette hypothèse est appuyée par une augmentation de l'incidence de la maladie chez les survivants de la bombe atomique d'Hiroshima (5). Des études de laboratoire ont aussi montré une augmentation du nombre de réarrangement *BCR-ABL1* dans des cellules exposées aux irradiations qui au départ étaient indemnes de réarrangements (49,50).

3.1.5.3 Diagnostic différentiel :

Il se fait avec les pathologies suivantes :

➤ Myélimie réactionnelles :

Dans ce cas nous avons l'absence de blastes circulants, un taux faible des promyélocytes et l'absence de chromosomes Philadelphie⁺⁺⁺ (5).

➤ LMMC (leucémie myélomonocytaire chronique) de l'adulte :

Présence de cytopénie, de thrombopénie, de monocytose franche, diminution des basophiles et absence de chromosomes Philadelphie⁺⁺⁺ (40).

➤ Splénomégalie myéloïde ou myélofibrose primitive :

Une érythroblastose, une érythromyémie et absence de chromosomes Philadelphie⁺⁺⁺ sont les caractéristiques de cette pathologie(40).

➤ Polyglobulie de Vaquez :

Les taux d'hémoglobine et d'hématocrite sont augmentés et pas de chromosomes Philadelphie⁺⁺⁺ (40).

➤ Thrombocytopénie essentielle :

Présence d'une thrombocytose isolée avec une hyperleucocytose modérée et la basophilie est très présente au moment du diagnostic. C'est un diagnostic d'élimination des autres syndromes myéloprolifératifs. Absence de chromosome Philadelphie⁺⁺⁺ (en faveur de la LMC), pas de myélofibrose (en faveur d'une splénomégalie myéloïde), pas de masse sanguine augmentée (en faveur de la polyglobulie de Vaquez) (40).

3.1.6 Traitement:

3.1.6.1 Evaluation du pronostic :

Une fois le diagnostic réalisé, les patients atteints de LMC sont soumis à une évaluation de risque de la maladie par des scores pronostics qui permettent de prédire statistiquement l'évolution de la maladie en se basant sur des caractéristiques cliniques et biologiques et contribuent ainsi à aider le médecin à la prise de décision pour instaurer la thérapie et mettre en place une stratégie pour prévenir ou prendre en charge des possibles complications.

Il existe plusieurs types de scores pour classer les patients en plusieurs groupes de risques différents, mais les plus utilisés sont le score de Sokal et le Score de Hasford (pour l'évaluation du risque avant l'instauration du traitement), aussi le score de Gratwohl pour les patients chez qui sont proposés une greffe de la moelle et le score de Hammersmith hôpital pour prédire la réponse aux traitements avec les ITKs de deuxième génération (5,51).

Les facteurs pronostics calculés dans ces différents types de scoring permettent de déterminer l'issue de la LMC et prévoir les chances de guérison ou le risque de réapparition de la maladie.

3.1.6.1.1 Score de Sokal :

Le Score a été élaboré en 1984 par Sokal et *al.* pour prédire la réponse au traitement avec le busulfan et l'hydroxurée (5). Il se base sur des calculs algorithmiques pour déterminer 3 groupes de population à risque différent.

$$\text{Indice de Sokal} = (0,0255 \times (\text{rate} - 8,14)) + 0,0324 \times (\text{blastés} - 2,22) + 0,1025 \times [(\text{plaquettes}/700)^2 - 0,0627] - 0,0173 \times (\text{hématocrite} - 34,2) \times (\text{sexe} - 1,40).$$

Tableau I: Classification pronostic avec l'indice de Sokal

Risque	Indice de Sokal	survie médiane
Faible risque	inférieur à 0,8	60 mois
Risque intermédiaire	entre 0,8 et 1,2	44 mois
Haut risque	supérieur à 1,2	32 mois

Le calcul de ce score est indispensable au diagnostic comme le reflet de la masse de cellule tumorale et l'évolutif probable de la maladie (52,53).

3.1.6.1.2 Le Score d'EUTOS :

Le score d'EUTOS a été créé, en 2011 par le groupe européen European LeukemiaNet (ELN) développé et testé sur un grand groupe de 2060 patients inscrits dans des essais cliniques et traités par l'imatinib en première ligne.

Ce score était basé sur deux facteurs simples, le pourcentage de basophiles et la taille de la rate (mesurée en cm sous la marge costale).

$$\text{Score EUTOS} = (7 \times \text{basophiles}) + (4 \times \text{taille de la rate})$$

Deux groupes de patients ont été délimités : les patients à faible risque de ne pas atteindre une réponse cytogénétique complète à 18 mois si la somme est inférieure à 87, et les patients à risque élevé de ne pas atteindre une réponse cytogénétique complète à 18 mois si la somme est supérieure à 87.

3.1.6.1.3 Le Score de Hasford :

Après avoir travaillé sur une série de 1303 patients traités avec l'interféron (INF)- α , Hasford *et al.* sont arrivés à la conclusion que le score de sokal n'est pas suffisamment adapté chez les patients traités par l'INF- α (54). Ils ont ainsi proposé un nouvel indice (Indice de Hasford ou Euroscore), calculé comme suit :

- La basophilie : 0 si basophilie < 3% et 1 dans tout autre cas
- Le taux de plaquettes : 0 si le taux est < 1 500 $10^9/l$ et 1 pour autre cas

$$\text{Indice} = [(0,6666 \text{ âge}) + (0,0420 \text{ rate}) + (0,0584 \text{ blastes}) + (0,0413 \text{ éosinophiles}) + (0,2039 \text{ basophiles}) + (1,0956 \text{ plaquettes})] \times 1\,000$$

Le Score de hasford permet de classer les patients en 3 groupes de risques statistiquement différents en ce qui concerne la survie (5,37,54).

Tableau II: Classification pronostic avec l'indice de Hasford

Risque	Indice de Hasford	survie médiane
Faible risque	inférieur à 780	98 mois
Risque intermédiaire	entre 780 et 1 480	65 mois
Haut risque	supérieur à 1 480	42 mois

3.1.6.2 But du traitement :

Le principal objectif de la prise en charge tel que définis par l' European Leukemia Net (ELN) depuis 2013, est basé sur les critères suivants (43):

- Assurer l'espérance de vie la plus longue;
- Assurer la meilleure qualité de vie;
- Éviter des complications inutiles;
- Éventuellement obtenir une guérison.

3.1.6.3 Moyens, et suivi :

L' imatinib mésylate (IM), est la première molécule basée sur la thérapie ciblée qui a montré son efficacité dans le traitement de la LMC par sa capacité d'induire une inhibition compétitive de l'adénosine triphosphate (ATP) au niveau du site catalytique de la protéine kinase (5). L'imatinib par son mécanisme d'action fait partie des inhibiteurs de la tyrosine kinase (ITKs).

Cependant malgré les réponses satisfaisantes obtenues à l'utilisation de l'IM, il a été observé deux principales phénomènes pouvant mettre l'IM dans une impasse : la récurrence de la maladie inéluctable en cas d'arrêt de traitement et la résistance de la maladie à l'IM « même si la proportion est faible » (55).

La connaissance de ses mécanismes de résistance a permis l'élaboration de nouvelles molécules « qui sont aussi des ITKs » permettant de pallier à ce déficit (3,55).

- **Les Inhibiteurs de la Tyrosine Kinase (ITKs) :**

Les ITKs sont le traitement de référence de la LCM quel que soit la phase de la maladie. Ils sont divisés en 3 générations : première génération (Imatinib), 2^{ème} génération (Dasatinib, Nilotinib, Bosutinib), 3^{ème} génération (Ponatinib) (56).

Tableau III: Les différents types d'inhibiteur de la tyrosine kinase (ITK)

DCI	Nom commercial	Formes galéniques	Posologie (AP et BP)
Imatinib	Glivec®	Comprimé pelliculé	400mg/Jr (800mg/Jr)
Dasatinib	Sprycel®	Comprimé pelliculé	100mg/Jr (140mg/Jr)
Nilotinib	Tasigna®	Gélule	400mg/2x/jr
Bosutinib	Bosulif®	Comprimé pelliculé	500mg/Jr (600mg/Jr)
Ponatinib	Iclusig®	Comprimé pelliculé	45 mg/Jr

Tableau IV: Définition de la réponse hématologique, cytogénétique et moléculaire (57)

Réponse		Définition
Hématologique complète		<p>Un taux de plaquettes inférieur à $450 \cdot 10^3/\text{mm}^3$.</p> <p>Un taux de leucocytes inférieur à $10 \cdot 10^3/\text{mm}^3$.</p> <p>La disparition des cellules granuleuses immatures circulantes.</p> <p>La réduction de la basophilie à moins de 5% de la formule sanguine.</p> <p>Cliniquement la disparition de tous les symptômes et signes cliniques, en particulier la splénomégalie.</p>
Cytogénétique	complète (RCyC)	Disparition complète des métaphases Ph+.
	partielle (RCyP)	Diminution entre 1 et 35% des mitoses examinées.
	mineure	Persistance de 36 à 65% de mitoses Ph+.
	minime	Persistance de 66 à 95% de mitoses Ph.
	Absente	Persistance de plus de 95% de mitoses Ph+.
Moléculaire	complète (RMC)	Un transcrit <i>BCR-ABL</i> non quantifiable et non détectable
	majeure (RMM)	Réduction du taux de <i>BCR-ABL1/ABL1</i> de 3 logarithmes, qui correspond à un ratio <i>BCR-ABL1/ABL1</i> inférieur $\leq 0,1\%$

Tableau V: Définition des critères de réponses aux ITKs utilisés en première ligne de traitement (43).

Évaluation de la réponse	Optimale	Vigilance	Échec thérapeutique
Mise en route du traitement	NA	Score à haut risque ou aberration chromosomique dans les cellules Ph+	NA
3 mois	$BCR-ABL1 \leq 10\%$ et/ou CPh+ $\leq 35\%$	$BCR-ABL1 > 10\%$ et/ou CPh+ 36–95%	Absence de RCH et/ou Ph + $> 95\%$
6 mois	$BCR-ABL1 \leq 1\%$ et/ou CPh + ≤ 0	$BCR-ABL1 1-10\%$ et/ou CPh + 1–35%	$BCR-ABL1 > 10\%$ et/ou CPh + $> 35\%$
12 mois	$BCR-ABL1 \leq 0,1\%$	$BCR-ABL1: 0,1-1\%$	$BCR-ABL1 > 1\%$ et/ou CPh + > 0
Au-delà de 12 mois et à tout moment	$BCR-ABL1 \leq 0,1\%$	Anomalies chromosomiques clonales dans les cellules Ph- (-7ou 7q-)	Perte de RCH, perte de RCyC, perte confirmée de RMM découverte d'une mutation

NA : non applique, CPh ; nombre de Cellule a chromosome Philadelphie, ACC : anomalies chromosomiques clonales, RCH : réponse complète hématologique, RCyC : réponse cytogénétique complète, RMM : réponse moléculaire majeure

3.2 Généralités sur l'hybridation *in situ* en fluorescence

3.2.1 Définition :

L'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) est une technique de cytogénétique moléculaire qui utilise des sondes fluorescentes qui se lient uniquement aux parties d'une séquence d'acide nucléique avec un degré élevé de complémentarité de séquence. La FISH est souvent utilisée pour détecter et localiser la présence ou l'absence d'une séquence d'ADN ou d'ARN spécifique dans des cellules interphasiques ou sur des métaphases (58).

3.2.2 But :

Le but de la FISH est de déterminer la présence, l'absence, le changement du nombre de copies ou le réarrangement d'une séquence d'acide nucléique. Cela se traduit sur le plan cytogénétique par la détermination d'anomalies chromosomiques telles que des délétions, des duplications, des amplifications, des inversions, et des translocations, etc. (59).

3.2.3 Principes :

Le principe de la technique FISH est fondé sur la propriété de réassociation spécifique des acides nucléiques. La séquence cible (ADN ou ARN) et une sonde (acide nucléique modifié ou non) ont un degré de complémentarité très élevé d'un ou de leurs brins. La sonde qui est couplée à un fluorochrome et la séquence cible sont rendues monocaténaïres par la dénaturation et mises en contact dans des conditions permettant leur hybridation. L'hybridation a lieu grâce à la complémentarité des bases nucléotidiques de la sonde et de la séquence cible, et leur appariement se fait par des liaisons d'hydrogène établies selon les critères de Watson et Crick. Les hybrides infidèles et les molécules de sonde non hybridées sont éliminés par des lavages successifs. Enfin l'observation s'effectue au microscope à épifluorescence qui permet de visionner la séquence cible marquée par un fluorochrome dans des noyaux ou sur des métaphases. (Voir Figure 9).

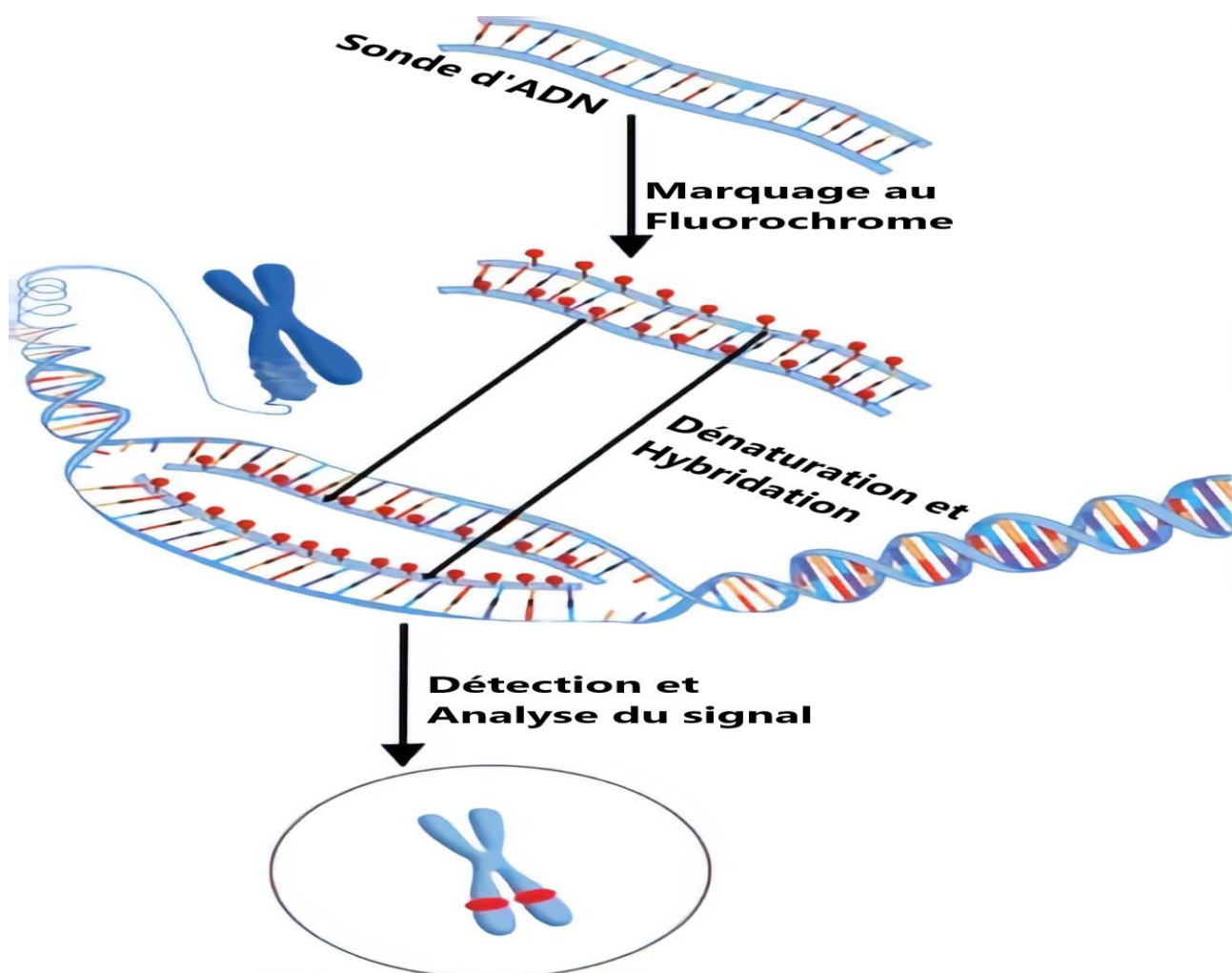


Figure 9: Illustration du principe de FISH

3.2.4 Sondes utilisées

Les sondes constituent l'élément essentiel de la technique FISH. Les sondes de FISH peuvent provenir d'une séquence d'ADN, d'ARN ou d'acide nucléique modifié tel que l'acide nucléique peptidique (PNA) ou «locked nucleic acid» (LNA) et elles peuvent se présenter en double brins (sonde d'ADN) ou simple brin (sondes d'ARN, de PNA ou de LNA). La taille minimale d'une sonde cliniquement viable pour FISH est d'environ 50 Kb, tandis que des sondes plus grandes peuvent couvrir jusqu'à 1 Mb, mais la plupart des sondes sont généralement entre 200 à 400 Kb. Actuellement, les sondes sont directement marquées par un ou des fluorochromes qui ont des spectres d'émission et d'excitation leur permettant d'être visualisées par un microscope à fluorescence.

Les sondes les plus couramment utilisées en FISH sont classifiées en trois groupes et cette classification est faite en fonction de la cible de la séquence d'ADN (59).

3.2.4.1 Les sondes spécifiques de loci :

Ces sondes ciblent un ou des loci spécifiques du génome. Ces sondes sont les plus fréquemment utilisées dans la détermination des anomalies chromosomiques. La combinaison de deux ou trois sondes spécifiques de loci marquées par des fluorochromes différents est de règle pour la détection des anomalies chromosomiques en oncologie. Cette combinaison sert de contrôle interne de l'hybridation et permet d'interpréter efficacement les patrons de signaux. Pour la détection des translocations ou des inversions surtout en oncologie, la combinaison de sonde appelée « Break-part » ou les « dual color fusion » sont les plus couramment utilisées parce qu'elles sont plus spécifiques pour détecter des cellules cancéreuses présentant ces anomalies.

3.2.4.2 Les sondes répétitives :

À l'opposé des sondes spécifiques de loci, elles sont composées de séquences spécifiques d'ADN répétées. Ces sondes ciblent généralement les régions centromériques et télomériques.

3.2.4.3 Les sondes de peinture chromosomique :

Ces sondes s'hybrident à un chromosome entier ou un bras chromosomique. La combinaison de plusieurs sondes de peinture chromosomique permet de faire le caryotype spectral.

3.2.5 Étapes :

3.2.5.1 Échantillons :

La FISH peut être faite à partir des préparations cytologiques et histologiques provenant de tout échantillon d'origine humaine. Les cellules interphasiques obtenues à partir d'une fixation au méthanol et à l'acide acétique ou d'une coupe tissulaire (tissus frais ou enrobé à la paraffine) sont les préparations les plus utilisées. En outre, des

chromosomes obtenus à partir d'une préparation métaphasique peuvent être aussi la cible d'une FISH.

3.2.5.1.1 Prétraitement de l'échantillon :

Cette étape permet une meilleure pénétration de la sonde dans la cellule, le noyau ou dans le ou les chromosomes cibles. Pour des préparations cytogénétiques telles les métaphases ou les noyaux interphasiques issus d'une récolte directe, le prétraitement à la chaleur ou dans une solution saline permet de rendre la chromatine plus accessible à la sonde. Pour des préparations histologiques telles des coupes de tissus frais ou enrobés dans la paraffine, une digestion protéolytique est nécessaire pour mieux perméabiliser les cellules, les noyaux et la chromatine afin qu'ils soient plus accessibles à la sonde.

3.2.5.1.2 Dénaturation de la séquence cible et de la sonde :

Cette étape qui consiste à séparer (généralement par la chaleur) les deux brins d'ADN par rupture des liaisons hydrogènes. Une température à 75°C est généralement utilisée pour la plupart des sondes à ADN. Cette température a l'avantage d'être au-dessus de la température de fusion de l'ADN et empêche aussi la formation de structure secondaire de l'ADN monocaténaire lorsque la sonde est dénaturée.

3.2.5.1.3 Hybridation :

Durant cette étape les brins d'ADN se réassocient de façon spécifique, ce qui permet à l'ADN de la sonde de s'hybrider à l'ADN cible. Cette étape est faite dans un environnement humide et généralement à 37°C. Elle peut durer de 1 heure à 48 heures dépendamment du type de sonde et de la cible.

3.2.5.1.4 Lavage :

Cette étape permet d'éliminer les hybrides infidèles et les sondes non hybridées. Elle est faite à une température au-dessus de la température d'hybridation et dans une solution saline associée à un détergent.

3.2.5.1.5 Contre-coloration :

La coloration de l'ADN nucléaire est souvent nécessaire pour localiser avec précision la séquence cible dans un noyau interphasique ou sur un chromosome. La contre-coloration est diluée dans une solution qui retarde la diminution de l'intensité de la fluorescence de la sonde. Elle se fait généralement avec le DAPI (4', 6-diamidino-2-phénylindole), qui colore le noyau et les chromosomes en bleu permettant la visualisation simultanée de la plupart des fluorochromes utilisés avec les sondes.

3.2.5.1.6 Stockage :

Les lames hybridées peuvent être stockées dans un congélateur à -20 °C jusqu'au moment de l'observation. La fluorescence est plus stable à une température basse. Les lames doivent être aussi protégées de la lumière. Une température élevée et la lumière diminuent l'intensité du signal de la sonde.

3.2.5.1.7 Observation et interprétation :

L'observation de l'échantillon se fait à partir d'un microscope à fluorescence qui est équipé de filtres appropriés pour visionner la séquence cible. En général, le microscope est équipés d'une caméra qui permet la prise d'image, essentielle pour l'interprétation des échantillons utilisés en clinique pour le diagnostic, le pronostic ou le suivi thérapeutique. L'interprétation des patrons de signaux se fait en fonction de la sonde utilisée, de la séquence cible, du type d'échantillon et de la pathologie.

3.2.6 Application :

La FISH est une technique de cytogénétique moléculaire complémentaire aux techniques de la cytogénétique conventionnelle telle que le caryotype. La FISH est utilisée en recherche ou en clinique pour la détection des réarrangements des séquences d'ADN ou d'ARN. En général, l'utilisation clinique de la FISH a pour but de déceler des anomalies chromosomiques constitutionnelles ou acquises. Elle permet le diagnostic des syndromes génétiques au cours du diagnostic prénatal ou après la naissance. L'étude des anomalies chromosomiques acquises sur les tumeurs a largement bénéficié du développement de la FISH parce que les aberrations chromosomiques sont souvent

nombreuses et complexes d'une part, et d'autre part, les préparations chromosomiques sont parfois de qualités insuffisantes ne permettant pas une analyse complète avec les techniques conventionnelles. Certaines hémopathies malignes et tumeurs solides peuvent se caractériser par un remaniement chromosomique spécifique (translocation, inversion) facilement détectable par la FISH. Les anomalies détectées notamment dans les leucémies ont fréquemment un intérêt diagnostique, pronostique et parfois dans le suivi du traitement pour en contrôler l'efficacité. La FISH est l'une des approches moléculaires les plus utilisées en cytogénétique et pathologie moléculaire du fait de sa précision et de sa facilité.

3.2.7 Avantages et limites :

L'analyse cytogénétique classique des tumeurs est parfois difficile : culture cellulaire aléatoire, qualité médiocre des métaphases obtenues, index mitotique faible, contamination des cellules tumorales par du tissu sain, etc. La FISH permet en partie de limiter les inconvénients de ce type de culture de cellules tumorales notamment par le grand nombre de cellules pouvant être examinées aussi bien en métaphase qu'en interphase. La FISH est une approche rapide qui permet d'obtenir des informations de diagnostic précieuses en 2 jours au lieu d'attendre trois à quatre semaines avant d'obtenir des caryotypes de bonne qualité en cas de cultures des cellules des tumeurs solides. La FISH est applicable sur des cellules à n'importe quel stade du cycle cellulaire ainsi que les tissus archivés et sa résolution de détection des anomalies chromosomiques est plus élevée que celle du caryotype. En fin l'analyse des résultats se fait cellule par cellule permettant de déterminer la clonalité et le pourcentage de cellules cancéreuses parmi les cellules saines.

L'une des limites majeures de la FISH est que la sonde ne peut fournir que des informations sur la séquence cible. En outre, il faut connaître ou supposé au préalable l'anomalie chromosomique avant de choisir la sonde.

3.2.8 La FISH dans la LMC

Le diagnostic et le suivi du traitement dans la LMC sont appréciés à travers les bilans génétiques à priori le caryotype standard, mais la limite du caryotype dans la détection de certains microremaniements, dans l'analyse des cellules interphasiques, dans la détection du chromosome Philadelphie en présence de translocation cryptique, et d'un nombre élevé de métaphase sont compensés par la technique FISH.

La FISH peut être réalisée sur des préparations cytogénétiques provenant des cellules de la moelle ou du sang périphérique. Des études ont montré qu'il n'y a pas de différence statistique significative entre la FISH faite sur les cellules provenant de la moelle et du sang périphérique. Il est donc préférable de faire la FISH sur les cellules du sang périphérique surtout lors du suivi des patients afin d'éviter l'inconfort lié à la ponction de la moelle (60). En outre, il est mieux de faire la FISH sur des préparations métaphasiques parce que l'identification des formes atypiques de fusions entre les loci *ABL1/BCR* et les points de cassures entre ces deux loci sont plus faciles à détecter. Il est aussi possible d'identifier la présence d'un autre chromosome Ph. Plusieurs stratégies dans la conception des sondes ont été utilisées pour la mise en évidence du gène de fusion. Actuellement dans la pratique clinique, la sonde bicouleur/double fusion (dual fish probe) est la plus utilisée parce que son utilisation permet de minimiser le risque de faux positifs (inférieur à 1%), de montrer clairement la fusion des gènes *BCR-ABL1* même en présence de translocation cryptique, d'analyser un grand nombre de noyaux et de métaphases, si présents, et d'apprécier le niveau moléculaire en cas les points de cassure atypiques sur les gènes *BCR* et *ABL1*.

La méthode bicouleur/double fusion FISH utilise des sondes pour les loci *BCR* et *ABL1* (Figure 10) marquées par des fluorochromes de couleur différentes (rouge et vert). La sonde *ABL1* est marquée au rouge et couvre une cible génomique d'environ 650 kb s'étendant de la zone centromérique du gène de l'argininosuccinate synthétase (*ASS1*) à la région télomérique du dernier exon *ABL1*. La sonde cible *BCR* s'étend sur une distance génomique d'environ 1,5 Mo. Elle commence dans les segments variables du

locus de la chaîne légère de l'immunoglobuline lambda et se termine à environ 900 kb de la région télomérique du gène *BCR*. Les sondes *ABL1* et *BCR* couvrent leurs points de cassure respectifs associés à la translocation $t(9; 22)(q34; q11.2)$. Le patron de signaux dans une cellule ne présentant pas la translocation $t(9; 22)(q34; q11.2)$ se traduit par deux signaux verts et deux signaux rouges (Figure 11). Par contre, en cas de $t(9;22)(q34; q11.2)$ impliquant des points de cassures typiques, on aura deux signaux de fusion (verts et rouges) et un signal rouge et un signal vert. Les signaux de fusion représentent les dérivatifs des chromosomes 9 et 22 (chromosome Ph). Les signaux rouge et vert présentent respectivement les chromosomes 9 et 22 qui ne sont pas transloqués

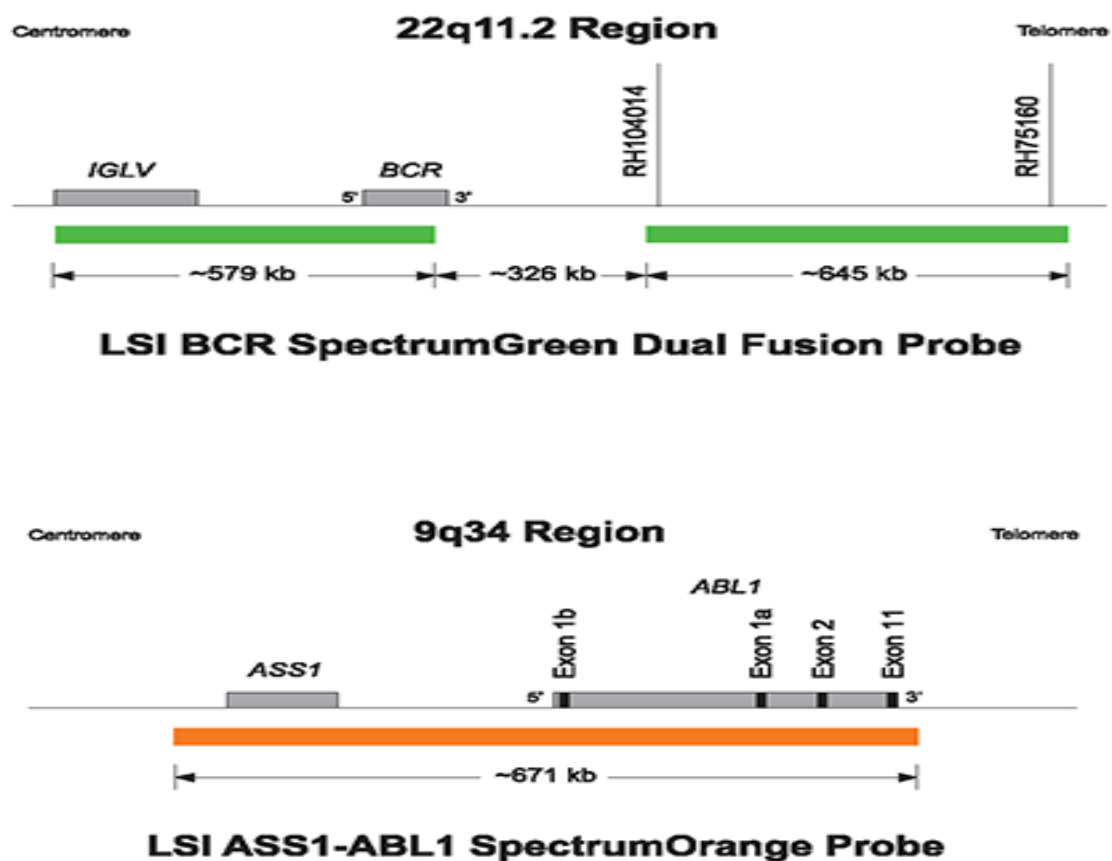


Figure 10: Représentation graphique des sondes utilisées pour les chromosomes 9 et 22 dans la LMC (61)

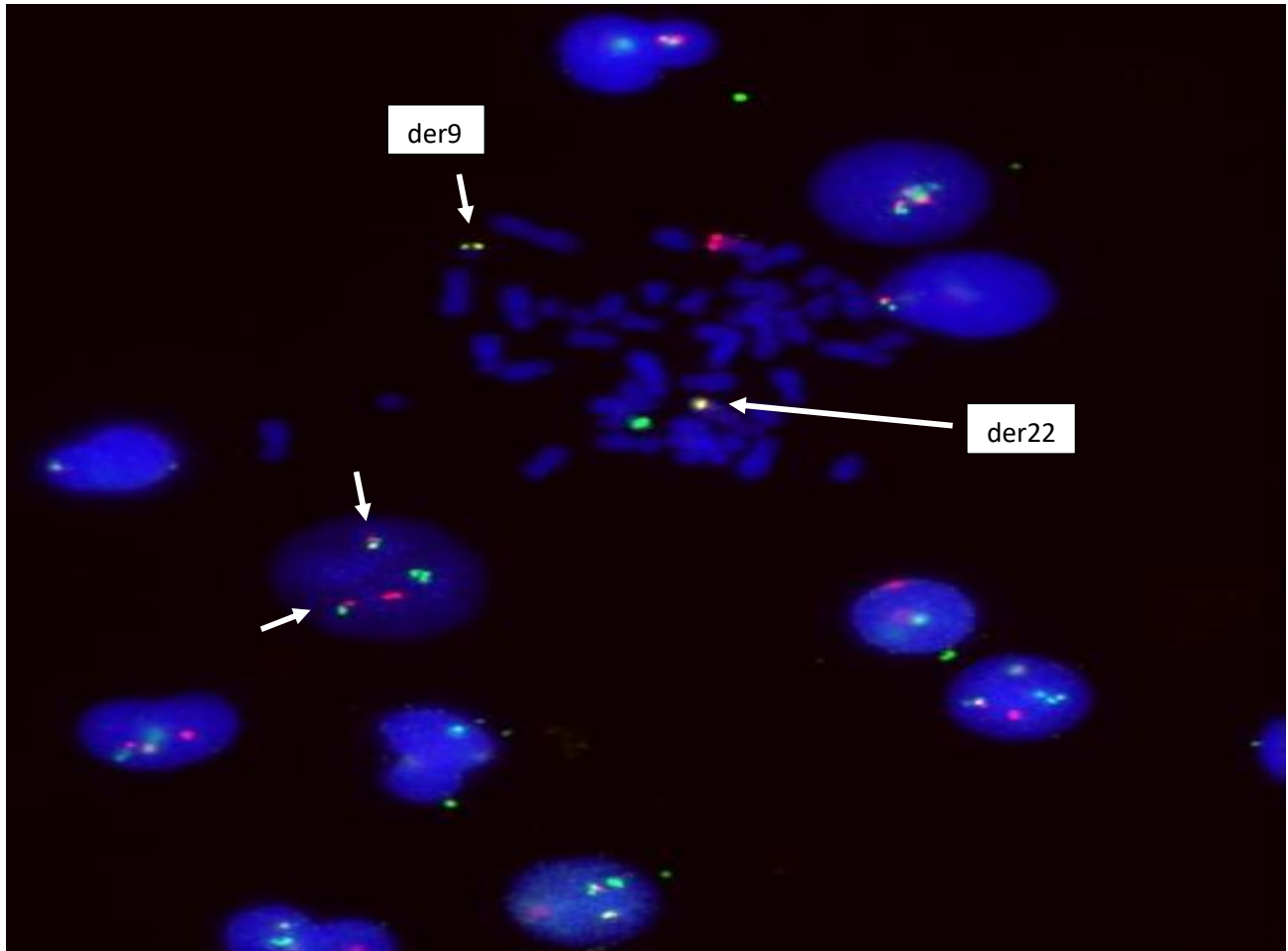


Figure 11: Représentation de la translocation t(9;22) en métaphase et dans le noyau

4 METHODOLOGIE :

4.1 Cadre de l'étude :

Il s'agit d'une étude de validation de la technique FISH qui fait suite à une première étude de mise au point de cette technique.

La partie technique de l'étude s'est déroulée dans le Service de Cytogénétique et de Biologie de la Reproduction de l'Institut de Recherche en Santé Public (INSP) et l'évaluation microscopique et l'analyse ont été faite dans le laboratoire de la Neurogénétique dans le Service de Neurologie du CHU du Point "G".

4.2 Type et Période d'étude :

Il s'agit d'une étude de recherche longitudinale, descriptive, qui s'est déroulée sur une période de 10 mois allant du 31 octobre 2018 au 27 août 2019.

4.3 Population d'étude :

Elle portait sur les patients vus en consultation par un médecin hématologue et ou oncologue et présentant des signes cliniques et ou biologiques de la LMC, qui nous ont été référés pour le diagnostic ou le suivi.

4.4 Échantillonnage :

Il était exhaustif et portait sur les patients présentant les signes cliniques et/ou biologiques de LMC et répondant aux critères si dessous :

4.4.1 Critères d'inclusion :

Tous les patients présentant des signes cliniques et/ou biologiques de la LMC et/ou les patients déjà diagnostiqués pour la LMC adressés au Service de Cytogénétique et de Biologie de la Reproduction de l'INRSP pour le bilan de diagnostic ou de suivi après leurs consentements.

4.4.2 Critères de non-inclusion :

Les patients ne présentant pas les signes cliniques et/ou biologiques de LMC, et ou ceux dont le consentement n'a pas été obtenu, et tout autre patient qui ne répond pas aux critères d'inclusion.

4.5 La procédure de collecte des données :

La collecte des données était réalisée comme suit :

4.5.1 L'information :

Les médecins oncologues et/ou hématologues et également les patients étaient tous informés du but, des objectifs et de la portée de l'étude.

4.5.2 Enrôlement et consentement :

Les patients ont été informés du type et de la procédure de l'examen et leur consentement a été demandé verbalement.

4.5.3 L'examen génétique :

4.5.3.1 La collecte de sang ou de la moelle :

Le sang ou la moelle était recueilli dans deux tubes à héparine de 4 ml.

Le prélèvement a été effectué dans le service demandeur de l'examen ou dans le Service de Cytogénétique et de Biologie de la Reproduction de l'INRSP.

4.5.3.2 Mise en culture cellulaire :

Le protocole standard du service pour la mise en culture cellulaire a été suivi. (Voir appendice 1 pour plus de détails)

Le principe de la mise en culture est de multiplier des cellules hors de leur environnement naturel, et pour cela le nouvel environnement doit contenir un minimum de nutriments et de gaz (acides aminés, glucose, CO₂, etc). En général, deux tubes

contenant chacun 5 ml de milieu de culture et 200-400 µl (en fonction de la cellularité des leucocytes) du sang périphérique ou de l'aspiration de la moelle pour chaque patient ont été mis en culture dans un incubateur de 37°C.

4.5.3.3 La récolte cellulaire :

La récolte cellulaire a également été effectuée suivant le protocole standard de notre laboratoire (Voir Appendice 2 pour plus de détails). La récolte des cellules s'est faite suivant le principe suivant :

- Dans un premier temps, il s'agit d'empêcher le raccourcissement des cellules par le bromure d'ethidium. Le bromure d'ethidium est un intercalaire d'ADN, il s'intègre à l'intérieur des chromosomes et les empêche ainsi qu'ils se raccourcissent rendant leur analyse difficile.
- Ensuite, il faut arrêter la division des cellules à la métaphase par la colchicine. La colchicine est un agent antimitotique qui permet d'arrêter la division cellulaire à la métaphase en étant toxique pour les microtubules et inhibant ainsi la formation du fuseau de division ou fuseau mitotique. Les microtubules formés en début de la métaphase se rétractent à la fin de la métaphase en attirant les chromosomes vers les pôles et permettent ainsi le passage à l'anaphase, donc leur inhibition permet de maintenir la division cellulaire à la métaphase.
- La troisième étape est de faire le choc hypotonique par le chlorure de potassium (KCl). L'ion K est plus abondant dans le milieu intracellulaire (MI) que dans le milieu extracellulaire (ME). Ainsi, l'ajout de l'eau faiblement concentrée en KCl va entraîner une augmentation de la concentration du MI et provoquer ainsi la turgescence de la cellule.
- Enfin, on fixe les cellules par un mélange d'acide acétique et de méthanol. La fixation est une étape très importante car elle permet une bonne préservation de la morphologie (structure) cellulaire tout en inhibant sa fonction. Le fixateur est constitué d'acide acétique et de méthanol. L'acide acétique va provoquer une désintégration de la membrane plasmique par la perte d'une grande partie des

protéines et une stabilisation des chromosomes se fait grâce à la propriété fixatrice du méthanol.

4.5.3.4 La phase de prétraitement :

Le protocole standard du service pour le traitement des lames, dans lequel sont cités les matériaux et les solutions a été observé pour toutes les lames (Appendice 3).

La phase de prétraitement permet l'accessibilité de la sonde à sa cible. Les lames sont laissées pendant 96 heures à une température comprise entre 25-30°C. Ensuite, la solution saline tamponnée tris (TBS) qui est une solution tampon isotonique de stabilisation du pH couramment utilisée dans les procédures d'immunoessai est utilisée pour équilibrer les cellules se trouvant sur la lame. Enfin, on fait une déshydratation des cellules dans des bains successifs d'éthanol dilué à 80%, puis à 90% et à 100%.

4.5.3.5 La FISH :

La technique FISH est la principale technique employée à la recherche du gène de fusion *BCR/ABL1*. Pour cela, tous les échantillons sont mis en culture pendant 24 à 48 heures, puis récoltés et étalés sur une lame. Les sondes Vysis BRC/ABL1 sont utilisés pour l'identification les gènes BCR et ABL1 avec un temps d'hybridation de 24h a 48h

Lavage : On utilise la solution TBS avec un détergent la « Tween 20 » pour le lavage des lames afin d'enlever les hybrides infidèles et sondes non hybridées sur la lame

4.5.3.6 Observation :

Les lames sont observées à l'aide d'un microscope à fluorescence. Ainsi, 20 chromosomes métaphasiques ainsi que 200 noyaux interphasiques sont observés et analysés pour chaque échantillon.

Le résultat est donné en termes de pourcentage, c'est-à-dire le nombre de cellules présentant un réarrangement *BCR-ABL1* sur le nombre total de cellules examinées, autant pour les cellules interphasiques que pour les cellules métaphasiques.

4.5.4 Les variables :

Variables sociodémographiques : l'âge et le sexe étaient les principales variables étudiées.

Variables cliniques : le motif de consultation et les caractéristiques hématologiques étaient les principales concernées.

Variables génétiques : le pourcentage de cellule interphasique et/ou métaphasique présentant la fusion de *BCR-ABL1* et les différents patrons signaux indiquant la translocation *BCR-ABL1* ont été enregistrés comme variables génétiques.

4.5.5 Recueil et analyses des données

Les données ont été recueillies dans un fichier Excel. Le traitement de texte a été fait par Word 2016. Les figures et les tableaux ont été faits par Excel 2016. Les moteurs de recherche et de citation bibliographique ont été effectués sur : Keneya, Google, Google scholar, PubMed.

4.6 Les limites :

La non disponibilité de certains renseignements cliniques et biologiques a été un facteur limitant dans l'analyse des données.

4.7 Aspect éthique :

La confidentialité des données a été garantie. Le nom des patients ne figure dans aucun document relatif aux résultats de notre étude. Ce travail est scientifique et concerne le secteur de la santé hématologique, oncologique, génétique et oncogénétique afin de fournir aux médecins des renseignements utiles dans la prise en charge des patients et aux chercheurs le profil génétique des patients leucémiques au Mali en vue d'améliorer leur santé et d'étendre les perspectives de recherche.

5 RESULTATS :

Vingt et cinq personnes ont été incluses dont 16 cas de diagnostic et 9 cas de suivi cytogénétique.

5.1 Données sociodémographiques :

5.1.1 Sexe :

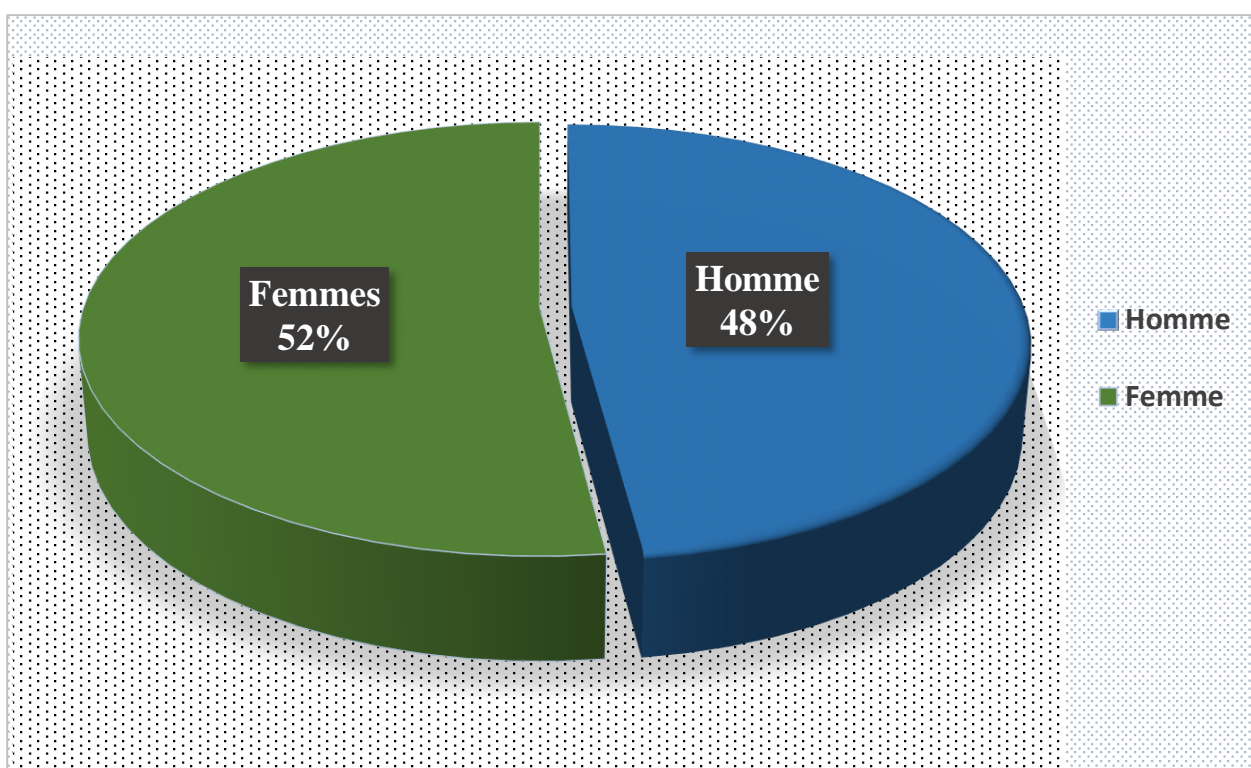


Figure 12: Répartition des patients en fonction du sexe

Sur les 25 patients enregistrés, 13 étaient des femmes et 12 des hommes, soit un sex-ratio de 1,08 en faveur des femmes.

5.1.2 Age :

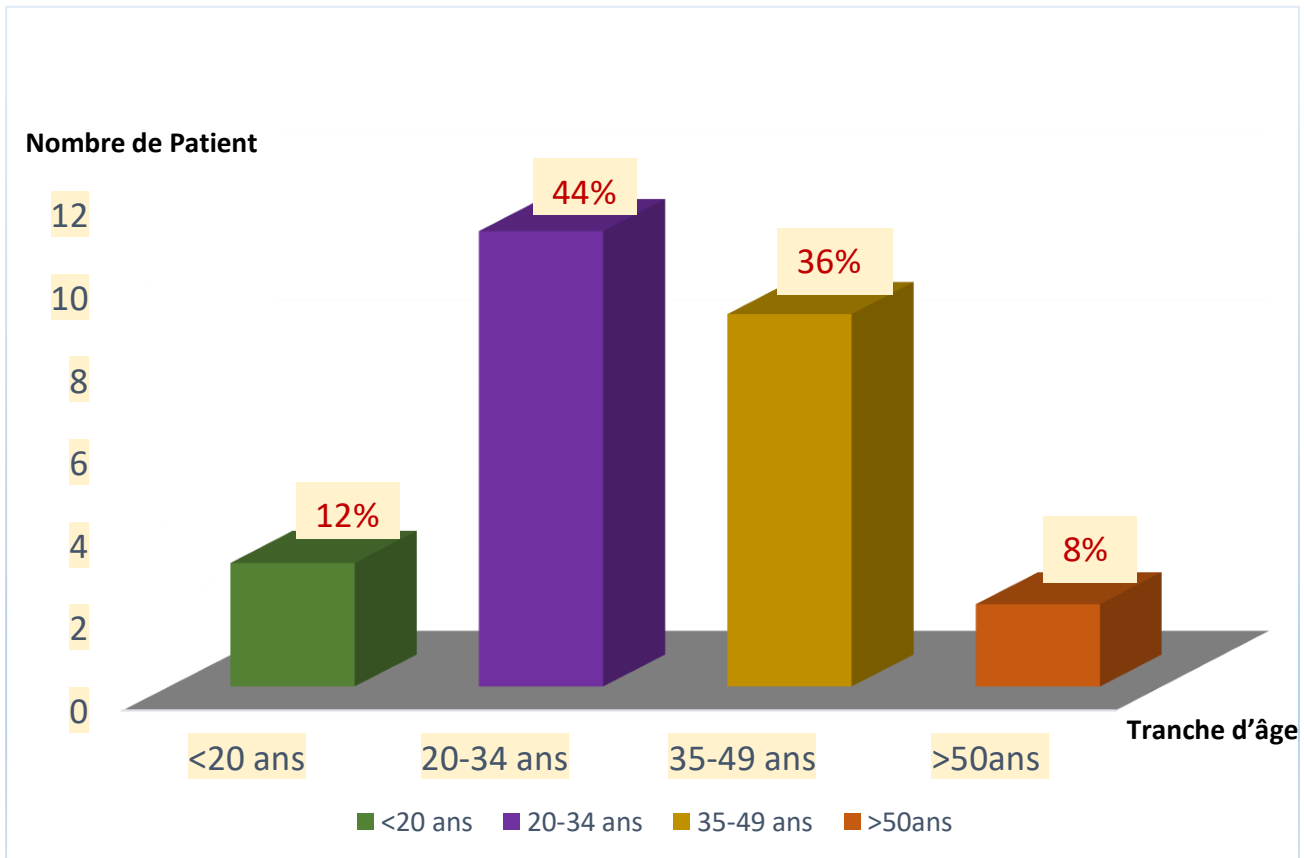


Figure 13: Répartition des patients selon l'âge

L'âge moyen de notre cohorte était de 33,48 ans et une médiane d'âge de 33 ans avec des extrêmes de 15 ans et 53 ans.

Nous avons identifié quatre tranches d'âge avec un pic de fréquence dans la tranche allant de 20 à 34 ans, soit 44%.

Tableau VI: Répartition des patients qui sont venus pour le diagnostic selon l'âge

Tranche d'âge (ans)	Effectif	Pourcentage (%)
<20	1	6,25
20-34	3	18,75
35-49	10	62,5
> 50	2	12,5

La tranche d'âge de 35 à 49 ans était largement plus représentée au moment du diagnostic, soit 62,5%. L'âge médian au moment du diagnostic est de 40,5 ans avec des extrêmes de 19 et 53 ans.

5.2 Données cliniques :

5.2.1 Diagnostic :

Tableau VII: Répartition des patients en fonction du motif de consultation

Patient	Diagnostic	Suivi	Total
Homme	9	3	12
Femme	7	6	13
Total	16	9	25

Parmi les 25 patients recrutés pendant la période de l'étude, 16 ont été admis pour diagnostic dont 9 hommes et 7 femmes et 9 cas de suivis dont 3 hommes et 6 femmes.

5.2.2 La Numération Formule sanguin (NFS) :

Tableau VIII: Répartition des patients en suivi en fonction des données de la NFS

	Plage	Effectifs	Pourcentage
Leucocytes	<4	1	11
	4 - 10	6	67
	>10	2	22
Neutrophile	<2.5	3	33,33
	2.5 - 7.5	3	33,33
	>7.5	2	22,22
Basophile	NR	1	11,11
	<1	7	78
	>1	1	11
Plaquette	NR	1	11
	<150	3	33,33
	150 - 450	4	44,44
	>450	2	22,22
Total		9	100

NR : Non Rapporté.

Pour les patients qui ont consulté pour le suivi du traitement, 67% avaient un taux de leucocytes dans la fourchette normale, soit les deux tiers de l'ensemble de l'effectif.

Tableau IX: Répartition des données de la NFS des patients qui sont venus pour le diagnostic

	Plage	Effectifs	Pourcentage
Leucocytes (10³/mm³)	<4	1	6,25
	4 - 10	1	6,25
	>10	11	68,75
	NR	3	18,75
Neutrophiles (10³/mm³)	<2.5	2	12,5
	2.5 - 7.5	1	6,25
	>7.5	10	62,5
	NR	3	18,75
Basophiles (10³/mm³)	<1	7	43,75
	>1	6	37,5
	NR	3	18,75
Plaquettes (10³/mm³)	<150	3	18,75
	150 - 450	7	43,75
	>450	2	12,5
	NR	4	25
Total		16	100

NR : Non Rapporté

L'hyperleucocytose a été l'anomalie cytologique la plus observée chez nos patients, soit 69% de l'effectif, au moment du diagnostic.

Les cas d'hyper-neutrophilies ont représenté 62,5% soit 10 sur 16 de l'effectif avec des extrêmes de 58,100 à 579,240/mm³ et les cas d'hyperbasophilie de 43,75% soit 7 patients sur 16 .

Il faut noter que parmi les 16 patients, huit, soit 50% de l'effectif, avaient une hyperleucocytose de plus de 100.000 au moment de l'étude.

5.2.3 Résultats génétiques :

Tableau X : Répartitions des patients en fonction de la réussite de la culture cellulaire

Patient	Diagnostic	Suivi	Total
Metaphase	15	8	23
Sans metaphase	1	1	2

Après la culture cellulaire, les métaphases ont été obtenues chez 23 patients, soit 92% de l'échantillon.

Tableau XI: Répartition des patients en fonction des résultats du test génétique

Nombre de patients	Diagnostic	Suivi	Total
Positif	16	5	21
Partiel*	0	1	1
Négatif	0	3	3

*Patients en rémission cytogénétique partiel ?

Pour les cas de diagnostic, tous les patients ont été testés positifs au réarrangement *BCR-ABL1*, soit 100%.

Pour les cas de suivis, seulement 3 patients sur 9 étaient en rémission cytogénétique complète chez qui nous n'avons pas trouvé de réarrangement *BCR-ABL1* et 1 seul patient sur 6 avaient présenté moins de 35% de réarrangement *BCR-ABL1*.

Tableau XII: Répartition des patients en fonctions des variantes cytogénétiques

<i>Nombre de Patient</i>	<i>Typique</i>	<i>Atypique</i>	<i>Total</i>
<i>Diagnostic</i>	<i>13</i>	<i>3</i>	<i>16</i>
<i>Suivi</i>	<i>6</i>	<i>3</i>	<i>9</i>
<i>Total</i>	<i>19</i>	<i>6</i>	<i>25</i>

Dans notre étude, 3 patients sur 13 pour le diagnostic et 3 sur 9 en thérapies sous Glivec ont présenté des signaux atypiques.

En d'autres termes, les signaux atypiques dans notre série ont représenté 24%, soit un effectif total de 6 patients sur 25.

Tableau XIII: Répartition des patients en fonction des résultats cytogénétiques

Type de signal	Eff	Métaphases	Noyaux
Absence de fusion	3	Pas de t(9;22)	Nuc ish(ABL1X2),(BCRX2) (2R2V)
Signal typique	16	ish t(9;22)(ABL1+,BCR+ ; BCR+, ABL1)	Nuc ish(ABL1X3),(BCRX3),(ABL1 con BCRX2) (3R3V2F)
Signal Atypique1	3	ish t(9;22)(ABL1+,BCR+)	Nuc ish(ABL1X2),(BCRX3),(ABL1 con BCRX1)(2R3V1F)
signal Atypique2	1	Ish t(9;22)(BCR+,ABL1+)	Nuc ish(ABL1X3),(BCRX2),(ABL1 con BCRX1)(3R2V1F)
signal Atypique3	1	ish t(9;22)(ABL1+,BCR+; BCR+,ABL1+;)	Nuc ish(ABL1X4),(BCRX4),(ABL1 con BCRX3)(4R4V3F)
signal Atypique4	1	Ish t(9;22)(ABL1+,BCR+ ; BCR+,ABL1)	Nuc ish(ABL1X3),(BCRX3),(ABL1 con BCRX2) 3R3V2F (ABL1X4),(BCRX3),(ABL1 con BCRX3) (4R3V3F)

R : rouge (signal rouge), V : vert (signal vert), F : fusion (1f : un signal de fusion)

Les signaux atypiques de type 2R3V1F ont représenté la moitié (50%) des signaux atypiques observés au cours de l'étude.

Tableau XIV: Répartition des patients qui sont venus pour le diagnostic en fonction des résultats cytogénétiques

Type de signal	eff	Métaphases	Noyaux
Absence de fusion	0	0	0
Signal typique	13	ish t(9;22)(ABL1+,BCR+ ; BCR+, ABL1)	Nuc ish(ABL1X3),(BCRX3),(ABL1 con BCRX2) (3R3V2F)
Signal Atypique 1	1	Ish t(9;22)(BCR+,ABL1+)	Nuc ish(ABL1X3),(BCRX2),(ABL1 con BCRX1)(3R2V1F)
Signal Atypique 2	1	ish t(9;22)(ABL1+,BCR+; BCR+,ABL1+;)	Nuc ish(ABL1X4),(BCRX4),(ABL1 con BCRX3)(4R4V3F)
Signal Atypique 3	1	Ish t(9;22)(ABL1+,BCR+ ; BCR+,ABL1)	Nuc ish(ABL1X3),(BCRX3),(ABL1 con BCRX2) 3R3V2F (ABL1X4),(BCRX3),(ABL1 con BCRX3) (4R3V3F)

Le gène de fusion *BCR-ABL1* était présent chez les 16 patients qui ont consultés pour le diagnostic

Tableau XV: Répartition des patients en suivi en fonction des résultats cytogénétiques

Type de signal	eff	Métaphases	Noyaux
Absence de fusion	3	Pas de t(9;22)	Nuc ish(ABL1X2),(BCRX2) (2R2V)
Signal typique	3	ish t(9;22)(ABL1+,BCR+ ; BCR+, ABL1)	Nuc ish(ABL1X3),(BCRX3),(ABL1 con BCRX2) (3R3V2F)
Signal Atypique 1	2	ish t(9;22)(ABL1+,BCR+)	Nuc ish(ABL1X2),(BCRX3),(ABL1 con BCRX1) (2R3V1F)
Signal Atypique 2	1	Pas de metaphase	Nuc ish(ABL1X2),(BCRX3),(ABL1 con BCRX1) (2R3V1F)

Le signal de fusion était absent chez trois patients qui sont en thérapie sous glivec

Tableau XVI: Profil clinico-biologique des patients présentant des signaux atypiques

Patient	Sexe	Age (ans)	Motif	GB : ($10^3/\mu\text{l}$)	Basophiles	Plaquette	Métaphases	Interphases
P1	F	47	Diag	7,10	0,00	197,00	Ish t(9;22)(ABL1+,BCR+; BCR+, ABL1+)	Nuc ish(ABL1X4), (BCRX4),(ABL1 conBCRX3)
P2	M	36	Diag	80,57	0,26	75,00	Ish t(9;22)(BCR+,ABL1+)	Nuc ish(ABL1X3),(BCRX2), (ABL1 con BCRX1)
P3	F	33	Suivi	7,84	0,16	291,00	Pas de translocation	Nuc ish(ABL1X2),(BCRX3), (ABL1 con BCRX1)
P4	M	31	Suivi	79,31	0,00	95,00	Isht (9;22)(ABL1+,BCR+)	Nuc ish(ABL1X2),(BCRX3), (ABL1 con BCRX1)
P5	F	33	Suivi	NR	NR	NR	ish t(9;22)(ABL1+,BCR+)	Nuc ish(ABL1X2),(BCRX3), (ABL1 con BCRX1)
P6	M	19	Diag	579,24	11.57	NR	Ish t(9;22)(ABL1+,BCR+)	Nuc ish(ABL1X3),(BCRX3), (ABL1 con BCRX2)/ (ABL1X4), (BCRX3),(ABL1 con BCRX2)

P : Patient, NR : non rapporté ; Diag : diagnostic,

Tous les patients en suivi ont présenté le même type de signal atypique, sur les métaphases (**Ish t(9;22)(ABL1+,BCR+)**) et dans le noyaux (**Nuc ish(ABL1X2),(BCRX3), (ABL1 con BCRX1)**), ils avaient approximativement le même âge.

Tableau XVII: Répartition des cas atypiques en fonction de la proportion de différents types cellulaires

Patient		Cellules normales	Cellules typiques	Cellules atypiques
P1	Noyau : 200 (100%)	36 (18%)	-	164 (82%)
	Métaphase : 20 (100%)	0 (0%)		20 (100%)
P2	Noyau : 200 (100%)	8 (4%)	-	196 (96%)
	Métaphase : 20 (100%)	0 (0%)		20 (100%)
P3	Noyau : 200 (100%)	187 (93,5%)	-	13 (6,5%)
	Métaphase : 20 (100%)	20 (100%)		0 (100%)
P4	Noyau : 200 (100%)	8 (4%)	-	196 (96%)
	Métaphase : 20 (100%)	0 (0%)		20 (100%)
P5	Noyau : 200 (100%)	84 (42%)	-	116 (58%)
	Métaphase : 20 (100%)	0 (100%)		20 (100%)
P6	Noyau : 200 (100%)	13 (6,5%)	163 (81,5%)	24 (12%)
	Métaphase : 20 (100%)	0 (0%)	?	?

6 COMMENTAIRES ET DISCUSSION :

Il s'agit d'une étude de recherche, longitudinale, descriptive, qui s'est déroulée sur une période de 10 mois allant du 31 octobre 2018 au 27 août 2019.

Dans notre série, tous les patients ont été référés par un médecin hématologue ou oncologue pour suspicion de LMC ou pour le suivi des cas déjà diagnostiqués.

Au total, nous avons recruté 25 patients dont 16 cas de diagnostic et 9 cas de suivi (**Fig12**).

La technique FISH a été la principale technique de laboratoire utilisée pour tous les patients, qu'ils soient venus pour le diagnostic ou pour le suivi sous traitement.

Tous les patients qui se sont présentés pour le diagnostic ont été révélés positifs au réarrangement *BCR/ABL1*, soit 100% de l'effectif (**Tab XI**).

Nous avons retrouvé que 33,33% des patients sous traitement étaient en rémission cytogénétique complète, 11,11% des patients sous traitement en rémission cytogénétique partielle et plus de la moitié, soit 55,55%, étaient positifs au réarrangement *BCR/ABL1* (**Tab XI**).

Dans la cohorte de notre étude, nous avons retrouvé une légère prédominance féminine avec un sexe ratio de 1,08 (**Fig12**). Ce résultat est différent de celui de la littérature dont le sexe ratio est toujours de prédominance masculine aussi bien en Afrique qu'en Europe ou aux U.S.A (5,8,14–16,61–64). Cette différence pourrait s'expliquer par la petite taille de notre échantillon. Par contre, ce résultat confirme celui des études précédentes réalisées au Mali qui avaient trouvé également que les femmes étaient plus concernées que les hommes aussi bien chez les enfants que chez les adultes (1,2,17).

La tranche d'âge la plus représentée dans notre étude était de 20 à 34 ans (**Fig13**). Ce résultat est également différent de celui qui est rapporté dans la littérature. En Europe l'âge médian au moment du diagnostic est de 60 ans (12), et 65 ans aux U.S.A (8).

Dans notre étude, l'âge médian au moment du diagnostic est de 40,5 ans (**Tab VI**). Ce résultat est similaire à celui rapporté par Koulidiati J. et al au Burkina Faso qui avaient trouvé une médiane d'âge de $38,5 \pm 3,6$ ans (64).

Cependant il faut noter que notre étude est une étude exhaustive qui s'est intéressée plus particulièrement à la corrélation entre le profil clinique et le test génétique des patients avec suspicion de LMC et en suivi, qui se sont présentés au service pour une évaluation. De ce fait, ces résultats doivent faire l'objet d'une enquête épidémiologique plus poussée afin d'établir le profil clinique des patients atteints de leucémie myéloïde chronique au Mali.

Dans notre étude, nous avons observé que 69% des patients avaient une hyperleucocytose au moment du diagnostic (**Tab IX**), et 50% avaient une hyperleucocytose à plus de $100000/\text{mm}^3$. Ce résultat est similaire à celui rapporté par Edjeme et al. (65), qui avaient trouvé que 57,5% des patients avaient une hyperleucocytose oscillant entre 100000 à $200000/\text{mm}^3$. Cette hyperleucocytose a été également rapportée par certains auteurs africains notamment Konan S. en Côte d'Ivoire qui a rapporté que la majorité des patients, soit 45%, avaient une hyperleucocytose comprise entre 100000 et $200000/\text{mm}^3$ (66). Cependant, on note une différence significative avec celui de Camara et al. (67) au Mali, et de S F .S. D. N'Diaye ; S. Fall (68) au Sénégal qui avaient, respectivement, trouvé que 87,5% et 92% des patients avaient une hyperleucocytose à plus de $100000/\text{mm}^3$. Cette différence pourrait s'expliquer par la petite taille de notre échantillon mais également le fait que beaucoup de nos patients étaient déjà sous traitement avec hydroxyurée.

Après la culture cellulaire, nous avons obtenu des métaphases chez 23 patients soit 92% de l'échantillon (**Tab X**). Nous avons analysé pour chaque échantillon 20 métaphases et 200 noyaux interphasiques,

Dans les noyaux interphasiques, la translocation t(9;22) a été mise en évidence spécifiquement par l'utilisation d'une sonde fluorescente bicolore spécifiques aux loci des gènes l'*ABL1* (fluorescence rouge) et *BCR* (fluorescence verte).

Dans les noyaux ne présentant pas de translocation t(9;22), le patron de signaux est composé de deux signaux rouges et deux signaux verts (2R2G) répartis de façon aléatoire dans les noyaux. Dans le cas d'une translocation t(9;22), un signal vert est co-localisé avec un signal rouge (signal de fusion), alors que les autres signaux restent répartis de manière aléatoire.

Dans le groupe des patients en suivi, le signal de fusion était absent chez 1/3 (soit 3 patients sur 9) des patients (témoigne d'une réponse cytogénétique complet), les signaux typiques étaient présents chez 3 des 9 patients, et les 3 autres des patients des signaux atypiques. L'absence de signal de fusion est le témoin d'une réponse cytogénétique complet.

Les signaux atypiques étaient de même type (**2R3V1F**) soit un signal rouge libre, 2 signaux verts libres et un signal rouge co-localisé avec un signal vert (signal de fusion) (Figure 14).

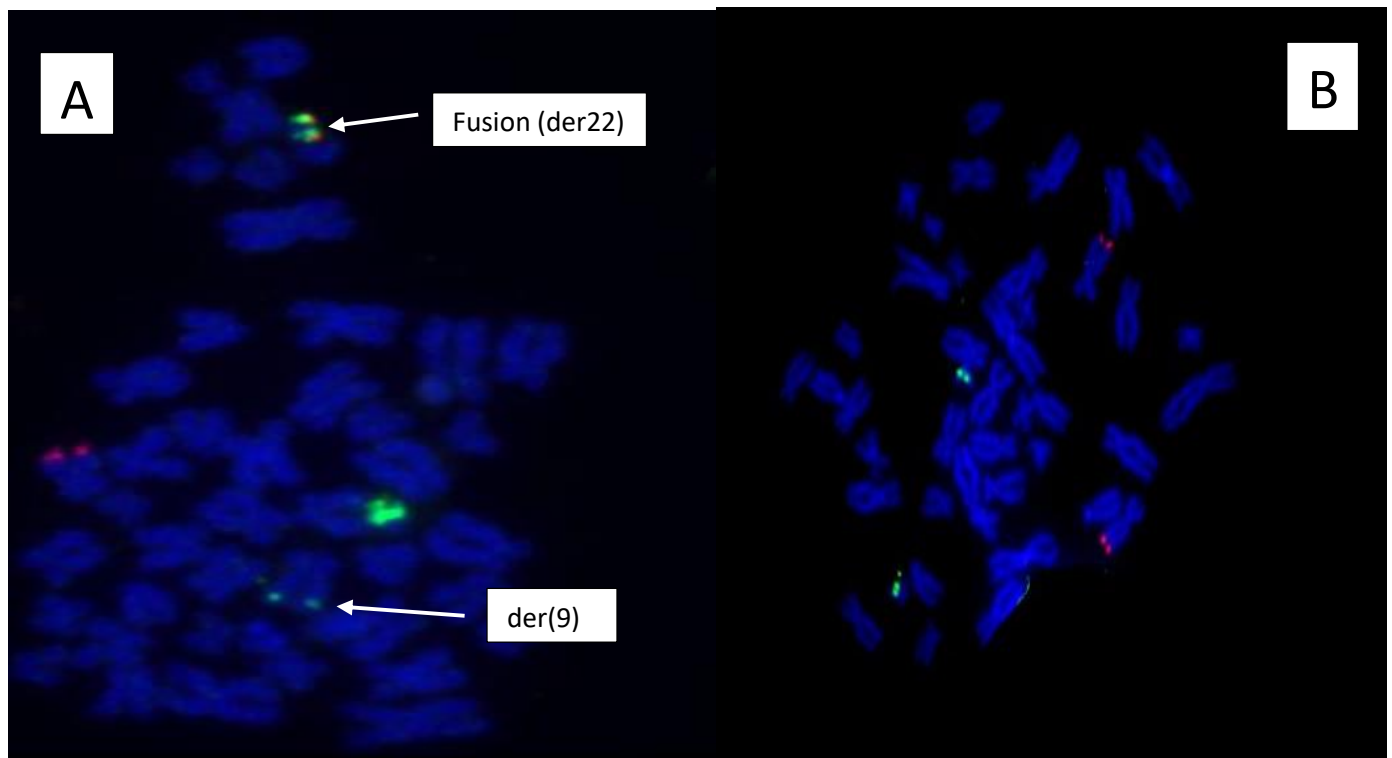


Figure 14 : Représentation du signal atypique (2R3V1F)

A : types de signaux rencontrés dans la métaphase des 2 patients (P4 et P5),

B : Absence de signal de fusion à la métaphase du patient P3

Le signal de fusion est localisé sur le dérivé du chromosome 22 der(22) et on note l'absence de signal rouge sur le dérivé du chromosome 9 normalement présent sur ce chromosome.

L'absence de signal rouge sur le dérivé 9 indique une délétion de l'ensemble des parties couvertes par la sonde sur le gène *ABL1*.

Il faut noter que pour la patiente (P3) (**Tab XVI et XVII**) toutes les métaphases analysées étaient normales (Figure 14B) et donc la localisation du signal de fusion sur un chromosome spécifique était impossible.

Pour le patient (P4), il a consulté pour le suivi cytogénétique dans un tableau d'hyperleucocytose à $79,31.10^3/\text{mm}^3$ (**Tab XVI et XVII**) alors qu'il était déjà sous traitement (Imatinib mesylat) depuis environ 5 ans chez qui nous avons retrouvé ce variant cytogénétique dans 96% de noyaux et 100% des métaphases analysées. Une

année plus tard le patient a été réévalué alors qu'il était sous dasatinib. Le nombre de leucocytes était normal ($8,9.10^3/\text{mm}^3$) et le résultat cytogénétique est en cours.

Ce cas nous laisse supposer que ce type de signal atypique (ou variant cytogénétique) résiste au traitement avec l'IM.

Cette supposition est confortée par le fait qu'aucun des patients chez qui nous avons observé ce type de signal atypique, n'est en rémission cytogénétique complète après une année de traitement par l'IM.

Un cas similaire avait été rapporté par Dewald G et al (69) dans une enquête multicentrique qui impliquait 28 laboratoires avec la sonde D-FISH probe BCR/ABL1, sur une population de patients atteints de leucémie myéloïde chronique.

Ils avaient rapporté que trois types de signaux atypiques peuvent être observés, lorsque le chromosome Ph est une dérivative de la translocation $t(9,22)(q34,q11.2)$.

Ils ont conclu que ces types de signaux sont apparemment le résultat d'une délétion submicroscopique des sites d'hybridation de *BCR* ou *ABL1* ou des deux sur le chromosome 9 anormal. La différence avec notre étude est que les aspects cliniques n'ont pas été spécifiés.

Ces signaux atypiques sont probablement liés à la présence de nouveaux variants qui nécessitent plus d'explorations. Et généralement, la présence de variants cytogénétiques entraînent une résistance au traitement et modifient l'évolution de la maladie vers la phase accélérée ou blastique.

Toutefois, des cas similaires de l'évolution particulière des variants cytogénétiques ont été rapportés dans la littérature et seraient susceptibles d'être liés à des facteurs environnementaux (70,71).

Parmi les cas de diagnostic, nous avons observé le signal de fusion chez tous les patients, soit 100% de l'effectif, et les signaux atypiques ont représenté 18,75%, soit 3 patients sur 16.

Pour le Premier cas (P1), c'était une femme de 47 ans qui était déjà sous hydroxyurée chez qui nous avons détecté la présence de deux chromosomes Philadelphie (4R4V3F) dans 82% de noyaux en interphase, traduisant une duplication du chromosome 22 transloqué. La présence de deux chromosomes philadelphie est généralement la conséquence d'un retard de prise en charge (73).

Le second cas sera plus détaillé en bas.

Le troisième cas (P6) était une variante complexe de forme mosaïque impliquant des cellules normales (6,5%), des cellules avec des signaux typiques (81,5%) et des cellules avec des signaux atypiques (12%) (Figure15).

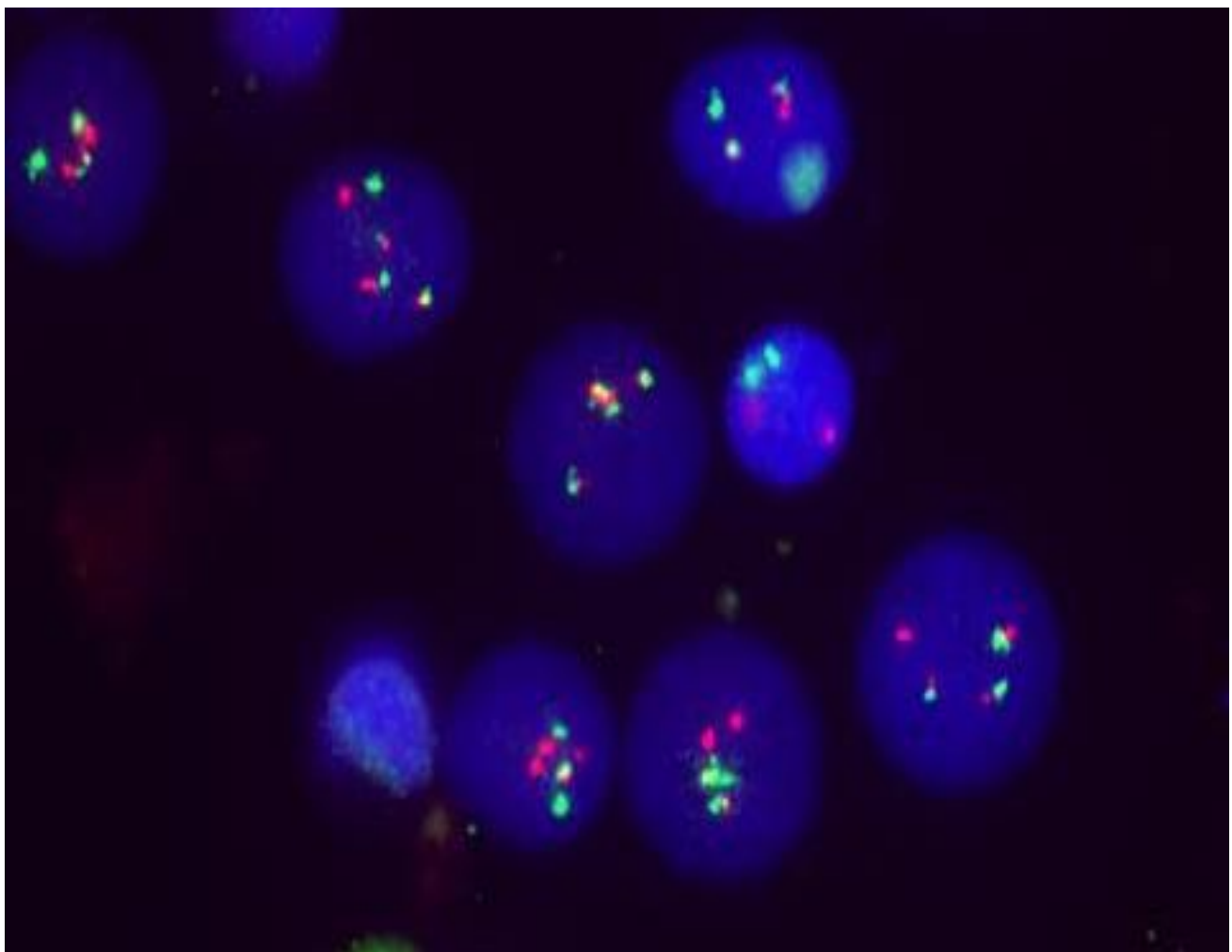


Figure 15: Présentation des noyaux interphasiques du variant complexe du patient(P6)

Malgré un pourcentage bas des cellules présentant des signaux atypiques par rapport aux signaux typiques de translocation, la présence de variants complexes constitue un facteur de mauvais pronostic associé à un risque élevé de transformation blastique.

Les cas de LMC à double chromosome Philadelphie sont rares. Néanmoins, quelques cas similaires ont été rapportés par Vinhas et al. (73) qui ont observé chez un patient résistant au traitement avec l'imatinib, la présence d'un double chromosome Philadelphie avec des isoformes P210 et P195 impliquant des points de cassures différent sur le gène *BCR*. Au Brésil, Otero et al. (74) ont également observé dans leurs échantillons la présence d'un double chromosome Philadelphie chez des patients qui ne répondent pas au traitement avec Imatinib.

Le second cas était celui d'un patient de 36 ans qui a consulté dans une clinique privée pour douleur au niveau des genoux chez qui l'examen physique n'a pas trouvé de particularité à part la présence de signe inflammatoire au niveau des genoux, l'échographie abdominale a retrouvé une hépatosplénomégalie homogène modérée mais la radiographie thoracique était normale. Les bilans biologiques, notamment la NFS, est revenue avec 252000/mm³ de leucocyte soit 89% de PNN, un taux d'Hb à 10,7g/dl, et une thrombopénie à 119000/l; au myélogramme la moelle était très riche, hypergranuleuse sans excès de blastes.

Le diagnostic de LMC a été évoqué et le patient a été mis sous traitement à base d'hydrocortisone (1g/jr) et d'antalgique.

Le résultat de son examen génétique a mis en évidence la présence du gène de fusion *BCR/ABL1* sur 100% des mitoses examinées et dans 96% des noyaux en interphase. Le signal atypique était de type **3R2V1F**.

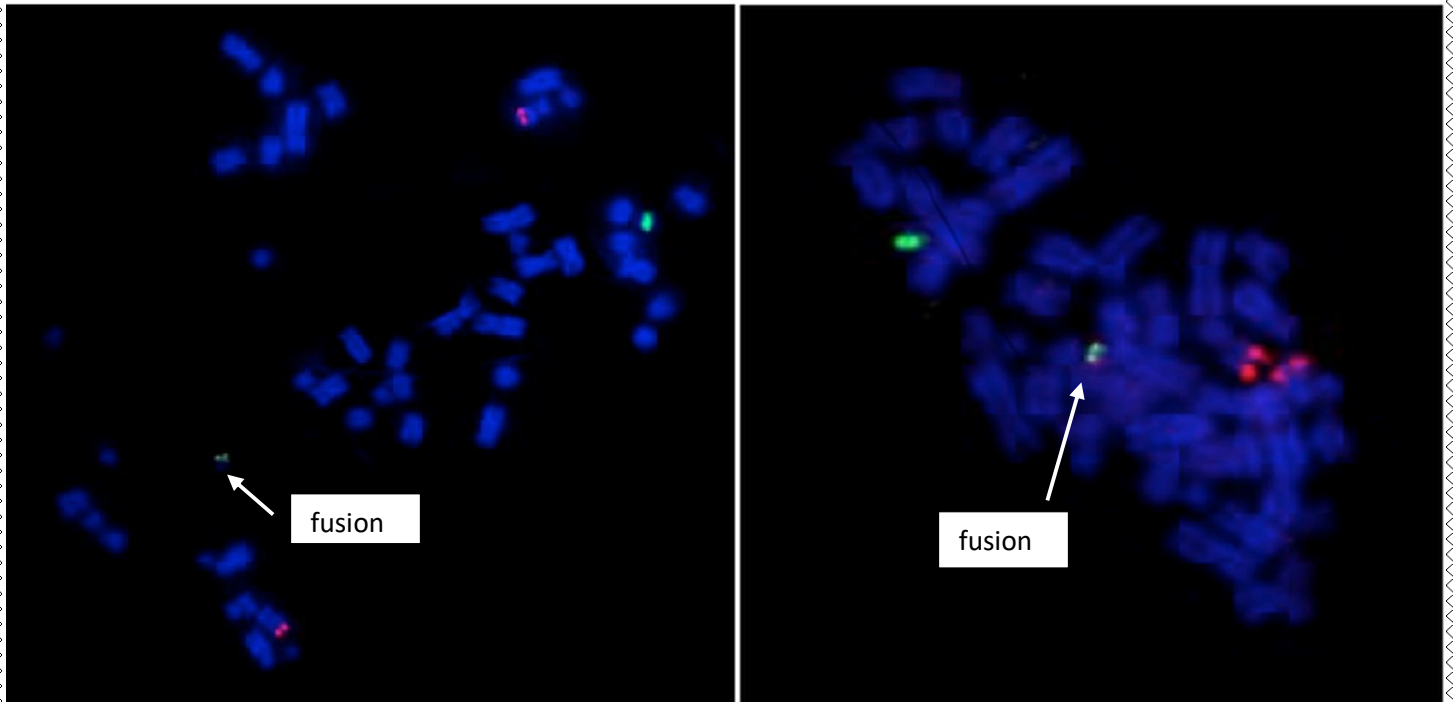


Figure 16: Métaphase montrant les différents signaux observés chez le patient

Mis sous traitement à base d'imatinib en raison de 400mg/jr en deux mois, une rémission hématologique complète a été obtenue. Un mois plus tard le patient a fait une autre hyperleucocytose à $50\,560/\text{mm}^3$, sans anémie, sans thrombocytose, la posologie du traitement a été modifiée et un autre examen cytogénétique a été demandé à la recherche de mutation T315I. Le patient est décédé avant les résultats de l'examen.

Cependant, le variant cytogénétique observé chez le patient peut s'agir d'une forme agressive de mutation dans la LMC. Dewald et al. ont rapporté un cas semblable de signal atypique dans les noyaux (75), et ils ont conclu par le caryotype à une translocation complexe $46,XY,t(9;22;19)(q34;q11.2;q13.3)$ impliquant le chromosome 19. Il faut noter qu'ils n'ont pas rapporté les caractéristiques cliniques et hématologiques.

Les cas de signaux atypiques sont rares et concernent environ 5% des LMC. Cependant, les études de corrélation entre les signaux atypiques sur D-FISH et le profil clinique des patients sont encore assez rares. Dans notre étude, les signaux atypiques ont représenté

24% des patients, ce qui nécessite une enquête plus poussée afin d'établir le profil évolutif des caractéristiques génétiques de ses patients sous thérapie.

7 CONCLUSION :

Cette étude de validation, qui fait suite à une première étude sur la mise au point de la technique FISH au Mali, a concerné 25 patients dont 9 cas de suivi et 16 cas de diagnostic, tous référés par un médecin hématologue ou oncologue pour évaluation cytogénétique.

Au terme de l'étude nous avons établi le diagnostic cytogénétique des patients, évalué la réponse cytogénétique des patients sous traitements et identifié des variants cytogénétiques.

Nos résultats ont montré une similarité sur plusieurs points avec ceux précédemment rapportés dans la littérature tels que l'âge, le sexe entre autres. Cependant, la fréquence plus élevée de variants cytogénétiques par rapport à la littérature nécessiterait la réalisation d'une investigation plus poussée pour déterminer l'origine ou le facteur prédisposant.

Ainsi, nous pouvons dire que la technique FISH est une avancée technologique significative dans le diagnostic et la surveillance du traitement de la LMC au Mali. La FISH peut détecter plusieurs variants résultant de la translocation t(9 ;22), ce qui permettrait de prédire une résistance primaire ou secondaire chez les patients.

Enfin, notre étude a permis de valider la technique FISH pour le diagnostic et le suivi thérapeutique des patients atteints de LMC et mettre en évidence des variants génétiques impliquant la translocation t(9 ;22).

8 RECOMMANDATIONS :

Au terme de cette étude, nous formulerons les recommandations suivantes :

Aux autorités sanitaires et politiques :

- Faciliter l'accessibilité des médicaments et réduire le coût de la prise en charge.
- Renforcer les capacités des laboratoires d'analyse médicale en général et ceux de la génétique en particulier.
- Renforcer l'enseignement de la génétique dans l'optique de décentraliser les structures de diagnostic et de prise en charge de la LMC.
- Renforcer la communication et la sensibilisation sur les hémopathies malignes.

Aux personnels de santé :

- Penser à une hémopathie maligne devant toute splénomégalie.
- Intégrer systématiquement l'hémogramme dans le bilan de santé.
- Référer toute suspicion de LCM dans un service hématologie ou oncologie.
- Penser au bilan génétique devant tout cas suspect de LCM.
- Faciliter la communication avec les patients pour une meilleure prise en charge.

A la population :

- Faire un bilan périodique de santé comportant obligatoirement un hémogramme.
- Consulter tôt un centre de santé dès l'apparition des premiers signes fonctionnels afin de diagnostiquer le plutôt que possible.
- Soutenir moralement et psychologiquement les patients atteints de LMC.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

1. Diallo DA, Cissoko LS, Cissoko Y, Diallo Y, Baby M, Mouhaha J, et al. Epidémiologie actuelle des hémopathies malignes dans les services d'hématologie oncologie médicale et de médecine interne de l'hôpital du Point G, Bamako, Mali. Mali Méd. 2005;20(4):8.
2. SIDIBÉ LN, DIALLO DA. Caractéristiques épidémiologiques des hémopathies malignes dans les services d'hématologie-oncologie médicale et de médecine interne de l'hôpital du Point G [Thèse]. [Bamako]: Université de Bamako; 2005.
3. Gonon-Demoulian R, Goldman J, Nicolini F. History of chronic myeloid leukemia: A paradigm in the treatment of cancer. Bull Cancer (Paris). janv 2014;101(1):56-67.
4. Recommandations pour la prise en charge cytogénétique de la leucémie myéloïde chronique (LMC) établies par le Groupe Français de Cytogénétique Hématologique (GFCH). Pathol Biol. 1 juin 2004;52(5):238-40.
5. Leguay T, Mahon F-X. Leucémie myéloïde chronique. EMC - Hématologie. sept 2005;2(3):187-205.
6. Dine G, Rehn Y, Brahimi S, Ali Ammar N, Gaillard B, Bocq Y, et al. Maladie résiduelle et leucémie myéloïde chronique. Immuno-Anal Biol Spéc. août 2013;28(4):201-6.
7. Chomel J-C. Biologie moléculaire de la leucémie myéloïde chronique : dernières avancées. Rev Francoph Lab. mai 2017;2017(492):33-40.
8. Kantarjian H, Cortes J. Chronic Myeloid Leukemia. 1944-1957 p.
9. An X, Tiwari AK, Sun Y, Ding P-R, Ashby CR, Chen Z-S. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: a review. Leuk Res. oct 2010;34(10):1255-68.
10. Treuil P. La leucémie myéloïde chronique et son traitement par l'imatinib. Actual Pharm. avr 2008;47(473):25-30.
11. Gatta G, van der Zwan JM, Casali PG, Siesling S, Dei Tos AP, Kunkler I, et al. Rare cancers are not so rare: the rare cancer burden in Europe. Eur J Cancer Oxf Engl 1990. nov 2011;47(17):2493-511.
12. Chronic Myeloid Leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines | ESMO [Internet]. [cité 22 déc 2019]. Disponible sur: <https://www.esmo.org/Guidelines/Haematological-Malignancies/Chronic-Myeloid-Leukaemia>
13. Baunin V, Bouyer S. La leucémie myéloïde chronique de l'enfant et de l'adolescent : réarrangements moléculaires BCR-ABL1 au diagnostic [Internet] [Thèse]. Université de Poitiers; 2013 [cité 18 déc 2019]. Disponible sur: <http://petille.univ-poitiers.fr/notice/view/33362>
14. N'DHATZ CE. Prevalence des hemopathies malignes au CHU de Yopougon. Rev int sc méd(2012). 2012;3(14):3:205-208.
15. Horizons-Hemato-Juin-2013-80-82-Ngouadjeu-Dongho-Te.pdf [Internet]. [cité 20 déc 2019]. Disponible sur: <http://horizonshemato.com/wp-content/uploads/2017/10/Horizons-Hemato-Juin-2013-80-82-Ngouadjeu-Dongho-Te.pdf>

16. Mounkaila B, Toure IA, Gragnic G, Mounkaila I. HEMOPATHIES MALIGNES A NIAMEY A PROPOS DE 90 OBSERVATIONS SUR 6 ANS. *Médecine Afr Noire*. 1996;4.
17. Diallo DA, Baby M, Dembélé AK, Diallo YL, N'Drainy L, Cissoko S, et al. Les Hemopathies malignes de l'enfant : Aspects epidemiologiques dans le service d'hematologie oncologie medicale de l'hopitale du Point-G (1996-2003). *Mali Méd*. 2008;28(4):6.
18. Piller G. Leukaemia - a brief historical review from ancient times to 1950. *Br J Haematol*. févr 2001;112(2):282-92.
19. Tefferi A. The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. *Leukemia*. janv 2008;22(1):3-13.
20. Nowell PC. Discovery of the Philadelphia chromosome: a personal perspective. *J Clin Invest*. 1 août 2007;117(8):2033-5.
21. Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell*. janv 1984;36(1):93-9.
22. Hématopoïèse. In: Wikipédia [Internet]. 2019 [cité 20 déc 2019]. Disponible sur: <https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=H%C3%A9matopo%C3%AF%C3%A8se&oldid=162405855>
23. Coulombel L, Vainchenker W. les cellules souches Hematopoiétique. *médecine/sciences*. 1995;11(1):4.
24. Masson E. Hématopoïèse et facteurs de croissance [Internet]. EM-Consulte. [cité 20 déc 2019]. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/785/hematopoesie-et-facteurs-de-croissance>
25. hématopoïèse, vitamines B12, folates, B9, les facteurs de croissance [Internet]. [cité 28 févr 2020]. Disponible sur: <https://www.toutsurlatransfusion.com/transfusion-sanguine/medecine-transfusionnelle/notions-d-hematologie.php>
26. Maëlle M. Les cellules souches hématopoïétiques : définition, origines et principales utilisations thérapeutiques. [Thèse]. [Lorraine]: Université Henri Poincaré - Nancy 1; 2011.
27. Costello R, Bouabdallah R, Sainty D, Gastaut J, Gabert J. La leucémie myéloïde chronique, aspects biologiques. *Rev Médecine Interne*. 1 mars 1996;17(3):213-23.
28. IMGT Web resources: IMGT Education [Internet]. [cité 18 déc 2019]. Disponible sur: http://www.imgt.org/IMGTEducation/Tutorials/Cancer/_FR/Oncogene/translocation.html
29. Gendron N, Belhouachi N, Morel V, Azgui Z, Maloum K, Nguyen-Khac F, et al. Chronic myeloid leukemia with variant e19a2 BCR-ABL1 fusion transcript: interest of the molecular identification at diagnosis for minimal residual disease follow-up. *Ann Biol Clin (Paris)*. mai 2014;72(3):359-66.
30. Melo JV, Deininger MWN. Biology of chronic myelogenous leukemia—signaling pathways of initiation and transformation. *Hematol Oncol Clin North Am*. juin 2004;18(3):545-68.
31. Masson E. Leucémie myéloïde chronique [Internet]. EM-Consulte. [cité 18 déc 2019]. Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/article/899935/leucemie-myeloide-chronique>
32. Masrar A, Agoumi NB. Mecanisme moleculaire de leucemie myeloide chronique. *Maroc Méd*. 2004;5.

33. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, Kantarjian HM. Chronic Myelogenous Leukemia: Biology and Therapy. *Ann Intern Med.* 3 août 1999;131(3):207.
34. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The Biology of Chronic Myeloid Leukemia. Epstein FH, éditeur. *N Engl J Med.* 15 juill 1999;341(3):164-72.
35. (PDF) Signaling Networks Associated with BCR–ABL–Dependent Transformation [Internet]. ResearchGate. [cité 26 févr 2020]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/publication/24248982_Signaling_Networks_Associated_with_BCR-ABL-Dependent_Transformation
36. McWhirter JR, Wang JY. An actin-binding function contributes to transformation by the Bcr-Abl oncoprotein of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *EMBO J.* avr 1993;12(4):1533-46.
37. Cortes J. Natural history and staging of chronic myelogenous leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am.* juin 2004;18(3):569-84.
38. Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers [Internet]. [cité 19 déc 2019]. Disponible sur: <http://www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/64-enseignement-de-lhematologie-cellulaire-les-principales-maladies-hematologiques/classification-oms-2016-des-maladies-hematologiques-malignes/114-classification-oms-des-syndromes-myeloproliferatifs-et-pathologies-myeloides-lymphoides-avec-eosinophilie>
39. Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers [Internet]. [cité 19 déc 2019]. Disponible sur: <http://www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/60-enseignement-de-lhematologie-cellulaire-les-principales-maladies-hematologiques/pathologie-granulocytaire-syndromes-myeloproliferatifs/105-leucemie-myeloide-chronique>
40. Thompson PA, Kantarjian HM, Cortes JE. Diagnosis and Treatment of Chronic Myeloid Leukemia in 2015. *Mayo Clin Proc.* oct 2015;90(10):1440-54.
41. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 19 mai 2016;127(20):2391-405.
42. Eclache V, Lejeune F. Détection du chromosome Philadelphie chez les patients atteints de leucémie myéloïde chronique : Places respectives de la cytogénétique de l'hybridation in situ en fluorescence et de l'analyse moléculaire par RT-PCR. *Rev Francaise Lab.* 26 nov 2008;2002(339):27-31.
43. Bardin C. Leucémies chroniques Traitement de la leucémie myéloïde chronique. 1^{re} éd. Elsevier Masson; 2016. 344 p. (Pharmacie clinique pratique en oncologie).
44. Roche-Lestienne C, Boudry-Labis E, Mozziconacci M-J. Cytogenetics in the management of "chronic myeloid leukemia": an update by the Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH). *Ann Biol Clin (Paris).* sept 2016;74(5):511-5.
45. Mahon FX. Leucémie myéloïde chronique. *Corresp En Onco-Hématologie.* 2012;7(4):208-2011.
46. Bories D, Devergie A, Gardembas-Pain M, Kuentz M, Legros L, Mahon F-X, et al. Stratégies thérapeutiques et recommandations pour la prise en charge des patients atteints de leucémie myéloïde chronique. *Hématologie.* 1 nov 2003;9(6):497-512.

47. filmc [Internet]. [cité 19 déc 2019]. Disponible sur: <http://www.lmc-cml.org/fr/pag13-Signes-biologiques-et-bilans.html>
48. Aissaoui Z, Lai J, Fenaux P, Kerckaert JP. Leucemie Myeloide Chronique : de la cytogénétique à la biologie moléculaire. 1990;5.
49. Brandt L. Environmental factors and leukaemia. *Med Oncol Tumor Pharmacother.* 1985;2(1):7-10.
50. Lamm SH, Engel A, Joshi KP, Byrd DM, Chen R. Chronic myelogenous leukemia and benzene exposure: a systematic review and meta-analysis of the case-control literature. *Chem Biol Interact.* 10 déc 2009;182(2-3):93-7.
51. Demarquet M, Labussière-Wallet H, Nicolas-Virelizier E, Nicolini F-E. A therapeutic improvement: second generation tyrosine kinase inhibitors (TKI 2) in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Bull Cancer (Paris).* août 2011;98(8):859-66.
52. Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, Tura S, Gomez GA, Robertson JE, et al. Prognostic discrimination in « good-risk » chronic granulocytic leukemia. *Blood.* avr 1984;63(4):789-99.
53. Queißer W, Hartung G, Ansari H, Hehlmann R. Prognostic Relevance of Peripheral Blood Counts and Bone Marrow Cytology in Chronic Myeloid Leukemia (CML). *Oncol Res Treat.* 1992;15(6):480-9.
54. Hasford J, Pffirrmann M, Hehlmann R, Allan NC, Baccarani M, Kluin-Nelemans JC, et al. A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. *J Natl Cancer Inst.* 3 juin 1998;90(11):850-8.
55. Joha S, Preudhomme C. Mécanismes de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase sur le modèle de leucémie myéloïde chronique [Thèse]. [France-Lille]: UNIVERSITÉ DU DROIT ET DE LA SANTÉ-LILLE 2; 2010.
56. Herlet S. Les inhibiteurs de tyrosine kinase dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique chez l'adulte: Du Glivec® aux traitements de deuxième génération. Conséquence de la sortie de la réserve hospitalière pour le pharmacien d'officine. [Thèse]. [France-Lorraine]: UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY 1; 2010.
57. Kaleem B, Shahab S, Ahmed N, Shamsi TS. Chronic Myeloid Leukemia - Prognostic Value of Mutations. *Asian Pac J Cancer Prev.* 3 déc 2015;16(17):7415-23.
58. Liehr T, éditeur. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH): Application Guide [Internet]. 2^e éd. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2017 [cité 12 janv 2020]. (Springer Protocols Handbooks). Disponible sur: <https://www.springer.com/gp/book/9783662529577>
59. The AGT Cytogenetics Laboratory Manual, 4th Edition | Wiley [Internet]. Wiley.com. [cité 12 janv 2020]. Disponible sur: <https://www.wiley.com/en-us/The+AGT+Cytogenetics+Laboratory+Manual%2C+4th+Edition-p-9781119061229>
60. Akard LP, Cortes JE, Albitar M, Goldberg SL, Warsi G, Wetzler M, et al. Correlations between cytogenetic and molecular monitoring among patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase: post hoc analyses of the Rationale and Insight for Gleevec High-Dose Therapy study. *Arch Pathol Lab Med.* sept 2014;138(9):1186-92.

61. Benaouda A. Approches épidémiologiques de la leucémie myéloïde chronique à Tlemcen [Internet] [Thesis]. [Algerie-Tlemcen]: UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAÏD -TLEMCCEN; 2015 [cité 22 déc 2019]. Disponible sur: <http://dspace.univ-tlemcen.dz/handle/112/7475>
62. Segbena AY, Kueviakoe IMD, Agbetiafa K, Padaro E, Layibo Y, Dorkenoo A, et al. Chronic myeloid leukemia and imatinib: Experience at the Lome Campus teaching hospital (Togo). *Médecine Santé Trop.* juill 2012;22(3):307-11.
63. Maynadié M. Épidémiologie des syndromes myéloprolifératifs chroniques. *Rev Francoph Lab.* 1 mai 2017;2017(492):29-32.
64. Koulidiati J. HEMOPATHIES MALIGNES DE L'ADULTE A OUAGADOUGOU. *Rev Afr Malgache Rech Sci Santé.* 2 mars 2016;3(2):1-7.
65. EDJEME GLW, KOFFI G. LA CLASSIFICATION DE TURA DANS LA LEUCEMIE MYELOIDE CHRONIQUE : IMPACT PRONOSTIQUE [Thèse]. [Mali-Bamako]: Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako; 2007.
66. KONAN KS, SANGARE S. Profil hematologique de la leucemie myeloide chronique du noir africain (A propos de 100 cas coligés aux CHU de Yopougon et de Treichville). Abidjan: Faculté de Medecine; 1998. 126 p.
67. CAMARA GD, DIALLO DA. LE TRAITEMENT DE LA LEUCEMIE MYELOÏDE CHRONIQUE PAR L'IMATINIB MESYLATE «GLIVEC». A PROPOS DE 16 CAS OBSERVES DANS LE SERVICE D'HEMATOLOGIE-ONCOLOGIE MEDICALE DU CHU DU POINT G DU 1ER JANVIER 2005 AU 31 DECEMBRE 2008 [Thèse]. [Mali-Bamako]: Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako; 2001.
68. Fall S, Ndiaye FSD, Dior OD, Sall AF, Sloma I, Touré-Fall A, et al. Leucémie myéloïde chronique des sujets jeunes : expérience dans une unité d'hématologie clinique au Sénégal. *Rev Oncol Hématologie Pédiatrique.* 1 déc 2015;3(4):170-4.
69. Dewald G, Stallard R, Alsaadi A, Arnold S, Blough R, Ceperich TM, et al. A multicenter investigation with D-FISH BCR/ABL1 probes. *Cancer Genet Cytogenet.* 15 janv 2000;116(2):97-104.
70. De Braekeleer M. Variant Philadelphia translocations in chronic myeloid leukemia. *Cytogenet Cell Genet.* 1987;44(4):215-22.
71. Sawadogo S, Hien FM, Béogo R, Toguyeni A, Ouédraogo GA. Evolution particulière de variants cytogénétiques complexes de leucémies myéloïdes chroniques traitées par l'Imatinib. *Pan Afr Med J.* 11 août 2013;15(132):1-4.
72. Silué DA, Kouakou B, Nanho CD, Kamara I, Djoko S, Sowhe T, et al. Caractéristiques préthérapeutiques et évolutives des patients atteints de la leucémie myéloïde chronique à Abidjan Côte d'Ivoire. *Bull Cancer (Paris).* 1 juin 2019;106(6):550-9.
73. Vinhas R, Lourenço A, Santos S, Ribeiro P, Silva M, Sousa AB de, et al. A double Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia patient, co-expressing P210BCR-ABL1 and P195BCR-ABL1 isoforms. *Haematologica.* 1 nov 2018;103(11):e549-52.
74. Otero L, Ornellas MH, Dobbin J, de Souza Fernandez T. Double Philadelphia-chromosome: a resistance factor on the imatinib mesylate therapy for chronic myeloid leukemia. *Int J Lab Hematol.* août 2008;30(4):346-8.

75. Dewald GW, Wyatt WA, Juneau AL, Carlson RO, Zinsmeister AR, Jalal SM, et al. Highly Sensitive Fluorescence In Situ Hybridization Method to Detect Double BCR/ABL Fusion and Monitor Response to Therapy in Chronic Myeloid Leukemia. *Blood*. 1 mai 1998;91(9):3357-65.

ANNEXE 1 :

1. Titre: Protocole standard de mise en culture cellulaire de cellules sanguines cancéreuses

2. Objectifs et domaine d'application:

Ce protocole a essentiellement pour but de permettre à toute personne de comprendre et de réaliser facilement et sans intervention d'une tierce personne, la mise en culture dans notre laboratoire. Ce protocole s'applique seulement pour la mise en culture de cellules sanguines non cancéreuses et s'adresse aux personnes ayant eu un minimum de requis en Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL) pour travailler dans le laboratoire.

3. Principe:

La culture cellulaire est un ensemble de procédures permettant aux cellules de croître hors de leur environnement naturel. Cela nécessite la présence dans le nouveau milieu des conditions de température (37°C) et de Ph (7,4) optimales, des substances nutritives nécessaires à la multiplication et à la croissance des cellules (les ions minéraux, les acides aminés, le glucose, le sérum de veau fœtal...), mais aussi des antibiotiques (pénicilline G, streptomycine, amphotéricine B) pour limiter la contamination et la mort accélérée des cellules.

4. Responsabilité:

Il incombe au responsable du laboratoire d'assurer la formation du personnel qui exécutera cette procédure. Il incombe au personnel de laboratoire qui utilise cette procédure de lire, de comprendre, de recevoir une formation et de convenir de suivre la procédure décrite dans ce protocole.

5. Définitions et abréviations :

Marrow Max ou Bone Marrow Medium : milieu de culture à utiliser (se référer au protocole de préparation de Marrow Max)

Flasque : falcon multi flaques

T15 : tube de 15 millilitres

T50 : tube de 50 millilitres

VIDE : éthanol diluée à 10%, soit à 50%

ml: millilitre

µl: microlitre

6. Exigences relatives aux échantillons:

Au moins 3ml de sang périphérique dans un tube hépariné à température pièce pendant sans dépasser un délai de 24 heures avant la mise en culture.

7. Contrôle de qualité : ?

8. Réactifs et produits chimiques:

Produit	Emplacement	Condition de stockage
Marrow Max (T15 ET T50)	Dans le congélateur	Entre 2°C et 8°C

9. Instruments and équipements:

Matériels	Emplacements
Flasques (Flacons de cultures)	Dans le carton sous la paille qui fait face à la porte
Pipettes pasteur	Dans le carton sous la paille qui fait face à la porte
Pipettes (P1000ml)	A côté de la hotte à droite
Embouts de 1000ml	A côté de la hotte à droite
Étuve	Sur la paille de droite
Hotte	Sur la paille de gauche
Vide	A préparer et le mettre dans la hotte

10. Procédure:

Étape 1 : s'assurer que les échantillons sont identifiés, sinon les identifier et les enregistrer dans la base des données.

Étape 2 : s'assurer que la hotte est propre, sinon laver la hotte comme indiqué dans la procédure de lavage de la hotte préétabli.

Étape 3 : mettez le Marrow Max dans l'étuve à 37°C pendant 1 heure et puis passe au step4 avant le délai.

NB : la quantité de tube choisit dépend du nombre d'échantillon à mettre en culture (chaque échantillon pour 5ml de Marrow Max).

Étape 4 : mettez seulement les matériels nécessaires dans la hotte, à savoir : le nombre de pipettes pasteur qu'il faut, le paquet d'embouts de 1000ml, la pipette de 1000ml, le vide, les flasques identifiés ; qui sont préalablement nettoyés à l'éthanol 70%.

NB : Pour chaque échantillon une pipette pasteur.

Étape 5 : après le délai de 1 heure écoulé, enlevez le Marrow Max dans l'étuve et le mettre dans la hotte.

Étape 6 : mettez 5ml de Marrow Max dans le flasque ensuite ajoutez 500 µl dans moelle ou de sang périphérique dans le flasque sur le milieu de culture.

Étape 7 : homogénéisez doucement le mélange dans le flasque de façon horizontale, puis desserrez un peu la fermeture du flasque et mettez-le dans l'étuve 24 heures, et passez chaque jour pour l'homogénéiser si possible 12 à 18 heures après la mise en culture.

NB : le Flasque doit être légèrement incliné dans l'incubateur.

11.Sécurité et précautions:

Porter une blouse blanche à manche longue, des gants et aussi des lunettes et une bavette lors de la manipulation du sang et du milieu de culture.

12.Documentés reliés:

Protocole standard de préparation du RPMI.

Protocole de Lavage de la Hotte

13.References:

14.Historique de la révision: Création du document

ANNEXE 2 :

1. Titre : Protocole standard de récolte cellulaire de cellules sanguines cancéreuses

2. Objectif et domaine d'application:

Ce protocole a essentiellement pour but de permettre à toute personne de comprendre et de réaliser facilement et sans l'intervention d'une tierce personne, la récolte cellulaire dans notre laboratoire. Ce protocole s'applique seulement pour la récolte cellulaire de cellules sanguines cancéreuses et s'adresse aux personnes ayant eu un minimum de requis en Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL) pour travailler dans le laboratoire.

3. Principe:

La récolte cellulaire est un ensemble de procédures permettant d'extraire les cellules dans la semence après culture *in vitro* et tout en gardant sa structure, sa fonction pouvant être arrêtée.

4. Responsabilité:

Il incombe au responsable du laboratoire d'assurer la formation du personnel qui exécutera cette procédure. Il incombe au personnel de laboratoire qui utilise cette procédure de lire, de comprendre, de recevoir une formation et de convenir de suivre la procédure décrite dans ce protocole.

5. Définitions et abréviations :

Bromure: Bromure d'éthidium

Colcemid: colchicine

Fixateur: mélange méthanol (3/4) et acide acétique glaciale (1/4).

KCL: chlorure de potassium dilué à 0,56%

Flasque: flacon multi flaque

T15: tube de 15 millilitres

T50: tube de 50 millilitres

VIDE: éthanol diluée à 10% soit à 50%

ml: millilitre

µl: microlitre

mn: minute

6. Exigences relatives aux échantillons :

Au moins 3ml de sang périphérique ou de moelle dans un tube hépariné à température pièce sans dépasser un délai de 24 heures avant la mise en culture.

7. Contrôle de qualité: NA

8. Réactifs et produits chimiques :

Produit	Emplacement	Condition de stockage
Bromure	Sur la paillasse qui fait face à la porte	Endroit frais et sec loin des oxydant
Colcemid	Dans réfrigérateur (3eme étage)	Entre 2 et 8°C
KCl	Sur la paillasse qui fait face à la porte	25°C
Méthanol	Sur la Paillasse a cote du réfrigérateur	25°C
Acide Acétique Glacial	Sur la Paillasse a cote du réfrigérateur	25°C

9. Instruments et équipements:

Matériels	Emplacements
Flasques	Dans le carton sous la paillasse qui fait face à la porte
Pipettes pasteur	Dans le carton sous la paillasse qui fait face à la porte
Pipettes (P200ml)	A côté de la hotte à droite
Pipettes (P100ml)	A côté de la hotte à droite
Embouts de 200ml	Dans la hotte à droite
Embouts de 100ml	Dans la hotte à droite
Gants	Dans la hotte
Vortex	Sur la paillasse qui fait face à la porte
Centrifugeuse	Sur la paillasse qui fait face à la porte
Étuve	Sur la paillasse qui fait face à la hotte

Vide

A préparer et le mettre dans la hotte

10.Procedure:

Étape 1 : Mettez 25 μ l de bromure sur l'échantillon en culture, puis homogénéiser doucement par des mouvements de rotation, le flasque étant incliné sur sa face ventrale pendant 5 à 10 secondes, puis placez-le dans l'étuve à 37°C pendant 90 mn.

Étape 2 : après ce délai, mettez 25 μ l de colcemid sur l'échantillon, puis homogénéiser doucement par des mouvements de rotation, le flasque étant incliné sur sa face ventrale pendant 5 à 10 secondes puis placez-le dans l'étuve à 37°C pendant 60 mn.

NB : avant la fin de ce délai mettez une quantité suffisante de KCl dans l'étuve à 37°C.

Étape 3 : après ce délai transférez l'échantillon dans le T15, puis centrifugez-le en raison de 25,000tours/mn pendant 10mn.

Étape 4 : après centrifugation, enlevez le surnageant de manière attentionnée sans que le culot ne se décolle et sans toucher le culot à l'aide de la pipette pasteur.

NB : on peut enlever jusqu'à 1ml, et après avoir enlevé le surnageant, décollez le culot.

Aussi, utilisez un pipette pasteur différent pour chaque échantillon.

Étape 5 : mettez 10 ml de KCl à 37°C sur l'échantillon, puis mettez-le dans l'étuve pendant 10 à 15 minutes.

Étape 6 : après ce délai de 10 à 15mn passé, préparez le fixateur et mettez 1ml de fixateur sur l'échantillon, puis centrifugez-le en raison de 25,000tours/mn pendant 10mn.

Étape 7 : après centrifugation, enlevez le surnageant sans décollé ni toucher le culot à l'aide de la pipette pasteur et après avoir enlevé le surnageant décollez le culot.

NB : on peut enlever jusqu'à 1,5ml de surnageant.

Étape 8 : ajoutez 10ml de fixateur goutte par goutte, tout en homogénéisant avec le niveau le plus faible du vortex, de façon attentionnée, ni lentement ni rapidement.

NB : s'il y'a deux tubes ou plus, ajoutez d'abord 5ml de fixateur dans tous les tubes, puis complétez a 10ml de façon à équilibrer le niveau de tous les tubes et par ordre de prise.

Étape 9 : laissez à température pièce pendant 10 minutes et après ce délai, centrifugez-le toujours en raison de 25000 tours/mn pendant 10mn.

Étape 10 : après centrifugation, enlevez le surnageant sans décoller ni toucher le culot, et, après avoir enlevé le surnageant, décollez le culot.

Étape 11 : Ajoutez 10ml de fixateur tout en homogénéisant avec ou sans le vortex de façon attentionnée.

NB : s'il y'a beaucoup de tubes, ajoutez d'abord 5ml dans tous les tubes, puis complétez 10ml de façon à équilibrer le niveau de tous les tubes et par ordre de prise.

Étape 12 : laissez l'échantillon à température pièce pendant 10 minutes et après ce délai, centrifugez-le toujours en raison de 25000 tours/mn pendant 10 minutes.

Étape 13 : après centrifugation, enlevez le surnageant sans décoller ni toucher le culot. Après avoir enlevé le surnageant, décollez le culot.

Étape 14 : ajoutez 10ml de fixateur tout en homogénéisant avec ou sans le vortex de façon attentionné.

NB : s'il y'a beaucoup de tubes ajoutez d'abord 5ml dans tous les tubes, puis complétez 10ml de façon à équilibrer le niveau de tous les tubes et par ordre de prise.

Étape 15 : laissez à température pièce pendant 10 minutes et après le délai mettez le(s) dans la centrifugeuse pour centrifugation (toujours 25000 tours/minute pendant 10 à 15 minutes).

Étape 16 : après centrifugation, enlevez le surnageant sans décoller ni toucher le culot. Après avoir enlevé le surnageant, décollez le culot.

NB : Étalez deux ou trois lames (se référer au protocole de l'étalement) pour apprécier les débris cytoplasmiques et si nécessaire répétez **Étape 14, Étape 15 et Étape 16, puis étalez à nouveau.**

11.Sécurité et precautions:

Porter une blouse blanche à manche longue, des gants et aussi des lunettes et une bavette lors de la manipulation du sang et du milieu de culture.

12.Documentés reliés:

Protocole d'étalement des lames.

13.Références:

14. Historique de la révision: Création du document.

FICHE SIGNALITIQUE :

Nom : SIDIBE

Prénom : Cheick Oumar

Email : cheickoumar9@yahoo.com

Tel : +223 76 39 49 14

Titre : Exploration cytogénétique de la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC)

Année universitaire : 2018 - 2019

Ville de soutenance : Bamako

Pays d'origine : Mali

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la Faculté de Médecine et d'odontostomatologie (FMOS), Faculté de la Pharmacie (FAPH).

Secteur d'intérêt : Génétique, Cytogénétique, Oncogénétique, Hématologie, Oncologie, recherche scientifique.

Résumé :

Cette étude de validation de la technique FISH a concerné les patients suspects de LMC ou atteint de LMC sous traitement, référés pour exploration cytogénétique pour le diagnostic ou de suivi, vus au Département de Cytogénétique et de Biologie de la Reproduction de l'Institut National de Recherche en Santé Publique du 31 octobre 2018 au 27 août 2019.

Elle s'était déroulée en deux phases : une première phase technique et une seconde phase d'évaluation microscopique.

Nous avons appliqué la technique FISH pour évaluer tous patients.

Parmi les 25 patients enrôlés dans l'étude, 16 étaient des cas de diagnostic et 9 cas de suivi.

Dans notre série, les femmes étaient légèrement plus représentées que les hommes, soit un sex-ratio de 1,08 en faveur des femmes.

Tous les cas de diagnostic ont été testés positifs au réarrangement *BCR/ABL1*. Pour les cas de suivi, 3 patients sur 9 étaient en rémission cytogénétique complète.

Les signaux atypiques ont représenté 24% de l'ensemble de l'effectif. Ces signaux étaient essentiellement de même type dans le noyau chez les patients en suivi.

Mots clés : LMC, Anomalies chromosomiques, FISH, Mali

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette faculté, de mes chers condisciples, devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'Être Suprême d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail, je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine dès la conception.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses !

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque !

Je le jure!