

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique

République du Mali
Un Peuple-Un But-Une Foi

Université des Sciences, des Techniques et des Technologies
de Bamako (USTTB)



U.S.T.T-B

Faculté de Pharmacie



Année Universitaire: 2021-2022

N° 022

THÈSE

**Étude des Anomalies Chromosomiques
et des Télomères Individuels dans les
Formes Atypiques de la Leucémie
Myéloïde Chronique**

**Présentée et soutenue publiquement le 19/01/2023 devant la
Faculté de Pharmacie**

Par

Mr. Modibo K. GOITA

**Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie
(Diplôme d'État)**

JURY

Président : Professeur Mahamadou TRAORE

Membre : Professeur Ousmane KOITA

Membre : Professeur Yacouba Lazare DIALLO

Directeur : Professeur Oumar SAMASSEKOU

DEDICACES

DEDICACES

BISMILLAHI RAHMANI RAHIMI

Je dédie ce travail

A Allah,

Le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux, le Seigneur de l'univers, Qui m'a inspiré et guidé vers les études pharmaceutiques, je Vous dois ce que je suis aujourd'hui louange et gloire pour Votre clémence et miséricorde.

A notre Prophète Mohammad S.A.W,

Que la paix et le salut d'Allah soient sur lui, sur toute sa famille, ses compagnons et sur tous ceux qui le suivent jusqu'au jour du jugement dernier. « Apprendre du berceau jusqu'à la tombe » telle était l'une de vos paroles qui nous a donné le goût de l'apprentissage et de la recherche perpétuelle du savoir. Nous vous témoignons notre gratitude et notre respect pour ce que vous avez fait pour l'humanité tout entière. Après avoir rendu grâce à Allah et son Prophète.

A ma très chère mère, Fatoumata DAO.

Mère, tu es la plus gentille et la plus empressée de toutes les mamans. Je te suis redevable de la chose la plus importante qui soit : « la vie ».

En effet c'est à toi que Dieu a confié cette lourde tâche. Tu as pris soins de nous et nous as toujours protégé. Femme dynamique, généreuse, loyale, joviale, sociable, attentionnée, croyante, naturelle et infatigable ; tes conseils, tes encouragements, tes bénédictions dans les moments de peine et de joie ne m'ont jamais fait défaut. Tu n'as jamais cessé de nous inculquer que seul le travail libère l'homme. Voici le fruit de ton amour et de tes sacrifices. Qu'Allah le tout puissant t'accorde une longue vie pleine de bonheur. Amina !

A mon Père Kalifa GOITA.

Les mots me manquent terriblement pour exprimer mes sentiments aujourd'hui. Tu as toujours été à nos côtés, mes frères, mes sœurs et moi. Tu nous as appris à nous battre dans la vie tout en privilégiant la religion. Saches que je ne saurai jamais te rendre un hommage à la hauteur de tes efforts consentis pour mon éducation et ma formation.

A ma grande sœur Mariam

Grace à toi, j'ai appris le sens de l'honneur, la dignité, la tolérance, la probité, le respect de soi et celui des autres, la rigueur et la loyauté. Ton soutien moral, affectif et matériel ne m'ont jamais fait défaut. Je te suis reconnaissant pour toute la confiance que tu as placée en ma modeste personne depuis le début de mon cycle. Merci grande sœur pour ce que tu as fait et continues à faire pour moi. Je resterai toujours un frère digne de toi et je me souviendrai toujours de tes sages conseils. Reçois ici, l'expression de ma profonde gratitude.

A mes frères et sœur **Adama GOITA, Oumou GOITA, Ousmane GOITA, Bintou GOITA, Mariam GOITA, Aminata GOITA, Korotoumou GOITA**

Les mots adéquats me manquent pour exprimer l'amour et l'admiration que j'ai pour vous. Vous avez été toujours là, à me soutenir, m'encourager ; à m'aider dans les moments de besoin, je remercie le Bon Dieu de vous m'avoir accordé comme frères et sœurs.

Trouvez ici le fruit de vos actes. Que l'esprit de cohésion de nos parents nous anime toujours. Ce travail est le résultat de votre précieux soutien. Qu'il soit le gage de mon amour et mon affection indéfectibles pour vous. Que Dieu renforce le lien sacré qui nous unit. Qu'il nous aide à œuvrer pour la consolidation de l'unité familiale. Merci pour votre soutien moral indéfectible et votre disponibilité ; je ne vous oublierai jamais.

REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

Au Professeur Mahamadou TRAORÉ

Cher maître,

Je tiens d'abord à vous remercier pour m'avoir fait confiance, de m'avoir guidé et conseillé. Votre disponibilité, votre soutien immuable et votre rigueur au travail ont contribué à la réalisation de ce travail. Vous avez été comme un père pour moi et les moments passés avec vous, m'ont été d'une grande utilité. Très cher Maître je ne sais comment vous exprimer toute ma gratitude autrement qu'en vous promettant d'agir comme vous avec des étudiants dans ma situation si un jour l'occasion m'est donnée.

Au Professeur Guida LANDOURÉ

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

Au Professeur Oumar SAMASSÉKOU

Mes plus profonds remerciements vont à votre endroit, Merci cher Maître de m'avoir accepté parmi vos élèves, de m'avoir offert l'opportunité de vous approcher, de découvrir d'autres cieux avec vous, et de vivre ma passion. Durant ces moments et, grâce à votre compagnie, en plus de la génétique médicale, j'ai appris à soigner mon comportement, mon caractère, mes faits et gestes, à me bâtir une personnalité, et à apprendre l'anglais. Aussi, j'ai appris de vous qu'on ne donne son respect qu'à ceux qui le méritent et surtout de ne pas rabaisser sa personne à cause de ses convictions et de ses croyances. Merci pour toutes ces remarques que vous m'avez faites que ce soit de manière directe ou indirecte. Ceci témoigne votre désir de nous voir nous améliorer. J'espère pouvoir être à la hauteur de vos attentes.

A mes amis **Dr Youssouf DOUMBIA, Nouhoum BAH, Dr. Seydou Zié SANOGO, David DIARRA, Harouna COULIBALY, Abdoulaye ZERBO, Dr. Moussa Aly SANGARE, Salia BAMBA, Daouda GOITA, et surtout à ma très chère Mariam GUISSÉ,**

Chers ami(e)s JOSEPH DROZ a dit ceci « Un fidèle ami est un soutien précieux dans les jours difficiles ». Je ne me lasserai jamais de vous remercier pour vos encouragements et votre assistance morale. Ce travail est le vôtre. Recevez ici toute ma reconnaissance.

A toute l'équipe de Neurogénétique : Pr GUINTO Cheick Oumar, Pr Mahamadou TRAORE, Pr Guida LANDOURE, Pr Oumar SAMASSEKOU, Pr Souleymane COULIBALY, Pr Seybou H DIALLO, Pr COULIBALY Thomas, Pr COULIBALY Souleymane dit Papa, Dr DIALLO Salimata, Dr CISSE Lassana, Dr DIARRA Salimata, Dr. TAMEGA Abdoulaye, Dr. YALCOUYE Abdoulaye, Dr. BOCOUM Abdoulaye, Dr. DEMBELE Mohamed Emile, Dr. Fousseyni KANE , Dr. Alassane Baneye MAIGA, Dr. Oumou TRAORE, Dr Cheick O SIDIBE, Salia BAMBA, Dr Amoro TRAORE, Demba SAMAKE, Christine ONGOIBA, Bintou COULIBALY, Dr Moussa Aly SANGARE, Dr Aïssata TOURE, Dr Linda FOTSA, Dr Samuel EPHRATA Mefoung, Dr Ibrahim GUINDO, Dr Mahamadou KOTIOUMBE. Kadidiatou DIALLO, Issouf BALLO, Soumaila NIARE, Boubacar KARAMBE,

A vos côtés, j'ai compris que tout seul on va plus vite mais ensemble on va plus loin. Avec vous j'ai su cultiver l'esprit d'équipe et le sens de la collaboration. Ces années passées à vos côtés ont été riches en enseignement. Je vous remercie infiniment.

Aux internes Demba SAMAKE, Bintou COULIBALY, Binta BERTHE,

Je vous remercie pour l'estime et le respect que vous avez manifesté à mon égard.

Merci également pour vos conseils, vos encouragements et votre franche collaboration.

A tout le personnel du Service de Neurologie du CHU Point G

A mes camarades de la 11^{ème} promotion du numerus clausus

Ce travail n'est que la somme de tant d'efforts durant ce long et dur trajet. Trouvez ici l'expression de ma profonde gratitude.

A tout le personnel de la Pharmacie Mah Cha Allah

Vous m'avez accueilli à bras ouvert, et avez supporté toutes mes humeurs sans jamais vous plaindre de moi. Recevez ici l'expression de ma profonde gratitude.

A tous mes patients, plus particulièrement ceux inclus dans le protocole de recherche de H3Africa.

Qu'Allah Azawadjal vous donne la force et le courage nécessaires de continuer à vous battre et d'aller de l'avant. Sachez que tant qu'il y'a la vie, il y'a de l'espoir.

Enfin à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à ma formation et à la réalisation de ce présent document, je vous dis merci.

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

A notre Maître et Président du jury

Professeur Mahamadou TRAORE

- **Professeur honoraire de génétique à la Faculté de Pharmacie de l'USTTB**
- **Co-investigateur de l'étude sur les pathologies neurologiques héréditaires au Mali**
- **Président et membre fondateur de la Société Malienne de Génétique Humaine**
- **Membre du Consortium Human Heredity and Health in Africa (H3Africa)**
- **Membre de la Société Africaine de Génétique Humaine**
- **Membre de la Société Malienne de Neurosciences**

Cher maître,

Dès nos premiers cours de génétique, votre particularité nous a séduit et a suscité en nous le désir d'être compté parmi vos élèves. Grâce à la confiance que vous avez eu en nous confiant ce travail, notre rêve s'est réalisé. Ceci nous a permis de comprendre auprès de vous, la délicatesse du geste et de la parole (Éthique) 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, et l'humilité. Tout au long de la réalisation 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 vos côtés, nous sommes allés 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 Maître, 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.

A notre Maitre et juge

Professeur Ousmane KOITA

- **Pharmacien Biologiste (PharmD, PhD) ;**
- **Professeur Titulaire de Biologie moléculaire à la Faculté de Pharmacie ;**
- **Professeur Titulaire de cours de Biologie cellulaire et moléculaire à la Faculté de Pharmacie ;**
- **Responsable du Laboratoire de Biologie Moléculaire Appliquée à la FST / USTTB.**

Cher Maître,

Nous avons été très touchés suite à l'honneur que vous nous avez fait en acceptant de siéger dans ce jury. Cher professeur, je veux prendre un moment pour exprimer ma sincère gratitude pour les connaissances et les enseignements de Biologie Cellulaire que vous m'avez transmis. Votre dévouement à l'enseignement, à la recherche, et votre disponibilité à aider les étudiants ont eu un impact considérable sur mon expérience d'apprentissage. Merci pour votre temps et vos efforts. Votre simplicité, votre souci de transmettre vos connaissances et votre rigueur scientifique font qu'il est agréable d'apprendre à vos côtés. Ce travail est surtout le vôtre. Nous gardons de vous l'image d'un grand maître dévoué et admirable. Qu'il nous soit permis de vous adresser nos sincères remerciements.

A notre Maitre et juge

Professeur Yacouba Lazare DIALLO

- **Praticien hospitalier à l'Hôpital du Mali ;**
- **Maitre de recherche en hématologie clinique à l'Hôpital du Mali ;**
- **Membre fondateur de la SOMAPATH, SOMAHO, REMAPTH ;**
- **Membre de la SAFHEMA, AMALHEC ;**
- **Membre de la, SFH, ASH, ISTH, GFHT, FMH ;**
- **Membre du comité de jumelage médical de la FMH.**
- **Membre de la Comité d'éthique national de la santé et les sciences de la vie (CENSS)**
- **Membre de la Comité d'éthique Institutionnelle de l'Hôpital du Mali.**

Cher Maître,

Vous nous faites un grand honneur en acceptant avec une spontanéité totale de juger ce travail. Ceci malgré votre agenda chargé d'autres priorités. Cher Maître, permettez-moi de vous exprimer ma profonde gratitude pour votre engagement et votre dévouement envers les patients souffrant de pathologies hématologiques, spécifiquement ceux atteints de la LMC. Votre travail auprès de ces patients leur apporte une aide précieuse tout en leur donnant de l'espoir pour l'avenir. Votre détermination à améliorer la qualité de vie des personnes atteintes de cette maladie est vraiment inspirante. Merci pour votre engagement et votre compassion envers les patients. En outre, nous estimons vos qualités de scientifique surtout dans le domaine de la recherche clinique. Votre inestimable volonté de pérenniser la culture de l'excellence dans le domaine des sciences fait de vous un modèle. En effet ce travail est le vôtre.

Trouvez ici l'expression de notre profonde gratitude.

A notre Maître et directeur de Thèse

Professeur Oumar SAMASSEKOU

- **Spécialiste en génétique médicale et pathologie moléculaire**
- **Maitre de conférences en génétique et génomique à la F.M.O.S.**
- **Membre fondateur de la Société Malienne de Génétique Humaine**
- **Membre de la Société Africaine de Génétique Humaine**
- **Membre du Consortium Human Heredity 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 la jeune génération.

Nous ne pourrions 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 jumelée 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.

TABLE DES MATIERES

DEDICACES	ii
REMERCIEMENTS	v
HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY.....	ix
TABLE DES MATIERES	xiii
LISTE DES TABLEAUX.....	xvi
LISTE DES FIGURES.....	xvii
TABLE DES ABREVIATIONS	xx
1. INTRODUCTION.....	1
1.1. Objectif général	3
1.2. Objectifs spécifiques.....	3
2. GENERALITES	5
2.1. Leucémie myéloïde chronique.....	5
2.1.1. Définitions	5
2.1.2. Épidémiologie	5
2.1.3. Intérêt	6
2.1.4. Pathogénie et Biologie moléculaire du chromosome Philadelphie	7
2.1.5. Diagnostic.....	13
2.1.6. Diagnostic différentiel.....	23
2.1.7. Scores pronostics.....	23
2.1.8. Traitement	25
2.2. Biologie normale des Télomères humains.....	31
2.2.1. Définition	31
2.2.2. Structure des Télomères	31
2.2.3. Fonction des télomères.....	32
2.2.5. Télomère et cancer	34

2.2.6.	Mesure de la longueur des télomères individuelles par Q-FISH.....	35
3.	METHODOLOGIE.....	43
3.1.	Cadre d'étude.....	43
3.2.	Type et période d'étude	43
3.3.	Population d'étude.....	43
3.3.1.	Critère d'inclusion.....	43
3.3.2.	Critères de non-inclusion	43
3.4.	Collecte des données	43
3.4.1.	Les données cliniques.....	43
3.4.2.	Données cytogénétiques.....	44
3.4.3.	Données Microscopiques	45
3.4.4.	Analyse des télomères	45
3.4.5.	Analyse Statistique.....	46
3.4.6.	Considérations éthiques.....	46
4.	RESULTATS	48
4.1.	Données cliniques.....	48
4.1.1.	Age	48
4.1.2.	Sexe	48
4.1.3.	Numération Formule sanguine (NFS)	49
4.1.4.	Données cytogénétiques.....	50
4.2.	Mesures globales de l'intensité des télomères	56
4.2.1.	Intensité globale par patient	56
1.1.2.	Intensité globale par chromosomes	58
4.2.	Longueurs individuelles des télomères par patient.....	63
4.2.1.	Patiente 1 : P1.....	63
4.2.2.	Patient 2: P2	69
4.2.3.	Patient 3 : P3	74

4.2.4. Patient 4 : P4	80
4.2.5. Patient 5 : P5	86
5. COMMENTAIRES ET DISCUSSION	93
5.1. Anomalies chromosomiques.....	94
5.2. Longueurs individuelles des télomères.....	96
6. CONCLUSION.....	99
7. RECOMMANDATIONS.....	100
8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	102
9. ANNEXES	112
9.1. ANNEXE 1.....	112
9.2. ANNEXE 2.....	113
9.3. ANNEXE 3.....	116
9.4. ANNEXE 4.....	118
9.5. ANNEXE 5.....	120
9.6. ANNEXE 6.....	123

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Critères diagnostique de la phase accélérée selon l’OMS et ELN.	17
Tableau II : Critères diagnostiques de la phase blastique selon l’OMS et ELN.	18
Tableau III: Calcul des risques pronostics.....	25
Tableau IV: Réponse aux inhibiteurs de la tyrosine Kinase (ITK) en première ligne de traitement.....	29
Tableau V : Définition de la réponse aux inhibiteurs de la tyrosine Kinase (ITK) en seconde ligne de traitement.	30
Tableau VI: Répartition des patients selon la NFS.....	49
Tableau VII: Répartition des types de signaux BCR et ABL1 dans le noyau.....	50
Tableau VIII: Répartition des types de signaux BCR et ABL1 sur les métaphases	51
Tableau IX: Annotation cytogénétique selon la nomenclature de « International System for Human Cytogenomic Nomenclature ».	52
Tableau X : Résumé clinique, biologique de FISH BCR::ABL1	53
Tableau XI: Résumé des anomalies chromosomiques par M-FISH.....	54

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : La translocation réciproque t (9;22).	7
Figure 2 : Gène <i>ABL1</i>	8
Figure 3 : Structure de la protéines <i>ABL1</i>	9
Figure 4: Gène <i>BCR</i> et les différents points de cassure.	9
Figure 5: Structure de la protéine <i>BCR</i>	10
Figure 6 : Locations des points de cassure sur le gène <i>ABL1</i> et <i>BCR</i> et la structure des ARNm.	11
Figure 7: Variantes protéiques <i>BCR::ABL1</i>	11
Figure 8: Représentation des voies de signalisation activées par <i>BCR::ABL1</i>	12
Figure 9: Cytologie médullaire d'une LMC.....	16
Figure 10: Chromosome Ph au caryotype à la phase chronique de la LMC.....	19
Figure 11 : FISH <i>BCR::ABL1</i>	20
Figure 12: Modèles de signal atypiques FISH <i>BCR::ABL</i>	21
Figure 13: Mécanisme de formation des variants de translocation t(9;22).	22
Figure 14: Mécanisme d'action de l'Imatinib Métylate sur <i>BCR::ABL1</i>	26
Figure 15 : Structure des télomères	32
Figure 16 : Boucles et protéines télomérique.....	32
Figure 17: Combinaison des fluorochromes utilisés dans la M-FISH.	40
Figure 18: Caryogramme d'une métaphase d'un patient LMC.....	41
Figure 19: Répartition des patients en fonction de l'âge.....	48
Figure 20: Répartition des patients en fonction du sexe	48
Figure 21: Différents profils des signaux atypiques nucléaires chez les cinq patients.	50
Figure 22 : Différents profils des signaux atypiques métaphasiques chez les cinq patients... ..	51
Figure 23 : Caryogramme partiel représentant les anomalies chromosomiques retrouvées chez les cinq patients.	55
Figure 24: Représentation de l'intensité globale des télomères par le diagramme de boîte à moustaches.	56
Figure 25: Représentation de la médiane des intensités télomériques en fonctions des bras chromosomiques.....	57
Figure 26 : Représentation de la médiane e des intensités télomériques en fonction des chromosomiques.....	58

Figure 27: Représentation de la médiane des télomères individuels sur les bras chromosomiques longs.....	59
Figure 28: Représentation de la médiane des télomères individuels des bras courts.....	59
Figure 29 : Distribution de la médiane des intensités des télomériques des bras courts.....	60
Figure 30 : Distribution de la médiane des intensités des télomériques des bras longs.....	60
Figure 31 : Coefficient de variation de l'intensité des télomères entre les patients.....	61
Figure 32 : Analyse FISH BCR::ABL de la patiente P1	64
Figure 33 : Caryotype au marquage DAPI de la patiente P1	65
Figure 34: Caryotype multicolore de la patiente P1	65
Figure 35: Représentation de la médiane des intensités télomériques des bras courts.....	66
Figure 36: Représentation de la médiane des intensités télomériques des bras longs.....	66
Figure 37 : Intensité globale des télomères des dérivés 9 et 22.....	67
Figure 38: Représentation du ratio (p/q) des intensités télomériques.....	68
Figure 39 : Analyse FISH BCR::ABL du patient P2	70
Figure 40: Caryotype au marquage DAPI du patiente P2	71
Figure 41: Caryotype multicolore du patient P2	71
Figure 42 : Représentation de la médiane des intensités télomériques des bras courts.....	72
Figure 43: Représentation de la médiane des intensités télomériques des bras longs.....	72
Figure 44: Intensité globale des télomères des dérivés 9 et 22.....	73
Figure 45: Représentation du ratio (p/q) des intensités télomériques.....	73
Figure 46: Analyse FISH BCR ::ABL1 du patient P3	75
Figure 47: Caryotype au marquage DAPI de la patiente P3	76
Figure 48: Caryotype FISH multicolore de la patiente P3	76
Figure 49: Représentation de la médiane des intensités télomériques des bras courts.....	77
Figure 50: Représentation de la médiane des intensités télomériques des bras longs.....	77
Figure 51 : Intensité globale des télomères des bras chromosomique 9 et 22.....	78
Figure 52: Représentation du ratio (p/q) des intensités télomériques.....	79
Figure 53: Analyse FISH BCR ::ABL1 du patient P4	81
Figure 54: Caryotype au marquage DAPI du patient P4	82
Figure 55: Caryotype multicolore du patient P4	82
Figure 56: Représentation de la médiane des intensités télomériques des bras courts.....	83
Figure 57: Représentation de la médiane des intensités télomériques des bras longs.....	83
Figure 58: Intensité globale des télomères des dérivés 9 et 22.....	84
Figure 59: Représentation du ratio (p/q) des intensité télomériques.....	85

Figure 60: Analyse FISH BCR::ABL1 du patient P5	87
Figure 61: Caryotype au marquage DAPI du patient P5	88
Figure 62: Caryotype multicolore du patient P5	88
Figure 63: Représentation de la médiane des intensités télomériques des bras courts.	89
Figure 64: Représentation de la médiane des intensité télomériques des bras courts.....	89
Figure 65: Intensité globale des télomères des homologues 9 et 22.	90
Figure 66: Représentation du ratio (p/q) des intensités télomériques.	91
Figure 67: M-FISH montrant la translocation complexe t(9;22;16) et la trisomie X.	94
Figure 68: Mécanisme d'action de la formation du translocation t(22;9;16).....	95
Figure 69: Schéma illustrant l'origine de der(9)t(9;22)inv(9)(p22q34) (110).....	96

TABLE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide DésoxyriboNucléique	NFS : Numération Formule Sanguine
ABL1 : Abelson Murine Leukemia	OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ALT : Alternative Lengthning of Telomere	PA : Phase d'Accélération
APT : adenosine triphosphate	PB : Phase Blastique
BclXL : B-Cell Lymphoma-extra Large	PC : Phase Chronique
BCR : Breakpoint Cluster Region	PCR : Polymerase Chain Reaction
DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole	Ph : Chromosome Philadelphie
EDTA : EthyleneDiamineTetraAcetic acid	PI-3K : Phosphatidylinositol-3 Kinase
ELN : European Leukemia Net	PNA : Peptid nucleic acid
ERK : Extracellular-signal-Related Kinase	Q-FISH : Quantitative-FISH
FISH : Fluorescence in situ Hybridization	RAF : Rat Fibrosarcoma
FITC : Fluorescein isothiocyanate	RAP1 : Ras-proximate-1 or Ras-related protein 1
GDP : Guanosine Di-Phosphate	RcyM : Réponse Cytogénétique Majeur
GTP : Guanosine Tri-Phosphate	RcyC : Réponse Cytogénétique Complète
kDa : kilo Dalton	RHC : Réponse Hématologique Complète
ITK : Inhibiteur de la Tyrosine Kinase	Rho-GEF : Guanine nucleotide Exchange Factor
LAL : leucémie aiguë lymphoblastique	RT-PCR : Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
LMC : Leucémie Myeloïde Chronique	RQ-PCR : Real Time Quantitative-PCR
LSI : Locus Specific Identifier	STAT : Signal Transductor and Activator of Transcription
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase	TIN2 : TRF-Interacting Nuclear protein 2
M-BCR : Major Breakpoint Cluster Region	POT1 : Protection Of Telomeres
M-FISH : Multiplex FISH	TPP1 : Tripeptidyl-peptidase 1
MEK : Map Kinase Erk Kinase	TRF : Telomeric Repeat Binding Factors
MYC : Myelocytomatous Oncogene	TRF1 : Telomeric Repeat-binding Factor1
NADPH : Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	TRF2 : Telomeric Repeat-binding Factor2
NCCN : National Comprehensive Cancer Network	

INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

La leucémie myéloïde chronique (LMC), appartient au groupe des néoplasies myéloprolifératives dans laquelle la lignée granulocytaire est majoritairement impliquée (1). Elle se caractérise par la translocation chromosomique entre les chromosomes 9 et 22 $t(9;22)(q34,1;q11,2)$, appelée le chromosome Philadelphie (Ph). La conséquence de cette translocation est la formation d'un gène de fusion (hybride) dit *BCR::ABL1* (Breakpoint Cluster Region-Abelson Murine Leukemia), qui code pour une protéine dotée d'une activité tyrosine kinase (2).

L'incidence mondiale de la LMC est de 1 à 2 cas sur 100.000 habitants par an (3). La LMC représente 15% des leucémies et survient avec une médiane d'âge de 55 ans en Europe et 65 ans aux États-Unis d'Amérique. En Afrique, les études menées classent la LMC parmi les hémopathies malignes les plus fréquentes (4). Au Mali, la LMC se situe environ à 16% des hémopathies malignes et 42,10% des leucémies et apparaît plus entre 20 et 33 ans (5). Les facteurs étiologiques de la LMC ne sont pas toujours connus précisément de nos jours, mais certains facteurs ont été incriminés tels que les rayons X et l'intoxication au benzène.

Le chromosome Philadelphie (Ph) est le biomarqueur principal de la LMC surtout à la phase chronique car il est retrouvé chez plus de 90% de patients. Les variants du chromosome Philadelphie sont retrouvés dans presque 5% de cas de la LMC. Ils sont cytogénétiquement complexes et peuvent associer d'autres chromosomes que les chromosome 9 et 22. Par conséquent, ces anomalies peuvent être responsables d'une translocation entre trois ou plusieurs chromosomes. En outre, les variants du chromosome Philadelphie impliquant d'autres chromosomes sont souvent associés aux anomalies chromosomiques supplémentaires qui sont des signes de progression de la LCM. Un des indicateurs de la progression de la LMC est le raccourcissement des télomères qui est plus accentué au niveau de certains des télomères individuels (6)

Les télomères sont des structures spécialisées situées à l'extrémité des chromosomes. Ils sont constitués de courte séquence (TTAGGG) d'ADN répétée. Ils interviennent dans le maintien et l'intégrité des chromosomes en les protégeant contre la fusion de leurs extrémités et permettent d'assurer une réplication appropriée et d'éviter la perte progressive du génome durant chaque cycle cellulaire, ainsi ils assurent la stabilité génomique.

La longueur moyenne des télomères dans les cellules de la LMC est plus courte que celle des cellules sanguines normales. Les longueurs des télomères individuels, télomère sur chaque bras chromosomique, ont été associées à des anomalies chromosomiques dans certains cancers et pourraient être impliquées dans le changement dynamique du génome dans la LMC (6).

Au Mali une étude récente portant sur la technique FISH dans le diagnostic et le suivi thérapeutique de la LMC a montré que 24% des 25 patients répertoriés représentaient des signaux atypiques de la fusion *BCR::ABL1*. Cette fréquence élevée a permis aux auteurs de suggérer entre autres l'implication des anomalies chromosomiques supplémentaires dans les formes atypiques de la LMC. C'est ainsi que nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les formes atypiques de la LMC sont associées à des anomalies chromosomiques supplémentaires et au raccourcissement de la longueur des télomères individuels.

OBJECTIFS

1.1. Objectif général

Déterminer les anomalies chromosomiques et la longueur des télomères individuels dans les formes atypiques de la LMC.

1.2. Objectifs spécifiques

- Déterminer les anomalies chromosomiques des cas atypiques de la LMC,
- Déterminer la longueur des télomères individuels des cas atypiques de la LMC,
- Comparer le profil des télomères du dérivé des chromosomes 9 et 22.

GENERALITES

2. GENERALITES

2.1. Leucémie myéloïde chronique

2.1.1. Définitions

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une néoplasie myéloproliférative caractérisée par une prolifération granuleuse prédominante et la présence d'une anomalie chromosomique caractéristique, la translocation t(9;22)(q34.1;q11.2), qui entraîne la fusion du gène *ABL1* situé sur le chromosome 9 avec le gène *BCR* sur le chromosome 22 (2). Cette fusion a comme conséquence la formation du chromosome de Philadelphie (Ph), qui contient le gène de fusion *BCR::ABL1* (nouveau nomenclature du réarrangement *BCR/ABL* selon la dernière mise à jour du "National Comprehensive Cancer Network NCCN" (7)). Dans la LMC, le gène *BCR::ABL1* est présent dans toutes les lignées myéloïdes et dans certaines cellules lymphoïdes et endothéliales. L'histoire naturelle de la LMC non traitée est triphasique : une phase chronique (PC) initiale indolente qui est suivie d'une phase accélérée (PA), et d'une phase blastique (PB). Le diagnostic nécessite la détection du chromosome Ph et/ou du gène *BCR::ABL1* (8).

2.1.2. Épidémiologie

2.1.2.1. Fréquences

La LMC est une pathologie rare, avec une incidence mondiale de 1 à 2 cas par 100 000 habitants. Elle représente 15% des leucémies diagnostiquées chez l'adulte (9). Il y'a une légère prédominance masculine avec un sex-ratio (1,6:1). La maladie peut survenir à tout âge, mais elle est rare chez les enfants et les adolescents. Sa fréquence augmente avec l'âge avec une médiane de diagnostic entre 55 et 60 ans (10).

Les enquêtes épidémiologiques réalisées dans certains pays d'Afrique notamment en Côte d'Ivoire, au Cameroun et au Niger sur les hémopathies malignes, classent la LMC parmi les hémopathies les plus fréquentes après la leucémie aiguë myéloïde (LAM) (5), avec un taux d'incidence de 5,09 cas par an en Côte d'Ivoire (11), et des fréquences respectives de 13,9% et 18,88% au Cameroun (12) et au Niger (13).

Au Mali, les dernière études épidémiologique réalisées en 2005 sur la LMC, ont montré que la LMC représentait 16,67% des hémopathies malignes et 42,3% des leucémies à l'instar d'autres pays africains (5). La classe d'âge de 40 à 49 ans était la plus représentée au moment du diagnostic et le sexe ratio (homme/femme) était de (1/2) qui est différent de celui observé

dans les pays comme la Côte d'Ivoire, le Cameroun et le Niger où le sex-ratio est en faveur de l'homme (5).

2.1.2.2. Facteurs de risque

Les radiations ionisantes sont reconnues comme les principaux facteurs de risque de la LMC (14). L'effet des radiations ionisantes a pu être reproduit *in vitro*, par l'induction de la translocation t(9;22). Le rôle leucémogène des radiations ionisantes a aussi été clairement établi par la présence de leucémies chez les physiciens et radiologues et les populations ayant été exposées aux irradiations atomiques d'Hiroshima et Nagasaki (15). En plus, la capacité du benzène à induire des leucémies serait connue depuis de nombreuses années, et les LMC radio ou chimio induites par le benzène, ne diffèrent pas des formes apparemment primitives et comportent aussi un chromosome Philadelphie (3,16).

2.1.2.3. Facteurs étiologiques

La cause de la LMC, comme celle des autres leucémies, reste inconnue. Cependant divers facteurs de risque mentionnés ci-haut peuvent favoriser l'apparition de la maladie.

2.1.3. Intérêt

2.1.3.1. Clinique

L'exactitude du diagnostic est cruciale dans la prise en charge de la LMC. La détection des anomalies chromosomiques et des formes atypiques lors du diagnostic est recommandée d'où la prescription du caryotype comme test de première intention de diagnostic de la LMC. Les formes atypiques du chromosome Philadelphie ont été associées à une résistance thérapeutique des inhibiteurs de tyrosine kinase de première génération. Il est donc indispensable de caractériser les anomalies chromosomiques qui pourraient être associées à ces formes atypiques lors du diagnostic (17).

2.1.3.2. Thérapeutique

La LMC est la première hémopathie maligne à avoir une thérapie ciblée, en l'occurrence les inhibiteurs de la tyrosine kinase (ITKs). Cependant la réussite du traitement est corrélée avec un diagnostic exact. Bien que la majorité des formes de réarrangement du chromosome Philadelphie répondent aux ITKs, certaines formes atypiques sont associées à un mauvais

pronostic de la maladie et à une résistance thérapeutique à certaines ITKs. Par conséquent, la connaissance moléculaire des formes atypiques de la LMC permettrait d'éviter d'éventuels échecs thérapeutiques et de résistance aux ITKs (18).

2.1.4. Pathogénie et Biologie moléculaire du chromosome Philadelphie

2.1.4.1. Pathogénie

La survenue de la LMC repose sur la monoclonalité de l'anomalie cytogénétique qui est le chromosome Philadelphie. La LMC est due à une atteinte de la cellule souche totipotente, et le réarrangement chromosomique impliquant les chromosomes 9 et 22 est présent sur l'ensemble de la lignée myéloïde. Le chromosome Philadelphie résulte d'une translocation acquise réciproque, $t(9;22)$, entre les chromosome 9 et 22. Cette translocation entraîne la fusion du proto-oncogène *ABL1* présent sur le chromosome 9 avec le gène *BCR* sur le chromosome 22. Cette translocation conduit au raccourcissement du bras long d'un des deux chromosomes 22, dénommé le chromosome Philadelphie ou dérivé du chromosome 22 (19,20) (Figure 1). Le remaniement chromosomique juxtapose sur le Philadelphie le gène *BCR* localisé sur le 22q11.2 et le gène *ABL1* situé sur le 9q34.1. En outre, cette translocation engendre une fusion entre une partie du bras long du chromosome 22 sur le chromosome 9, appelé le dérivé du chromosome 9 (Figure 1).

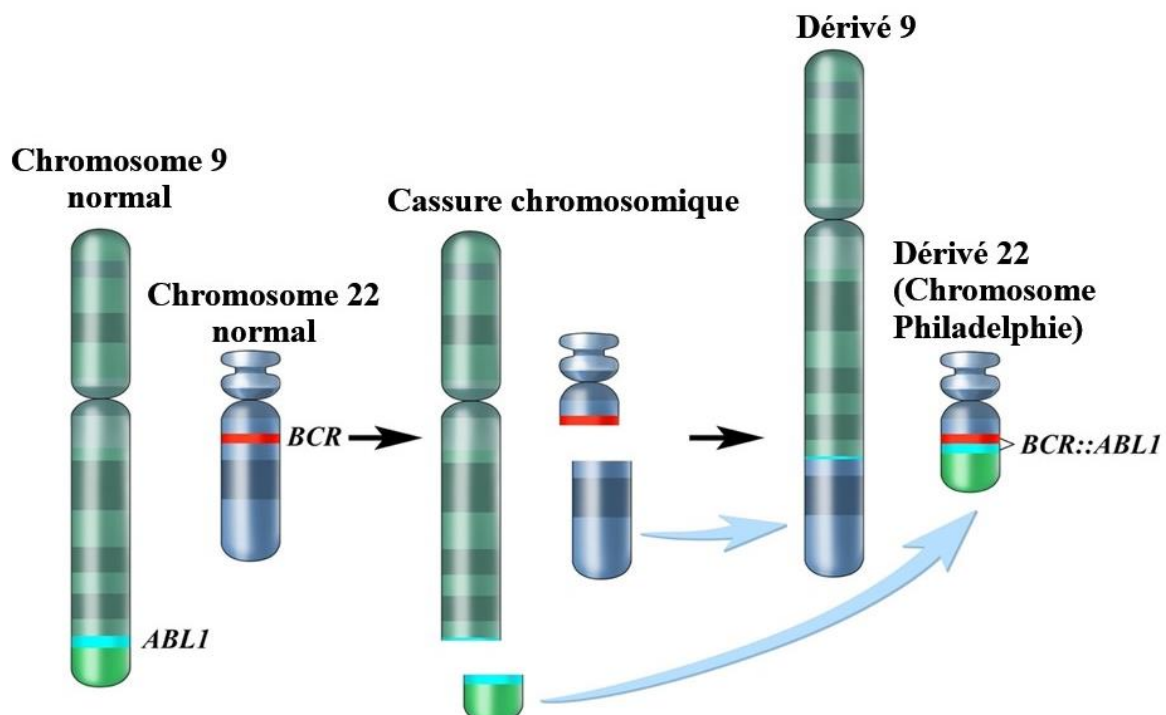


Figure 1 : La translocation réciproque $t(9;22)$.

Responsable de la formation du chromosome Philadelphie (tirée et adapté du site de la National Cancer Institute) (21).

2.1.4.2. Biologie moléculaire

2.1.4.2.1. Gène *ABL1* et sa protéine

Le gène *ABL1* est un oncogène, homologue humain du gène *v-abl* identifié chez le virus leucémogène murin d'Abelson (22). Il contient 12 exons, dont l'exon 1 est représenté en deux alternatives (1a et 1b) qui sont espacées par un intron d'environ 200 kb, et 11 autres exons moins espacé (Figure 2).

Le locus *ABL1* est d'une longueur de 230 kb et est transcrit en deux ARNm de 6 ou 7 kb en fonction du début la transcription à partir de l'exon 1a ou 1b. Ainsi, deux protéines peuvent être traduites dont la plus exprimée est celle ayant 145 kDa (p145).

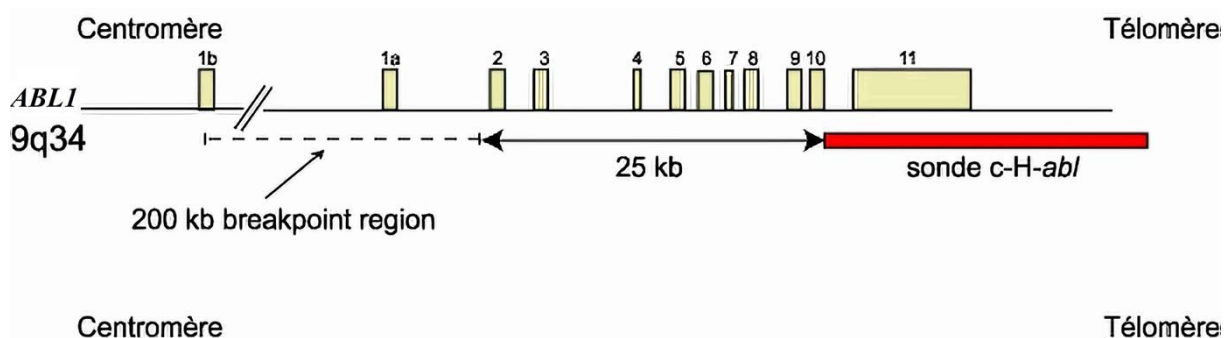


Figure 2 : Gène *ABL1* (23).

L'emplacement des deux points de cassure possible : entre l'exon 1b et 1a ou entre l'exon 1a et 2.

La structure de la protéine *ABL1* (Figure 3) comprend :

- Trois régions SH (SH1, 2 et 3) dans la partie NH₂ terminale.
- Une région riche en proline dans la partie centrale.
- Des séquences de localisation nucléaire dans la partie COOH-terminale.

L'activité tyrosine est assurée par le domaine SH1 où se trouvent le site de liaison à l'Adénosine 5'-Triphosphate (ATP), le site majeur d'autophosphorylation, et le domaine catalytique phosphotransférase. Les domaines SH2 et SH3 se lient à de nombreuses protéines qui interagissent avec *ABL1*.

La localisation à la fois nucléaire et cytoplasmique de la protéine, est due à une activité de « navette », qui semble être effectuée à la présence de Signaux de Localisation Nucléaire

(NLS) et de Séquences d'Export Nucléaire (NES) présents dans la région C-terminale de la molécule (24).

La protéine ABL1 a des fonctions à la fois nucléaires et cytoplasmiques. Elle se lie à l'ADN et joue un rôle majeur dans la régulation du cycle cellulaire (25).

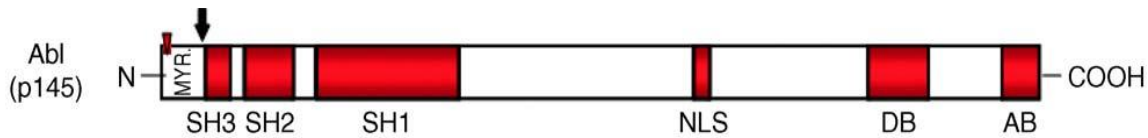


Figure 3 : Structure de la protéines ABL1(26).

2.1.4.2.2. Gène *BCR* et sa protéine

Avec une longueur de 135 kb et contenant 23 exons, le gène *BCR* a été découvert en clonant sa région M-Bcr appelée (Major Breakpoint Cluster Region) qui contient la majorité des points de cassure (Figure 4). La région M-Bcr comprend 5 exons correspondant aux exons 12 à 16, autre fois appelés b1, b2, b3, b4 et b5.

Le gène *BCR* code pour deux protéines de 160 et 130 kDa, résultat de la traductions de deux acides ribonucléiques messagers (ARNm) de 6,7 et de 4,5kb.

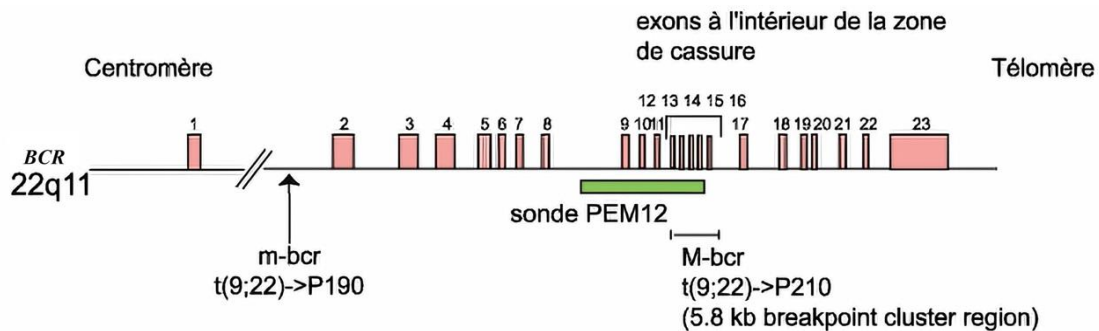


Figure 4: Gène BCR et les différents points de cassure.

Interviennent chez la majorité des patients au niveau de M-Bcr (23).

La protéine BCR est constituée de plusieurs domaines (27). La région N-terminale comprend un domaine sérine/thréonine kinase et un domaine d'oligomérisation responsable de l'homotétramérisation de la molécule, indispensable à l'activité transformatrice de la molécule (28), et deux sites de liaison aux domaines State Highway 2 (SH2) qui permettent la liaison de *BCR* avec le domaine SH2 d'*ABL1* (Figure 5). Tandis que la partie centrale présente un domaine à activité sérine/thréonine kinase assure l'échange GTP-GDP par les Rho-GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) (28).



Figure 5: Structure de la protéine BCR (27).

2.1.4.2.3. Réarrangement *BCR::ABL1*

Il est situé sur le chromosome Philadelphie. Différents réarrangements selon la localisation des points de cassure du gène *BCR*, sont décrits sur la Figure 6.

Les points de cassure se situent en majorité dans la région major breakpoint cluster région (M-Bcr) et les deux exons alternatifs d'*ABL1* (1a, 1b). La région M-Bcr, correspond aux exons 12 à 16 et est subdivisée en cinq bandes de b1 à b5 (exon 12=b1, exon 13=b2..., exon 16=b5).

La cassure de cette région se produit préférentiellement entre les exons b2 et b3 ou b3 et b4. Ainsi se forment les produits de fusion b3a2 (60%), b2a2 (30%) et un double transcrit b3a2/b2a2 (5-10%). Le gène de fusion *M-Bcr ::ABL1* code pour une protéine de 210 kDa.

Le point de cassure situé dans la région minor Bcr (m-Bcr), présente le transcrit e1a2 qui est traduit en une protéine de 190 kDa, retrouvée fréquemment dans la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) à chromosome Philadelphie positif.

Le point de cassure situé dans la région micro Bcr (μ -Bcr) présente le transcrit e19a2 et traduit en une protéine de 230 kDa, présente dans moins de 0,1% des LMC (29,30). Cette forme correspondrait à des hémopathies d'évolution lente, marquée par une hyperleucocytose modérée à polynucléaires neutrophiles, associée ou non à une thrombocytose (31)

Le gène de fusion *BCR::ABL1* est transcrit en un ARNm formé de la partie 5' du gène *BCR* et la partie 3' d'*ABL1* figure 6. La protéine chimérique traduite, résultante de la fusion, possède les domaines d'*ABL1* (SH1, SH2, SH3, de fixation d'ADN) et de dimérisation de *BCR* (24).

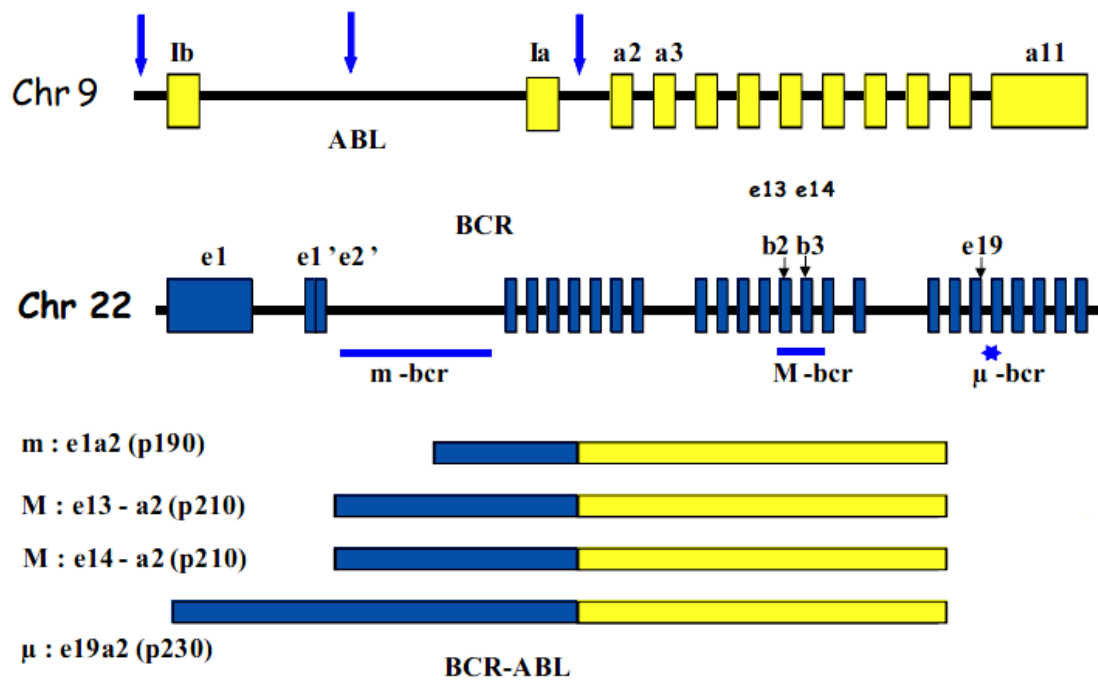


Figure 6 : Locations des points de cassure sur le gène *ABL1* et *BCR* et la structure des ARNm(32).

Les exons sont représentés par les boîtes pleines et les introns par des traits entre les exons. Les points de cassures sur le gène *ABL1* sont matérialisés par les flèches verticales. Sur le gène *BCR* les points de cassures survient généralement dans l'une des trois régions appelée cluster région indiqué par les deux traits horizontaux et le symbole d'étoile. La figure 7 ci-dessous représente les différentes protéines issues de la fusion *BCR::ABL*.

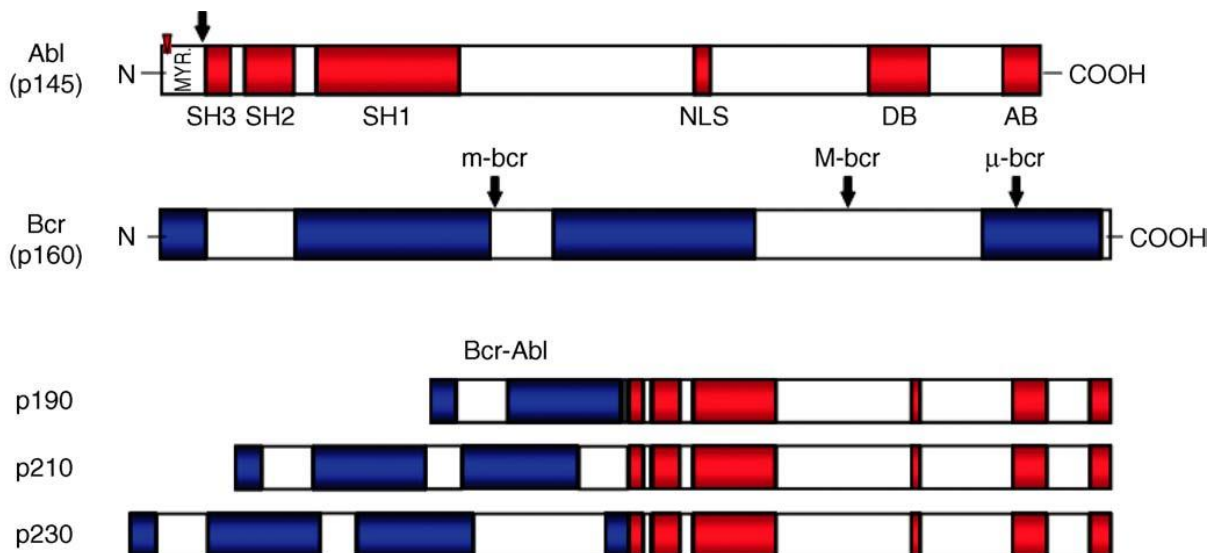


Figure 7: Variantes protéiques *BCR::ABL1* (26).

Différentes protéines issues de la fusion des gènes *BCR* et *ABL1*. Le point de cassure sur le gène *ABL1* a trois possibilités de fusion avec le gène *BCR* selon la localisation du point de cassure conduisant à trois protéines possibles, de tailles différentes.

2.1.4.2.4. Mécanismes moléculaires de fusion *BCR::ABL1*

L'oncogène *BCR::ABL1* est doté d'une forte activité enzymatique tyrosine kinase qui est à l'origine de la transformation leucémique (20). Elle est capable de phosphoryler un nombre important de substrats et activer de multiples voies de signalisation telles que celles de RAS, Signal Transducteurs and Activators of Transcription (STAT), Jun N-terminal (JNK), Myelocytomatosis Oncogene (MYC), et Phosphatidylinositol-3 Kinase (PI-3K). L'activation de ces voies de signalisation entraîne une croissance excessive, une non différenciation cellulaire et une résistance à l'apoptose des cellules (33) (Figure 8). Trois principaux mécanismes sont impliqués dans la transformation maligne des cellules avec la protéine *BCR::ABL1*: une diminution de l'adhésion des cellules à *BCR::ABL1* aux cellules de stroma de la moelle qui a des conséquences sur la prolifération cellulaire; une activation des voies de signalisation mito-géniques, donc une perte de contrôle de la myéloprolifération; et un troisième mécanisme qui est la diminution de l'apoptose des cellules à *BCR::ABL1*. De plus, la présence de la fusion *BCR::ABL1* inhibe la réparation de l'ADN, causant une forte instabilité génomique.

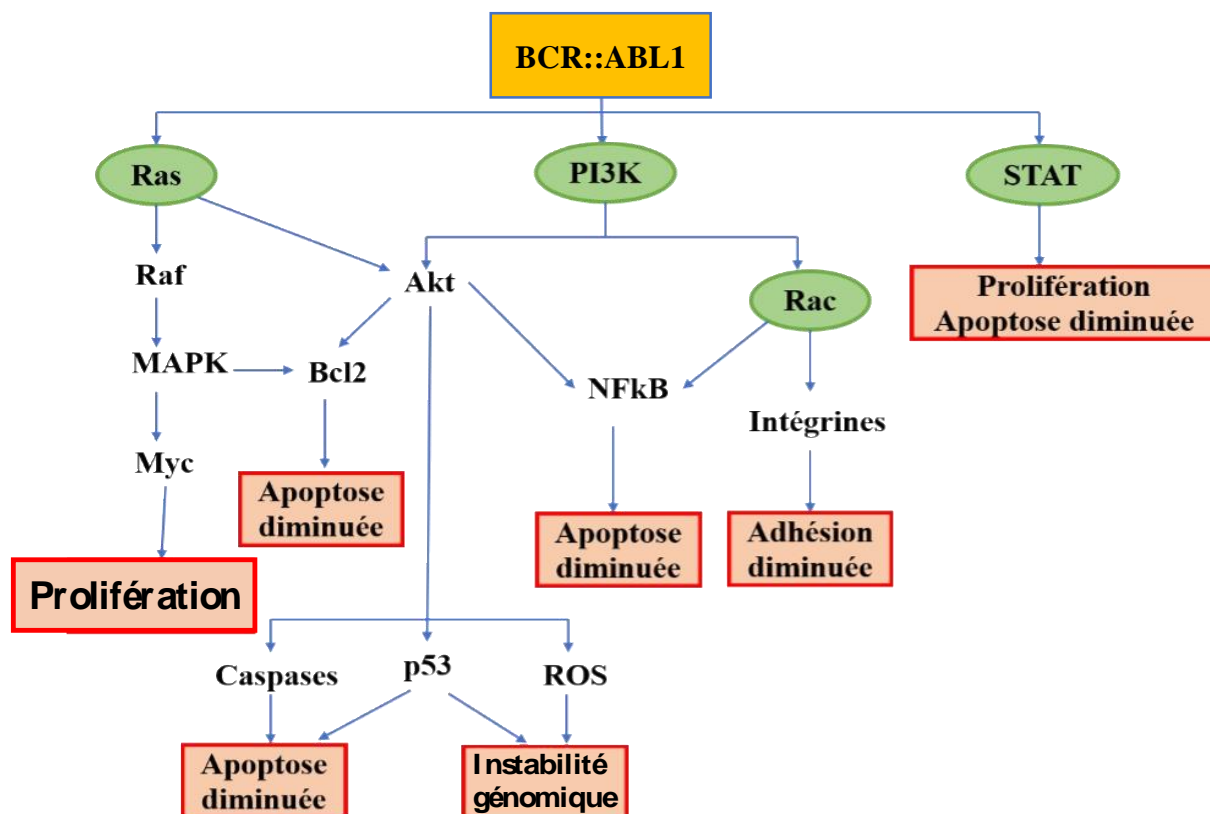


Figure 8: Représentation des voies de signalisation activées par *BCR::ABL1* (30).

L'activation de la voie RAS conduit à l'activation de la cascade de la voie de signalisation des « Mitogen Activated Protein Kinase » (MAPK) qui implique les voies de

signalisation Rat Fibrosarcoma (RAF)/Map Kinase Erk Kinase (MEK)/ERK (Extracellular-signal-Regulated Kinase) et JNK. La conséquence est une activation de la prolifération et une diminution de l'apoptose (34).

L'activation des voies STAT en particulier STAT5, est responsable du potentiel anti-apoptotique de la protéine BCR::ABL1 (35,36).

Le PI-3K s'associe à la protéine BCR::ABL1 et active cette voie de signalisation dans les cellules leucémique. L'activation confère une activité anti-apoptotique au B-cell lymphoma-extra large (BclXL) et l'induction d'une instabilité génomique suite à l'activation de la protéine TP53 (37). Ainsi, les voies STAT et PI-3K semblent être directement impliquées dans l'activité anti-apoptotique des oncogènes *BCR::ABL1* qui semblent bloquer l'apoptose induite par divers stimuli en agissant en amont de la procaspase 3 (38,39).

2.1.4.2.5. Activité tyrosine kinase de la protéine BCR::ABL1

L'activité tyrosine kinase de la protéine ABL1 est bien régulée dans les conditions physiologiques. La nouvelle protéine de fusion résultant de la fusion BCR::ABL1 entraîne une activation accrue tyrosine kinase conduisant à l'activation des voies de signalisation impliquées dans les processus de proliférations, d'apoptose, de différenciation et d'adhésion cellulaire (40).

La fusion BCR::ABL1 contient plusieurs domaines fonctionnels provenant du gène *ABL1*. À l'extrémité N-terminale de la fusion se trouve le domaine d'oligomérisation de *BCR*, qui assure constitutivement la propriété tyrosine kinase d'ABL1. Cette tyrosine kinase ainsi activée constitutivement conduit à la phosphorylation de nombreux substrats qui sont activés permanemment, entraînant la prolifération cellulaire, la résistance à l'apoptose, et les phénomènes d'adhésion. (32).

2.1.5. Diagnostic

2.1.5.1. Diagnostic positif

2.1.5.1.1. Circonstances de découverte

La LMC est une maladie d'évolution lente avec des symptômes peu caractéristiques. En occident, chez 40% des patients, la découverte de la maladie est fortuite à l'occasion d'un examen sanguin de routine (41). Généralement des signes indicateurs comme une intense fatigue ou une augmentation du volume de la rate (splénomégalie) peuvent conduire à la réalisation d'un examen sanguin et faire suspecter la LMC.

2.1.5.2. Signes cliniques

La leucémie myéloïde en phase chronique ne représente pas un danger majeur pour le patient. En effet, chez la plupart des patients l'hyperleucocytose est très bien contrôlée avec des agents cyto-réducteurs comme l'hydroxyuré. Les neutrophiles et les plaquettes, bien qu'en nombre anormaux, assurent une fonction quasi normale.

Sans traitement à base d'inhibiteurs de la tyrosine kinase, la maladie progresse inexorablement vers les autres phases de la leucémie myéloïde, à savoir la phase accélérée et la crise blastique (40). La cause de cette évolution reste inconnue, mais certaines théories évoquent plus l'apparition de nouvelles aberrations chromosomiques ou mutations géniques (40). Chacune des trois phases se caractérise par des manifestations cliniques et biologiques bien définies.

2.1.5.2.1.1. Phase chronique

Cette phase est d'installation progressive ; elle dure en moyenne 4 à 5 ans. Elle répond bien aux thérapies ciblées. La survie des patients atteints de LMC à la phase chronique sous thérapies ciblées est similaire à celle de la population générale, toutes tranches d'âge confondues. Le myélogramme dénombre un total de blastes et promyélocytes inférieur à 5% (42). Les signes cliniques sont souvent insidieux et de nombreux patients sont asymptomatiques au moment du diagnostic, qui est suspecté devant un hémogramme réalisé à titre systématique (41).

La symptomatologie de cette phase de la maladie est caractérisée par :

- Une hyperleucocytose
- Des vertiges, l'acouphène, ou des céphalées ;
- Une pesanteur de l'hypochondre gauche ou un ballonnement abdominal ;
- Une douleur osseuse réveillée par la palpation du 5^{ème} espace intercostal (signe de Crower).

Les signes généraux sont peu marqués. Ils sont à type d'asthénie, de fatigabilité, d'amaigrissement et de sudation nocturne.

À l'examen physique, on remarque une pâleur des muqueuses et une splénomégalie. Une hépatomégalie est rarement notée. Comme atteintes cutanées on retrouve des nodules infiltrés peu sensibles non inflammatoires, disséminés et quelque fois érythémateux appelés leucémides (26,43).

2.1.5.2.1.2.Phase d'accélération

Elle correspond à la transition entre la phase chronique et la phase blastique. Sa durée est de 12 à 18 mois en moyenne. Elle peut être quasi inexistante, la phase blastique étant alors « explosive ». Les critères d'accélération qui précède la phase blastique sont variables.

La symptomatologie de cette seconde phase n'est pas assez spécifique. Cette phase correspond souvent à une aggravation des signes cliniques et biologiques observés au début de la maladie ou ceux-ci peuvent être associés à d'autres signes. Les paramètres cliniques, hématologiques, morphologiques et génétiques qui témoignent de la phase accélérée sont consignés dans le Tableau I.

2.1.5.2.1.3.Phase blastique ou crise blastique

Elle survient avec un délai médian de 4 ans après le diagnostic et se définit par la présence de plus de 20 % de blastes médullaires ou sanguins. Elle s'accompagne en général d'une majoration des signes cliniques d'accélération (altération de l'état général, splénomégalie, anémie, thrombopénie, fibrose médullaire) et parfois d'une symptomatologie spécifique: fièvre, hépatomégalie, adénopathies et douleurs osseuses (26). La plupart des patients atteints de LMC en phase accélérée ou blastique présentent des anomalies chromosomiques supplémentaires, comme un double chromosome Ph, une trisomie 8 ou un iso chromosome 17 (26).

2.1.5.3. Signe biologique

2.1.5.3.1. Bilan hématologique

2.1.5.3.1.1. Phase chronique

2.1.5.3.1.1.1. Hémogramme

L'hémogramme ou la numération formule sanguine (NFS) est l'examen le plus important car il permet à lui seul d'évoquer le diagnostic. Une hyperleucocytose, une anémie et une thrombocytose sont les anomalies sanguines les plus souvent rencontrées dans la LMC.

La NFS peut montrer une hyperleucocytose entre 12 à 1000 x 10⁹/L avec une médiane de ~80 x 10⁹/L (44) à prédominance neutrophiles. Les blastes constituent moins de 2% de la proportion leucocytaire. On peut rencontrer une monocytose. Le nombre des plaquettes peut être normal ou augmenter jusqu'à $\geq 1000 \times 10^9/L$, mais une thrombocytopénie marquée n'est pas commun en phase chronique (44,45).

2.1.5.3.1.1.2. Myélogramme

Le myélogramme confirme le syndrome myéloprolifératif et souvent le stade de la maladie. Il montre une hypercellularité médullaire (Figure 9) avec une hyperplasie granuleuse marquée. La population de blaste médullaire est inférieure à 5 % en phase chronique. On peut trouver, comme dans le sang, une basophilie voire une éosinophilie. Les mégacaryocytes sont souvent en nombre augmenté et de petite taille. Le myélogramme permet de donner des indications pour réaliser le caryotype (3).

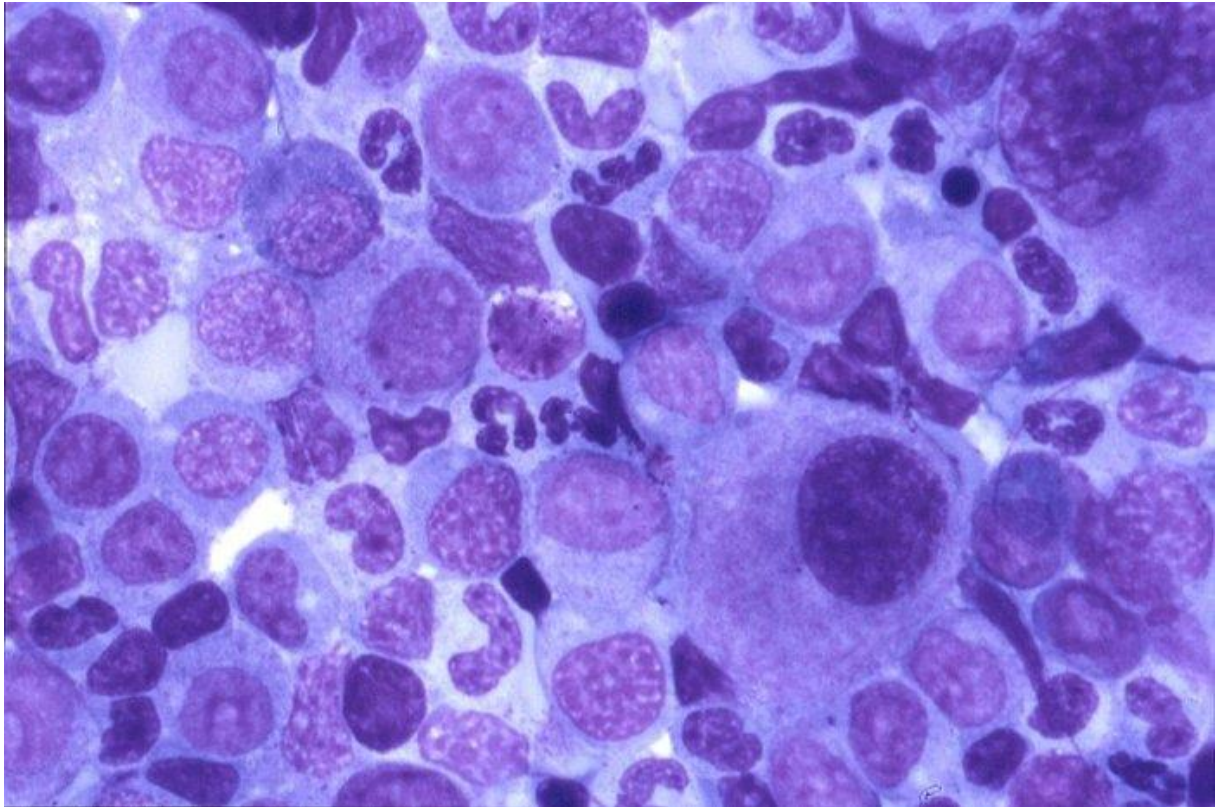


Figure 9: Cytologie médullaire d'une LMC (46).

Augmentation de la densité cellulaire et une augmentation de la proportion des myélocytes.

2.1.5.3.1.2. Phase d'accélération

Les critères diagnostics de la phase d'accélération (PA) sont définies par les recommandations de l'OMS de 2016 (47) et de l'European Leukemia Net (ELN) en 2013 (48) tableau I. En fait, dans la dernière version de ELN, celle de 2020, la délimitation entre la phase chronique et la phase accélérée n'est pas clairement décrite, par conséquent la recommandation de 2013 est toujours d'actualité pour la définition de la phase accélérée (49).

Tableau I : Critères diagnostiques de la phase accélérée selon l’OMS et ELN (47,48).

Critères	OMS 2016	ELN 2013
Blastes au niveau du sang périphérique ou moelle	10 – 19%	15 – 29% ou blastes + promyélocytes (sang ou moelle) >30% avec blastes < 30%
Basophiles au niveau du sang périphérique	≥ 20%	≥ 20%
Thrombopénie persistante et non liée au traitement	< 100 x 10 ⁹ /L	< 100G/L
Apparition d’anomalies clonales dans les cellules Ph1+ au diagnostic	<ul style="list-style-type: none"> - Second chromosome Philadelphie - Trisomie 8 - Iso chromosome 17q - Trisomie 9 - Caryotype complexe - Anomalies du 3q26.2 	Présent
Apparition d’anomalies clonales dans les cellules Ph1+ pendant le traitement	Aucune	Présent
Augmentation du volume splénique ou augmentation du nombre de globules blancs ne répondant pas au traitement	Présent	

2.1.5.3.1.3. Phase blastique

Les critères clinico-biologiques de la phase blastique sont aussi établis par L’OMS et ELN (Tableau II). Dans deux tiers (2/3) des cas, la transformation se fait sous une forme myéloïde et dans un tier (1/3) des cas sous une forme lymphoïde.

Tableau II : Critères diagnostiques de la phase blastique selon l’OMS et ELN (50,51).

Critères	OMS 2016	ELN 2013
Blastes au niveau du sang périphérique ou de la moelle	≥ 20 %	≥ 30 %
Prolifération blastique extra médullaire (sauf rate)	Présent	Présent

2.1.5.3.2. Bilan génétique

2.1.5.3.2.1. Caryotype standard

Il est réalisé sur le produit d’une aspiration de moelle osseuse ou du sang périphérique (52). C’est l’examen de référence pour mettre en évidence le chromosome Ph. De plus, la quantification du nombre de métaphases Ph positives est un critère majeur de la réponse au traitement. Le caryotype permet aussi de détecter les anomalies cytogénétiques additionnelles structurales, témoin d’une évolution clonale (un autre chromosome Philadelphie, une trisomie 8, ou un isochromosome 17q). Ces anomalies peuvent être complexes, impliquant plus de 2 chromosomes, ou cryptiques, insertions ou délétion, limitant ainsi le pouvoir diagnostique du caryotype (53). Les anomalies chromosomiques complexes au caryotype sont des facteurs de mauvais pronostic et très généralement associées à une accélération de la maladie vers la phase blastique dont l’issue est très souvent fatale (54).

Le caryotype comporte quand même quelques limitations. Il peut être chronophage lorsque l’index mitotique est très faible ou en présence d’anomalies chromosomiques complexes. Pour remédier à ces limitations, on peut recourir à l’Hybridation *in situ* par Fluorescence (FISH) multi couleur sur métaphase.



46,XX,t(9;22)(q34;q11) : translocation typique de la leucémie myéloïde chronique

Figure 10: Chromosome Ph au caryotype (55) à la phase chronique de la LMC, montrant un chromosome 22 raccourci correspondant au chromosome Philadelphie et un chromosome 9 plus long le dérivé 9 (der9).

2.1.5.3.2.2. Hybridation *in situ* par fluorescence (FISH)

La FISH n'est pas systématique dans le diagnostic de la LMC, mais elle est nécessaire dans le cas des LMC à chromosome Ph négatif, et doit être couplée au caryotype dans des conditions particulières. Par exemple, la FISH peut être indiquée lorsque l'anomalie chromosomique est trop complexe pour visualiser un chromosome Ph ou en absence de mitose après la culture cellulaire.

La technique est basée sur la propriété des séquences de l'ADN de se fixer spécifiquement à leurs séquences complémentaires (56). On utilise des sondes à locus spécifiques (LSI) des gènes *BCR* (chromosome 22) et *ABL1* (chromosome 9) pour la détection de la fusion *BCR::ABL1* sur des métaphases ou des noyaux interphasiques. La FISH- *BCR::ABL1* permet d'indiquer les points de cassures des segments chromosomiques impliqués dans la génération des dérivés 9 et 22 sur des métaphases. Un autre avantage de cette technique est l'évaluation d'un nombre important de noyaux interphasiques présentant la fusion *BCR ::ABL1*.

Ainsi, on peut faire le suivi de la réponse thérapeutique des patients en absence de la PCR-quantitative.

Généralement pour le diagnostic clinique, on utilise la sonde *BCR::ABL1* de Vysis (Abott Molecular, US) qui est approuvée par la « Food and Drug Administration ». Cette sonde est constituée de deux sondes (Figure 11A) spécifiques aux loci *BCR* (marqué par le fluorochrome vert) et *ABL1* (marqué par le fluorochrome rouge) (22). Dans une cellule normale, on observe quatre couleurs dont deux rouges et deux vertes en quatre endroits différents du noyau. En présence, de fusion *BCR::ABL1*, on observe alors une superposition rouge/verte donnant une couleur tirant vers le jaune (Figure 11C et 11D).

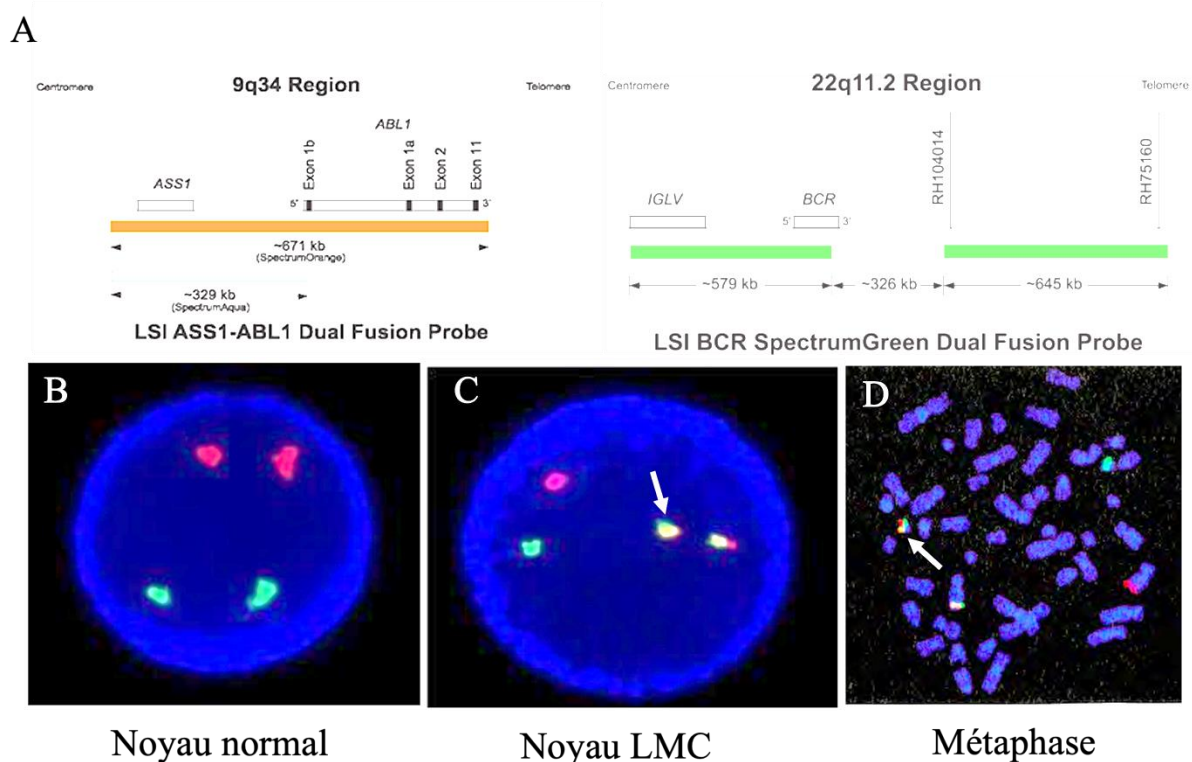


Figure 11 : FISH *BCR::ABL1*.

Gène *BCR* (spot vert), *ABL1* (spot rouge) fusion (spot jaune) (22). A: zone de couverture des deux sondes *ABI* (couleur orange) et *BCR* (couleur vert)

(site web : <https://www.molecular.abott/int/en/chromosome/22.html>), B: un noyau avec les signaux normaux, C: noyau interphasique à Ph positif, D: Métaphase à Ph positif indiqué par la flèche blanche.

La technique FISH par rapport au caryotype est sa sensibilité plus élevée pour le diagnostic et le suivi, sa capacité à 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. Un des intérêts majeurs de la technique FISH dans la LMC est la détection de signaux atypiques de fusion et des variants Philadelphie lorsqu'elle est faite sur des métaphases.

La FISH *BCR::ABL1* a d'autres intérêts que le diagnostic. Elle permet de déterminer le profil des signaux de la fusion atypiques, et ce profil peut être caractérisé à partir des noyaux interphasiques ou sur des métaphases. Les signaux de fusion atypiques indiquent la présence de points de cassures autres que ceux rencontrés couramment sur *ABL1* ou *BCR*. En outre, les signaux de fusion atypiques peuvent orienter sur la recherche des variants de la translocation t(9;22).

2.1.5.3.2.2.1. Signaux atypiques de la fusion *BCR::ABL1*

Des études ont montré que la fréquence des signaux atypiques de fusion peut varier de 18-25% dans la population des patients souffrant de LMC (57). Plusieurs profils signaux atypiques ont été rapportés (Figure 12) et certains d'entre eux ont été associés à une résistance primaire aux ITKs. Leur détermination au diagnostic s'avère donc essentiel pour la prise en charge des patients.

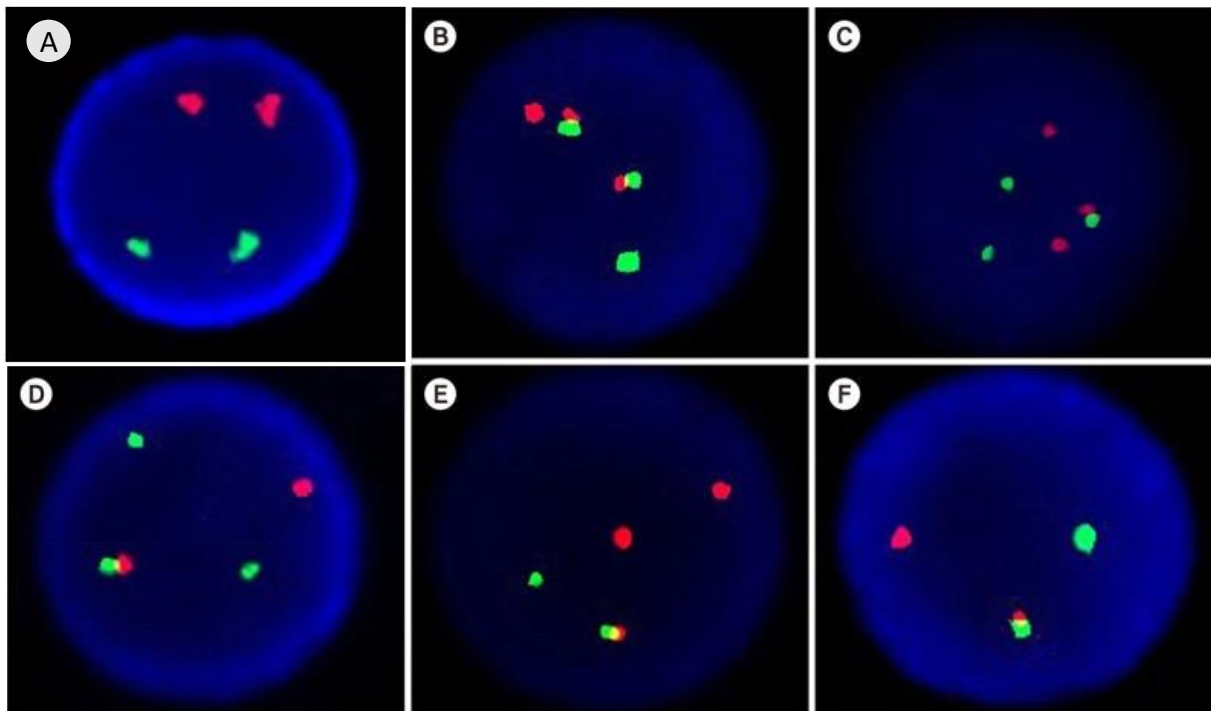


Figure 12: Modèles de signaux atypiques FISH *BCR::ABL* (58).

(A) Cellule négative, 2R2G, (B) noyaux d'interphase portant une translocation typique (9;22), 2F1R1G, (C) variante t(9;22), 1F2R2G, (D) délétion *ABL1*, 1F1R2G, (E) Suppression *BCR*, 1F2R1G, (F) Suppression *ABL1::BCR*, 1F1R1G.

2.1.5.3.2.2.2. B. Variants de la translocation t(9;22)

La LMC est caractérisée par la présence de la translocation t(9;22)(q34.1;q11.2) conduisant à la formation du chromosome Philadelphie qui est présent sur les caryotypes de

90% des patients souffrant de la LMC (59). On peut retrouver chez 5-10% des patients des variants de la translocation t(9;22) qui peuvent être objectivés par le caryotype ou la technique d'hybridation *in situ* par Fluorescence (FISH). Les variants de translocation t(9;22) sont définis comme étant des réarrangements impliquant le dérivé 9 der(9) ou le dérivé 22 der(22) avec un chromosome autre que les chromosomes 9 ou 22.

Les variants de la translocation t(9;22) sont différents des anomalies chromosomiques additionnelles qui surviennent au cours de la progression de la LMC. Les variants de la translocation t(9;22) peuvent être simples ou complexes lorsqu'un seul ou plusieurs chromosomes additionnels, respectivement, sont impliqués au niveau des dérivés 9 ou 22 (60) (figure 12). Ces variants de translocation sont matérialisés par divers types de signaux de fusion lors du diagnostic par la technique FISH.

Le mécanisme de survenu de ces variants n'est totalement pas élucidé (61). Généralement, l'occurrence des variants de translocation peut s'expliquer par un mécanisme à une étape ou à deux étapes (Figure 13A et 13B). Le mécanisme en une étape survient lorsque la cassure chromosomique se produit simultanément sur 3 ou plus de 3 chromosomes conduisant respectivement à une translocation à 3 voies ou plus de 3 voies. Le mécanisme en 2 étapes consiste en une translocation séquentielle impliquant la translocation standard t(9;22) suivie d'une seconde translocation impliquant d'autres chromosomes (62). La technique FISH BCR::ABL1 associée au caryotype standard ou spectral (M-FISH) sont utilisés pour déterminer le mécanisme des variants de la translocation t(9;22) dans la LMC.

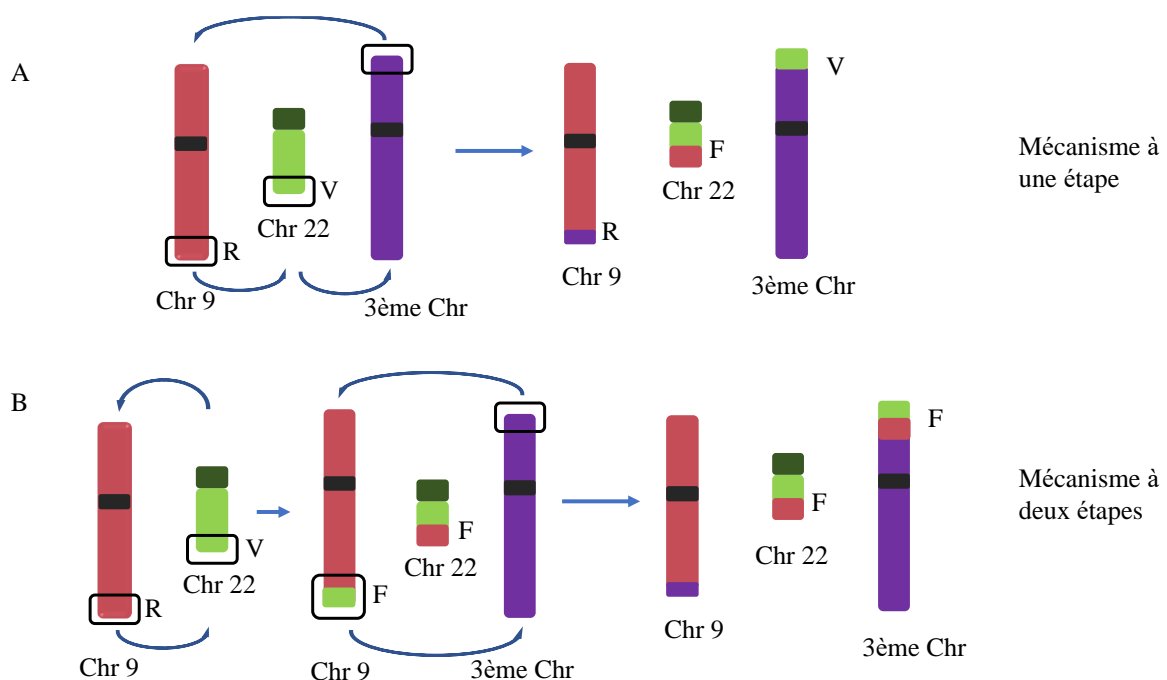


Figure 13: Mécanisme de formation des variants de translocation t(9;22).

(A) le mécanisme en une étape et celui en deux étapes en (B). Les lettres indiquent la couleur des sondes utilisées lors de la technique FISH: R pour rouge, annotant la région du gène *ABL1*; V pour vert, correspondant à la région du gène *BCR*; et F pour fusion *BCR::ABL1*.

Certaines études récentes ont suggérées que des patients avec des variants de translocation t(9;22) ont un mauvais pronostic comparé à ceux ayant la translocation classique (63–65), alors que d'autres rapportent aucun impact des variants de translocation t(9;22) sur le pronostic des patients traités par l'Imatinib (66–69).

2.1.5.3.2.3. Quantitative Polymérase Chaîne Réaction (RQ-PCR)

La Q-PCR permet la quantification du transcrite *BCR::ABL1* dans un but de diagnostic et de suivi thérapeutique. D'abord, on produit le c-DNA du transcrite *BCR::ABL1* en faisant la transcriptase reverse et ensuite on amplifie ce c-DNA par la Q-PCR. Cette approche technique permet de quantifier les ARN messagers *BCR::ABL1* avec une sensibilité et une spécificité remarquable (52). Cette technique est aujourd'hui tout à fait standardisée (réseau Europe Against Cancer, EAC) et des recommandations concernant l'harmonisation de sa méthodologie sont établies (48).

Elle permet de définir le sous-type moléculaire produit. Cet examen est aujourd'hui indispensable au diagnostic de LMC et 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. A l'heure actuelle c'est l'examen de choix pour le suivi moléculaire des patients atteints de LMC (70).

2.1.6. Diagnostic différentiel

Il se fait avec les pathologies suivantes: les myélémies réactionnelles (71), LMMC (leucémie myéomonocytaire chronique) de l'adulte, la splénomégalie myéloïde ou myélofibrose primitive, la polyglobulie de Vaquez (5), et la thrombocytopenie essentielle isolée avec une hyperleucocytose modérée. En l'absence du chromosome Philadelphie (en faveur de la LMC), on procède à un diagnostic par élimination des autres syndromes myéoprolifératives.

2.1.7. Scores pronostics

À l'ère actuelle des thérapies ciblées des inhibiteurs de la tyrosine kinase (ITKs), l'indicateur pronostique le plus important est la réponse au traitement aux niveaux hématologique, cytogénétique et moléculaire. Cependant, les scores de risque basés sur les

résultats cliniques et hématologiques (score de Sokal, l'indice de Hasford ou score EURO, et le score EUTOS) sont également valables (Tableau III), chez les patients à faible risque répondant aux ITKs nettement mieux que les patients à haut risque (72–74). Le Score de Sokal est le reflet de la masse tumorale et le potentiel évolutif de la maladie. Il doit être effectué au diagnostic et avant tout traitement (22). Il est l'indice le plus utilisé à l'heure actuelle, car le plus discriminant concernant l'indication de l'imatinib, même si d'autres scores ont été proposés depuis.

Tableau III: Calcul des risques pronostics (7).

Score de risque	Méthode de calcul	Catégorie de risque
Score de Sokal	$\text{Exp } 0.0116 \times (\text{âge} - 43.4) + 0.0345 \times (\text{rate} - 7.51) + 0.188 \times [(\text{nombre de plaquette} \div 700)^2 - 0.563] + 0.0887 \times (\text{blasts} - 2.10)$	Faible <0.8
		Intermédiaire 0.8 – 1.2
		Élevé >1.2
Score Hasford (EURO)	$(0.6666 \times \text{âge} [0 \text{ quand âge} < 50 \text{ ans}; 1, \text{ autre}] + 0.042 \times \text{rate} [\text{cm sous la marge costale}] + 0.0584 \times \text{pourcentage de blasts} + 0.0413 \times \text{pourcentages éosinophiles} + 0.2039 \times \text{basophiles} [0 \text{ quand basophiles} < 3\%; 1, \text{ autre}] + 1.0956 \times \text{nombre de plaquette} [0 \text{ quand plaquette} < 1500 \times 10^9/\text{L}; 1, \text{ autre}] \times 1000$	Faible ≤ 780 Intermédiaire $> 780 - \leq 1480$ Élevé > 1480
Score EUTOS	$0.0025 \times (\text{âge}/10)^3 + 0.0615 \times \text{rate cm sous la marge costale} + 0.1052 \times \text{blasts dans le sang périphérique} + 0.4104 \times (\text{nombre plaquette}/1000)^{0.5}$	Faible ≤ 1.5680 Intermédiaire $> 1.5680 \text{ but } \leq 2.2185$ Élevé > 2.2185

2.1.8. Traitement

Le traitement en phase chronique a pour objectif la rémission hématologique rapide et surtout l'éradication la plus complète que possible des cellules porteuses de la translocation t(9 ;22) et une rémission moléculaire majeure voir profonde. Les différents types de réponse au traitement par les ITKs, issus des résultats chez le sujet adulte, ont fait l'objet de recommandations par l'ELN (European Leukemia Net) (48).

2.1.8.1. 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 (75):

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

2.1.8.2. Thérapie ciblée

Les ITKs ont révolutionné le traitement de la LMC et ce depuis le 15 janvier 2002, date de l'AMM du GLIVEC® (Imatinib mesylate). Ils ont permis l'obtention de réponses

hématologiques complètes, de réponses cytogénétiques complètes et même de réponses moléculaires majeures (76).

2.1.8.2.1. ITK de première génération : Imatinib (Glivec™)

Mécanisme d'action

La connaissance de la biologie moléculaire de la LMC et du rôle central de l'activité aberrante de la protéine BCR::ABL1 a conduit au développement des thérapies ciblant spécifiquement cette protéine. L'imatinib est une petite molécule active par voie orale et qui inhibe spécifiquement l'activité tyrosine kinase de la protéine BCR::ABL1. Elle s'encastre dans la poche ATP de la protéine, bloque l'accès aux molécules d'ATP et inhibe ainsi la phosphorylation des protéines avec un résidu tyrosine impliquées dans la transduction de signaux (75) (Figure 14). L'imatinib possède également un anti-PDGFR et un antirécepteur c-kit mais une activité quasi nulle sur les autres tyrosines kinases (75).

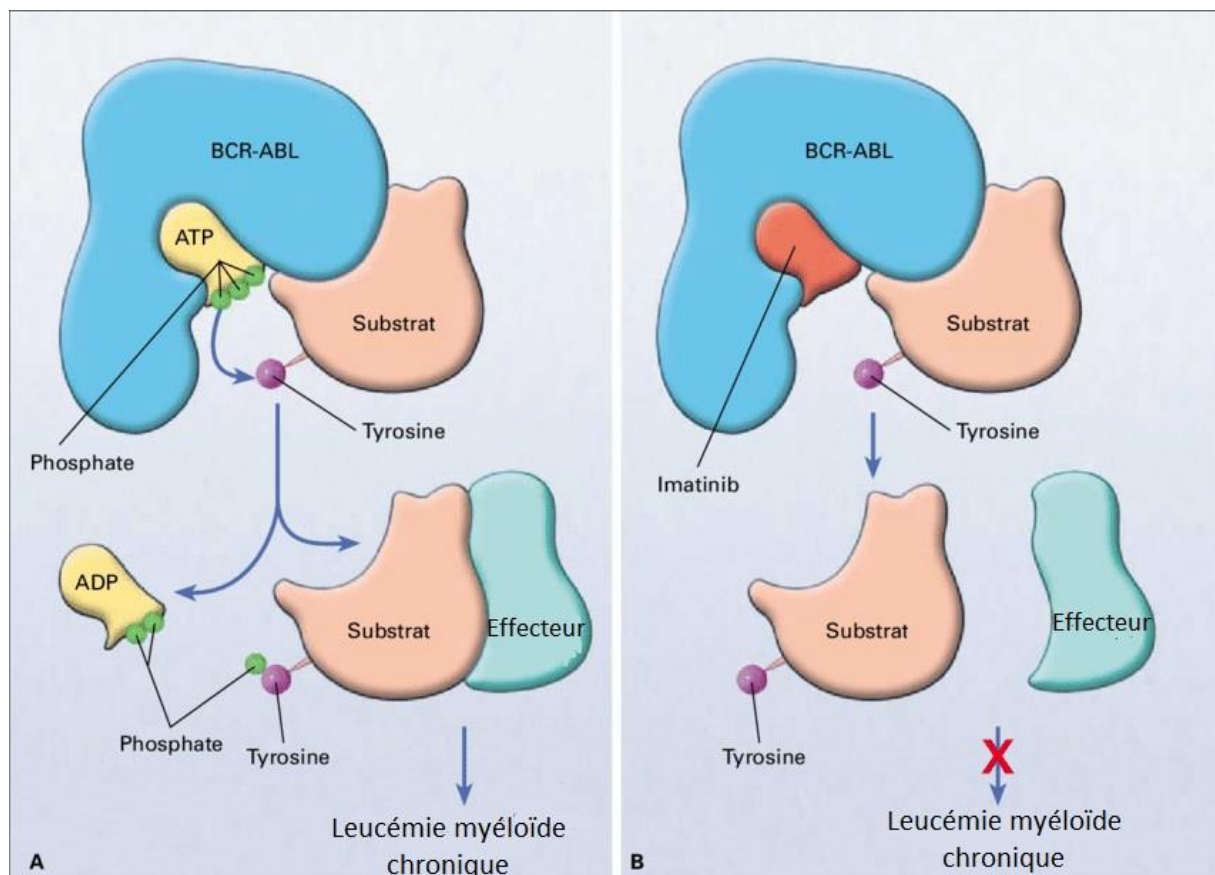


Figure 14: Mécanisme d'action de l'Imatinib Mésylate sur BCR::ABL1 (77).

A gauche (A): l'onco-protéine BCR::ABL1 avec une molécule d'ATP dans la poche à kinase. Le substrat peut être phosphorylé sur le résidu tyrosine, être ainsi activé avec d'autre effecteur. A droite

(B) l'imatinib occupe la poche à kinase ou l'action du BCR::ABL1 est inhibée prévenant la phosphorylation de son substrat.

2.1.8.2.2. ITK de deuxième génération

Dasatinib : SPRYCELL®

C'est un inhibiteur puissant, plus de 300 fois l'activité in vitro de l'imatinib. Il est actif sur la plupart des mutations de la protéine BCR::ABL, sauf la T315I (75). Le dasatinib peut également être un recours lors des résistances à l'imatinib provoquées par l'hyper-expression de BCR::ABL1 et du gène *MDR*. Il est indiqué dans la LMC en phase chronique, accélérée ou blastique, en cas de résistance ou d'intolérance à un traitement antérieur incluant l'imatinib (78). Comme l'imatinib, la seule contre-indication absolue est l'hypersensibilité au dasatinib et à l'un de ses excipients.

Nilotinib : TASIGNA®

Il se présente sous forme de gélules dosées à 200 mg et 150mg. Il est indiqué dans la LMC en phase chronique et accélérée, chez les patients résistants ou intolérants à l'imatinib (79). Le nilotinib est un puissant inhibiteur de l'activité tyrosine kinase, ayant une forte affinité pour le site ATP de la kinase. Il est 25 fois plus puissant in vitro que dasatinib (75). La dose de 400 mg deux fois par jour à 12h d'intervalle est indiquée en cas de LMC nouvellement diagnostiquée en phase chronique.

Bosutinib : BOSULIF®

ITK de 2^{ème} génération, le Bosutinib est un inhibiteur puissant de la tyrosine kinase, avec une sélectivité importante. Dans un essai clinique récent de phase II concernant 283 patients intolérant ou résistant à l'Imatinib, traités par Bosutinib 500 mg une fois par jour, on observait 79% de réponse hématologique complète (RHC), 40% de réponse cytogénétique majeure (RCyM) dont 24% de réponse cytogénétique complète (RCyC) chez les patients résistants évaluable, et chez les patients intolérants évaluable 76% obtenaient une RHC, 59% de RCyM dont 50% de RCyC avec un recul maximal de 28 mois (durée médiane de traitement 7,7 mois chez les patients intolérants et 4,5 mois chez les patients résistants) (80–82).

2.1.8.2.3. ITK de troisième génération : Ponatinib ICLUSIG®

Le Ponatinib est le seul ITK actif chez les patients porteurs de certaines mutations induisant une multi résistance, notamment la mutation T315I de *BCR::ABL1* (80). Il pourrait en particulier, grâce à son activité pan inhibitrice, prévenir l'émergence de résistances (83).

2.1.8.3. Évaluation de la réponse au traitement

2.1.8.3.1. Réponse hématologique

Elle est définie comme une normalisation de la NFS, des globules blancs $< 10 \times 10^9/L$, pas de myélémie, une thrombocytose $< 450 \times 10^9/L$, et la disparition de tous les symptômes et signes cliniques de la maladie, en particulier la splénomégalie. Cependant, il existe des critères qui définissent une partie de la réponse hématologique: les globules blancs sont réduits de moitié jusqu'à une leucocytose inférieure à $200 \times 10^9/L$, ou une NFS est normalisée et une thrombocytose $> 450 \times 10^9/L$ ou une myélémie ou une splénectomie (50).

2.1.8.3.2. Réponse cytogénétique

Elle a été répartie en quatre sous-groupes selon la proportion de cellules portant le chromosome Ph lors de l'analyse du caryotype (84):

- Réponse cytogénétique complète (RCyC) : 0% de chromosome Ph.
- Réponse cytogénétique majeur (RCyM) : entre 0 et 35% Ph+ métaphases
- Réponse cytogénétique partielle (RCyP) : 1% et 34% Ph+ métaphases
- Réponse cytogénétique mineure (RCymin) : entre 35 et 90% Ph+ métaphases
- Pas de réponse cytogénétique ou échec : 100% Ph+ métaphases

2.1.8.3.3. La réponse moléculaire

On utilise l'approche Q-PCR pour quantifier le transcrite de *BCR::ABL1/ABL1*. Lorsqu'un rapport négatif est observé dans un laps de temps donné, il y a une réponse moléculaire complète, c'est-à-dire une réduction d'au moins 3log par rapport à la valeur initiale (50).

- La réponse moléculaire majeure : $RMM3 (BCR::ABL1) \leq 0,1 \%$
- La réponse moléculaire RMM4 ($BCR::ABL1$) $\leq 0,01 \%$
- La réponse moléculaire RMM4.5 ($BCR::ABL1$) $\leq 0,0032\%$
- La réponse moléculaire RMM5 ($BCR::ABL1$) $\leq 0,001 \%$

Le tableau IV résume les réponses à l'imatinib selon les définitions de l'European Leukemia Net (ELN) en 2013.

Tableau IV: Réponse aux inhibiteurs de la tyrosine Kinase (ITK) en première ligne de traitement (48).

Moment	Réaction optimale	Alerte	Échec
Diagnostic	NA	Risque élevé ou perte de la RHC sous imatinib ; défaut de RCyC en 1 ère ligne	NA
3mois	$BCR::ABL1 \leq 10\%$, et/ou Ph+ $\leq 65\%$	$BCR::ABL1 > 10\%$, et/ou Ph+ 65 à 95%	Pas de RHC, et/ou Ph+ $> 95\%$
6mois	$BCR::ABL1 < 10\%$, et/ou Ph+ $< 35\%$	Ph+ 35% a65%	$BCR::ABL1 > 10\%$ et/ou Ph+ $> 65\%$
12mois	$BCR::ABL1 < 1\%$ et/ou Ph+ $< 0\%$	$BCR::ABL1$ 1 a10 %, et/ou Ph+1 à 35%	$BCR::ABL1 > 10\%$ et/ou Ph+ $> 35\%$
À tout moment	Gène $BCR::ABL1$ $\leq 0,1\%$	CCA/Ph-(-7ou-7q) ou $BCR::ABL1 > 0$,1 %,	-Perte de RHC -Perte de RCYC -Perte confirmée de la RMM -Mutations -CCA/PH+

Le tableau V résume les réponses aux ITK2 selon les définitions de l'European Leukemia Net (ELN) en 2013.

Tableau V : Définition de la réponse aux inhibiteurs de la tyrosine Kinase (ITK) en seconde ligne de traitement (48).

Moment	Réaction optimale	Alerte	Échec
Diagnostic	NA	Risque élevé ou CCA/Ph+	NA
3mois	$BCR::ABL \leq 10\%$ et/ou Ph+ $\leq 35\%$	$BCR::ABL > 10\%$, et/ou Ph+ 36 à 95%	Pas de RHC, et/ou Ph+ $> 95\%$
6mois	$BCR::ABL < 1\%$ et/ou Ph+ 0	$BCR::ABL$ 1 et 10 %, et/ou Ph+1 35%	$BCR::ABL > 10\%$ et/ou Ph+ $> 35\%$
12mois	RMM ($BCR::ABL$) $\leq 0,1\%$	$BCR::ABL$ 0,1 et 1 %	$BCR::ABL > 1\%$ et/ou Ph+ $> 0\%$
À tout moment	RMM ($BCR::ABL$) $\leq 0,1\%$	CCA/Ph-(-7ou-7q)	-Perte de RHC -Perte de RCYC -Perte confirmée de la RMM -Mutations -CCA/PH+

2.2. Biologie normale des Télomères humains

2.2.1. Définition

Chez l'homme, les télomères sont les extrémités des chromosomes constituées de séquences répétées d'ADN (TTAGGG)_n associées à des protéines télomériques et une structure hétérochromatique. Les télomères jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité du génome.

2.2.2. Structure des Télomères

L'ADN télomérique humain est composé d'une séquence répétitive double brin et dont l'extrémité 3' se termine par une extrémité simple brin contenant un nombre variable de séquences télomériques TTAGGG (85). Cette extrémité simple brin s'incruste à travers la séquence double brin pour former une grande boucle, appelée la boucle T (86) et interagit avec le double brin pour former une petite boucle, appelée la boucle D (Figure 16). La boucle T stabilise l'extrémité des chromosomes et la protège pour ne pas être reconnue comme une cassure mono ou bicaténaire d'ADN (Figure 15). La structure de la boucle T protège les télomères contre les enzymes de réparation d'ADN.

Il existe des protéines spécifiques associées aux télomères, et celles-ci interagissent entre elles en stabilisant la boucle télomérique et protégeant ainsi l'extrémité des télomères (figure 16). Le complexe protéique des télomères ou télosome est formé de six protéines qui sont : TERF1 et TERF2 (Telomeric Repeat binding Factor 1 and 2) ; POT1 (Protection of Telomere 1) ; TINF2 (TERF1-Interacting Nuclear protein 2) ; ACD (shelterin complex subunit and telomerase recruitment factor) et TERF2IP (TERF2 interacting protein) (Figure 16) (87). Parmi ces protéines, trois sont liées directement à l'ADN télomérique : TERF1 et TERF2 sont liées à l'ADN double brin télomérique (86), pendant que le POT1 est lié à l'ADN simple brin télomérique en 3' et intervient dans la formation de la boucle D. Les trois autres interagissent avec le télomère par une interaction de type protéine-protéine. TINF2 joue un rôle central dans la formation de la boucle télomérique (shelterin), elle permet de relier et de maintenir ensemble les protéines TERF1, TERF2 et ACD, et se présente comme un pont entre les éléments du complexe télomérique avec l'ADN double brin et simple brin (88). TPP1 relie TINF2 à POT1, et TERF2IP interagit avec le télomère en se liant avec le TERF2.

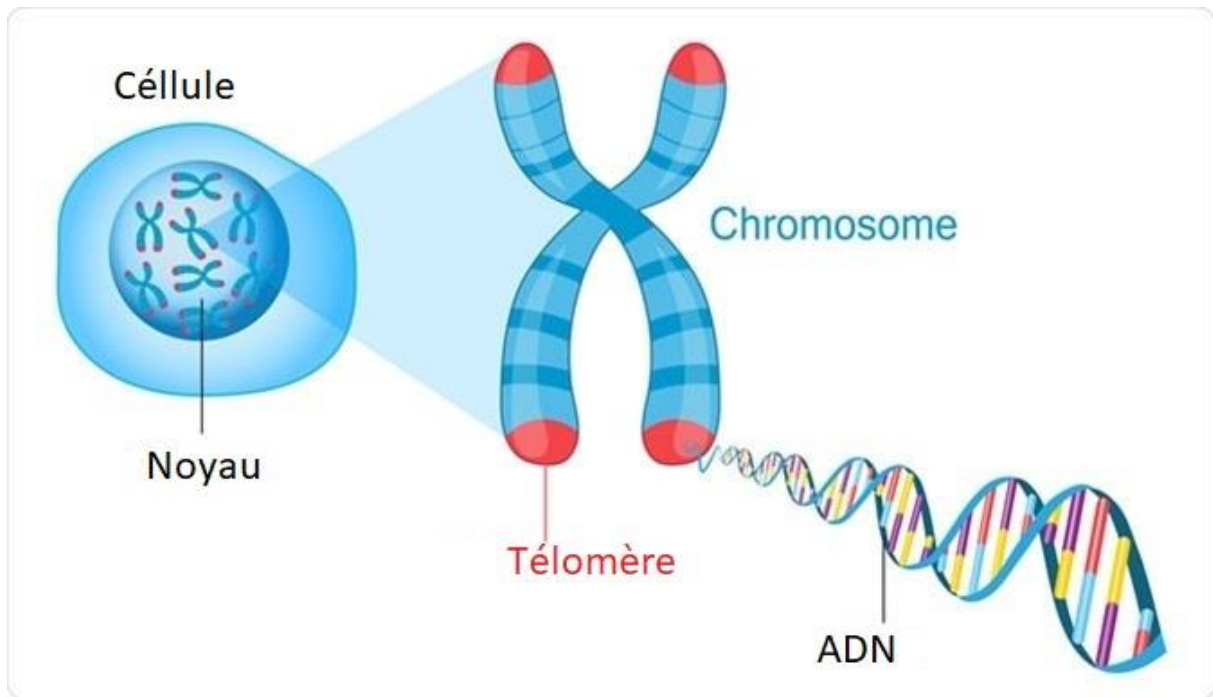


Figure 15 : Structure des télomères (89).

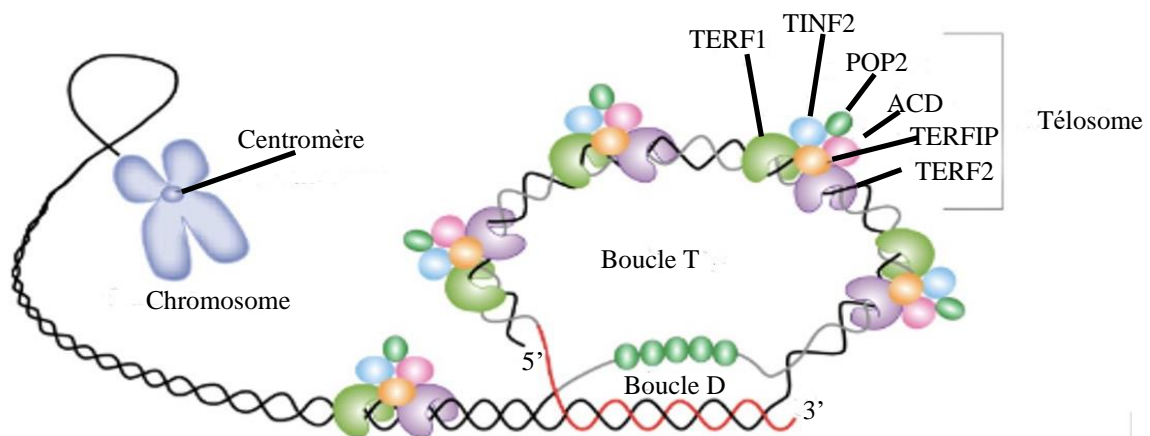


Figure 16 : Boucles et protéines télomérique (90).

2.2.3. Fonction des télomères

Les télomères jouent un rôle fondamental dans la stabilité et l'intégrité du génome. En effet, les télomères protègent les extrémités des chromosomes contre les systèmes de dégradation enzymatique en prévenant qu'ils ne soient reconnus comme des cassures simple ou double brin d'ADN. En outre, avec l'aide de la structure d'ADN des télomères, des protéines du télosome et d'autres protéines associées, les télomères protègent contre les fusions des extrémités chromosomiques qui peuvent entraîner une instabilité génomique. Son rôle de protection de l'intégrité du génome se manifeste par la préservation de celui-ci en évitant la

perte de séquences nucléiques importantes lors des divisions cellulaires. Enfin, les télomères forment de véritables compartiments fonctionnels dans le noyau, en s'associant entre eux et/ou avec d'autres structures nucléaires, comme l'enveloppe et la matrice nucléaire (91). Ces compartiments télomériques peuvent, par exemple, modifier la programmation transcriptionnelle de certains gènes en séquestrant certains facteurs de transcription dans un volume réduit du nucléoplasme (92).

2.2.4. Longueur des télomères

L'une des caractéristiques des cellules humaines est leur perte progressive en nucléotide au niveau de leurs télomères lors des divisions cellulaires (93). La longueur des télomères des cellules humaines a été négativement corrélée avec l'âge de ceux-ci. En effet, les télomères sont considérés comme l'horloge biologique de l'individu parce qu'ils raccourcissent lors du vieillissement (93). La longueur des télomères humains est très hétérogène puisqu'elle varie entre 5 et 15kb. Cette hétérogénéité peut être expliquée par la variation de longueur des télomères en fonction de divers facteurs, notamment l'individu, le type de tissu, la cellule et le bras chromosomique. Cette hétérogénéité peut aussi être influencée par des facteurs génétiques et environnementaux. La perte des séquences télomériques est réduite dans les cellules souches et germinales que dans les somatiques lors de la réplication cellulaire, parce que les cellules souches et germinales ont une activité plus élevée d'une enzyme appelée la télomérase. Elle permet la synthèse des télomères à partir de leurs extrémité 3' et est constituée d'une composante ARN qui sert de substrat pour la synthèse de l'ADN télomérique et d'une protéine qui est la composante catalytique de l'enzyme (94).

2.2.4.1. Longueur moyenne des télomères

La longueur moyenne des télomères est en général déterminée à partir d'un ensemble de cellules représentatives d'un organe, d'un tissu ou d'un groupe de cellules. Ainsi, la longueur moyenne des télomères change en fonction des tissus et des cellules. Par exemple, la longueur moyenne des télomères des cellules du foie fœtal (13 kb) est plus grande que celle des cellules sanguines du cordon ombilical (12 kb) et de la moelle osseuse (8,5 kb) (93). La longueur moyenne des télomères peut être mesurée à partir de l'ADN génomique ou des cellules interphasiques. Des techniques comme le « Southern blot », la Q-PCR, et séquençage du « whole genome » permettent de déterminer la longueur moyenne à partir de l'ADN génomique

(95). Au niveau cellulaire, la technique FISH est la principale approche qu'on utilise pour mesurer la longueur des télomères.

2.2.4.2. Longueur individuelle des télomères

Les télomères sur les bras chromosomiques sont appelés les télomères individuels. Leur longueur varie entre elles d'où son hétérogénéité au sein de la même cellule. Plusieurs études réalisées sur les lymphocytes humains en utilisant la technique quantitative d'hybridation *in situ* par fluorescence (Q-FISH) sur métaphases ont permis l'identification des télomères individuels les plus courts et les plus longs. Par exemple, les télomères sur les bras chromosomiques 17p, 19p, 20q ont été identifiés comme faisant partis des plus courts alors que ceux sur les bras chromosomiques 5p, 3p, 4q, et 1p sont parmi les plus longs (96). La longueur des télomères individuels les plus courts joue un rôle plus important pour la stabilité chromosomique ainsi que la viabilité cellulaire comparé à la longueur moyenne des télomères (97).

2.2.5. Télomère et cancer

Les télomères présents dans les cellules somatiques humaines sembleraient participer à l'oncogenèse. Il existe un système antiprolifératif qui réduit le nombre de division cellulaire (processus de sénescence) et lorsque la cellule perd ce contrôle, cela engendre une persistance des divisions cellulaires entraînant ainsi une perte considérable de l'ADN télomérique et des fonctions qui lui sont associées. De ce processus découleraient une instabilité des chromosomes et une modification de l'architecture nucléaire pouvant entraîner des réarrangements génomiques mais aussi de la modifications de l'expression génétique (98).

2.2.5.1. Longueur individuelle des télomères dans LMC

Une des caractéristiques de la LMC est la présence de télomères courts et le raccourcissement est associé aux différents stades évolutifs de la maladie. En effet, à la phase chronique de la LMC, la longueur moyenne des télomères est de 11,3 kb alors qu'elle est de 9,5 kb lors de la phase accélérée et blastique (99). Malgré ces données importantes sur la longueur moyenne des télomères, on n'avait pas assez de connaissances sur la dynamique du changement des télomères individuels dans la LMC. Deux études récentes ont fait avancées nos connaissances sur la longueur des télomères individuels dans la LMC (6,100). Ces deux études ont mis en évidence des profils différents entre deux groupes, un groupe composé d'individus sains et l'autre composé de patients atteints de LMC à la phase chronique. Dans le groupe leucémique, les télomères individuels sur 18p et Xp représentaient les plus longs tandis que les plus courts

étaient sur les bras chromosomiques 20q, 21p et 21q (6). D'autre part, dans le groupe des individus sains, les télomères sur les bras chromosomiques 17p, 19p et 20q étaient les plus courts tandis que ceux sur 5p, 3p, 4q et 1p étaient les plus longs. Ces résultats démontrent que la longueur individuelle des télomères est différente entre les cellules normales et leucémiques. En outre, ces études ont montré que certains télomères individuels dans la LMC étaient plus longs que leurs correspondants chez les sujets sains, ce qui était un paradoxe car la longueur moyenne des télomères des sujets sains est deux fois plus longue que ceux atteints de LMC (6).

De plus, il serait essentiel d'élucider les différents mécanismes sous-jacents au raccourcissement ou à l'allongement des télomères individuels. La compréhension des rôles éventuels du raccourcissement ou de l'allongement des télomères individuels dans les anomalies chromosomiques, l'expansion clonale et la prolifération cellulaire élargirait nos connaissances sur l'instabilité génomique et la survie cellulaire dans la LMC (93).

2.2.5.2. Mécanisme de maintien des télomères dans la LMC

Le principal mécanisme de maintien des télomères dans la LMC est la télomérase et son activité accroît au cours de l'évolution de la pathologie. L'activité télomérase élevée dans les cellules leucémiques est probablement due à une augmentation du nombre de blastes et a été associée à un mauvais pronostic (6). Une étude récente a suggéré que l'élongation alternative des télomères pourrait également jouer un rôle dans le maintien de la longueur des télomères (97) alors que la télomérase avait jusque alors été proposée comme le seul mécanisme de maintien des télomères dans la LMC. Cette étude a suggéré que les cellules de la LMC utilisent les deux mécanismes de maintien de la longueur des télomères à savoir la télomérase et le voie ALT au cours de la phase chronique. Pendant que la maladie avance vers les autres phases, les cellules utiliseraient les deux mécanismes, mais la télomérase devient plus prédominante selon que la maladie évolue de la phase chronique à la phase blastique (98). Enfin, la voie ALT serait l'explication de la présence de certains télomères individuels longs lors de la phase chronique de la LMC (6,101)

2.2.6. Mesure de la longueur des télomères individuelles par Q-FISH

2.2.6.1. Définition

La technique Q-FISH sur métaphases est une approche cytogénétique moléculaire qui permet l'hybridation de nucléotides télomériques associés à un fluorochrome aux séquences des télomères. La fluorescence émise au niveau de chaque télomère est ainsi quantifiée.

2.2.6.2. But

La technique Q-FISH sur métaphases a pour but de quantifier l'intensité de fluorescence suite à l'hybridation d'une sonde spécifique à la séquence télomérique sur chaque bras chromosomique.

2.2.6.3. Principe

La technique Q-FISH sur métaphase est basée sur l'utilisation d'une sonde télomérique couplée à un fluorochrome qui s'hybride avec la séquence télomérique génomique lorsque celle-ci est rendue en brins monocaténaire. Les conditions d'hybridation rendent facile la complémentarité entre la sonde et la séquence télomérique. Après l'hybridation, des lavages successifs sont réalisés pour éliminer des hybrides non spécifiques. Ensuite, les images digitales de métaphases sont capturées par un microscope à épifluorescence et un logiciel permet de classer les chromosomes et mesurer l'intensité de la fluorescence se trouvant sur chaque bras chromosomique. La mesure de l'intensité de fluorescence télomérique ainsi générée est ensuite corrélée à la longueur des télomères.

2.2.6.4. Avantages et limites

L'avantage majeur de la technique Q-FISH sur métaphases est de pouvoir mesurer la longueur des télomères de chaque bras chromosomique. Ainsi, elle permet de quantifier les télomères sur les 92 bras chromosomiques ou télomères individuels. C'est la seule approche moléculaire qui peut générer autant d'informations sur la longueur des télomères individuels. Ainsi, on peut évaluer la variabilité inter ou intra chromosomique de la longueur des télomères de même que sa variabilité cellulaire. Cette approche moléculaire permet de réaliser une corrélation entre les anomalies chromosomiques et la longueur individuelle des télomères permettant de faire des études sur l'instabilité chromosomique (102).

La technique Q-FISH sur métaphases n'est faisable que sur un échantillon ayant des métaphases de bonne qualité. En plus, la réalisation de la technique nécessite énormément de temps, des outils spécialisés et onéreux, et une maîtrise de la cytogénétique.

2.2.6.5. Application

La technique Q-FISH sur métaphases reste une approche cytogénétique qui est utilisée seulement en recherche. Malgré les difficultés logistiques, son champ d'utilisation en recherche reste vaste même si elle n'est utilisée que dans les laboratoires spécialisés. Cette technique aide à la découverte de biomarqueurs et dans la compréhension de l'homéostasie télomérique et l'instabilité génomique.

2.2.6.6. Étapes

2.2.6.6.1. Échantillons

La technique Q-FISH sur métaphases est possible seulement sur les préparations chromosomiques fraîches ou celles ayant fait l'objet de marquage par d'autres techniques cytogénétiques au préalable. Il est à noter que l'obtention des métaphases de bonne qualité et un étalement des chromosomes quasi parfait sont aussi des prérequis pour la réalisation d'une bonne technique de Q-FISH sur métaphases. Le chevauchement des chromosomes surtout au niveau de leurs extrémités rend difficile la distinction des télomères individuels et la mesure exacte de leur longueur.

2.2.6.6.2. Prétraitement

La première étape du prétraitement est la fixation par le formaldéhyde qui permet une meilleure adhésion des chromosomes à la lame avant l'étape de digestion protéolytique. Cette dernière étape rend plus perméable la chromatine à la sonde et réduit le bruit de fond. Il faut toutefois s'assurer que le prétraitement ne soit pas agressif pour éviter la perte de la structure des chromosomes.

2.2.6.6.3. Sondes télomérique

Les sondes télomériques sont à base d'ADN ou d'acide nucléique peptidique (PNA) (96). À cause des avantages des sondes PNA qui seront énumérés plus bas sur les sondes à ADN, les premières sont les plus utilisées. Les PNA sont des molécules de synthèse qui sont semblables à celles des acides nucléiques. La différence majeure entre elles est qu'au niveau des PNA, le squelette phosphodiester des acides nucléiques est remplacé par une chaîne pseudo-peptidique sur laquelle se fixent les bases puriques et pyrimidiques par des liaisons carboxyliques (87). Les sondes PNA télomériques sont des oligonucléotides composés de 18 nucléotides, le plus souvent, et la séquence télomérique (5'-CCCTAA-3')₃ associées au fluorochrome Cy3 est généralement la sonde télomérique la plus utilisée pour la technique Q-FISH sur métaphases. La séquence (5'-CCCTAA-3')₃ s'hybride de manière plus efficiente que celle (5'-TTAGGG-3')₃ et la fluorescence Cy3 présente un photoblanchiment moindre que les fluorescences émettant en couleurs vertes.

Le squelette peptidique des PNA leur procure plus de stabilité en les rendant résistants aux protéases ainsi qu'aux nucléases. Contrairement aux molécules d'ADN ou d'ARN chargées négativement, les PNA ont une charge neutre, ce qui leur confère une température de dissociation (T_m) plus élevée d'où leur spécificité plus grande que les sondes d'ADN. Par

conséquent, l'hybridation des sondes PNA donne un ratio signal/bruit de fond très élevé, ce qui est une caractéristique très importante dans la quantification de la fluorescence. Leur résistance aux nucléases rend l'hybridation encore plus efficace et stable. Leur petite taille leur assure une meilleure pénétration chromatinienne et une hybridation plus rapide réduisant ainsi les possibilités de diminution de l'intensité de la fluorescence au cours de l'expérimentation (103).

2.2.6.6.4. Dénaturation de la séquence télomérique

Cette étape consiste à séparer par la chaleur les deux brins d'ADN télomérique en entraînant une rupture des liaisons hydrogènes. Une température de 80°C est généralement utilisée, et elle a l'avantage d'être au-dessus de la température de fusion de l'ADN permettant ainsi d'éviter la formation de structures secondaires de l'ADN monocaténaire (ADN dénaturé) et de la sonde PNA (104).

2.2.6.6.5. Hybridation

À cette étape, la sonde télomérique s'hybride au brin des télomères qui lui est complémentaire. L'hybridation est réalisée dans un environnement humide à 37°C et à l'abri de la lumière. Elle dure 30 minutes, et ce temps d'hybridation qui est plus court que celui utilisé pour la technique standard de FISH s'explique par la nature oligonucléotide des sondes PNA qui pénètrent plus facilement les structures nucléaires et chromatiennes que les sondes ADN.

2.2.6.6.6. Lavages

Cette étape permet d'éliminer les hybridations non spécifiques et les sondes non hybridées pour réduire le bruit de fond. Un détergent mélangé à une solution saline de faible concentration sert de solution de lavage. La température de lavage utilisée est supérieure à celle de l'hybridation mais inférieure à celle de la dénaturation pour permettre la dissociation des hybrides non spécifiques et leur élimination tout en maintenant l'hybridation entre la sonde et la séquence d'ADN.

2.2.6.6.7. Contre-coloration

La solution de contre-coloration est composée du DAPI (4', 6-diamidino-2-phénylindole) associée au Vectashield ou une composante similaire qui permet de diminuer la vitesse de photo blanchissement du fluorochrome Cy3 (104). La contre coloration avec le DAPI permet de colorer les chromosomes en bleu, et ainsi on peut visualiser simultanément les chromosomes (coloration bleue) et les télomères associés au fluorochrome Cy3 (coloration rouge).

2.2.6.6.8. Stockage

Les lames hybridées sont stockées entre 20-25°C pendant 48 heures avant l'observation microscopique pour renforcer le marquage DAPI qui est essentiel dans l'identification des chromosomes et la facilitation du caryotype. Si les images ne sont pas capturées dans cet intervalle de 48 heures, les lames doivent être conservées dans un congélateur à -20°C et à l'abri de la lumière jusqu'au moment de l'observation microscopique. La fluorescence est plus stable à une température basse et la lumière diminue l'intensité du signal de la fluorescence qui est l'unité de mesure de la longueur des télomères.

2.2.6.6.9. Capture et analyse d'images

Le système d'acquisition d'images est basé sur l'utilisation d'un microscope à épifluorescence équipé d'une caméra de type CCD (Charge-Coupled Device) avec une bonne résolution et de filtres appropriés permettant la visualisation du Cy3, du DAPI. Le logiciel ISIS (MetaSystem, Germany) est utilisée pour la capture et l'analyse des images. Pour chaque échantillon 20 à 30 métaphases sont généralement analysées (105). Le temps d'exposition lors de la capture des images télomériques est fixe enfin de permettre la comparaison entre les intensités télomériques de différentes métaphases.

A partir des métaphases, on classifie les chromosomes en effectuant le caryotype. Le marquage DAPI des chromosomes aide à faire le caryotype. Cependant, ce marquage a des limites lorsque les chromosomes sont de petite taille et qu'il existe des anomalies chromosomiques. Dans ce cas, on peut utiliser la technique Multicouleur FISH (M-FISH).

La Multicouleur-FISH (M-FISH)

La M-FISH a pour objectif d'identifier les 24 différents chromosomes en hybridant simultanément sur des étalements métaphasiques des sondes d'ADN spécifiques à chaque chromosome. Chaque sonde est marquée par une fluorescence ou combinaison de fluorescences différentes entre elles (Figure 17). Après hybridation, la capture images est faite par un microscope muni d'au moins cinq filtres pouvant capturer toutes les fluorescences émises par les sondes. L'analyse peut se faire par le logiciel ISIS de Metasystems. Les chromosomes sont classés en fonction de leur couleur.

24XCyte

Chr.	aqua	green	orange	red	nir*
1				red	yellow
2	aqua				
3				red	
4		green			
5			orange		
6		green			yellow
7	aqua				yellow
8				red	yellow
9			orange		yellow
10	aqua	green			
11		green		red	
12		green	orange		
13	aqua			red	
14	aqua		orange		
15			orange	red	
16	aqua	green			yellow
17		green		red	
18		green	orange		
19	aqua			red	yellow
20	aqua		orange		yellow
21			orange	red	
22	aqua	green		red	
X	aqua	green	orange		
Y	aqua		orange	red	

Figure 17: Combinaison des fluorochromes utilisés dans la M-FISH.

Site web : <https://www.well.ox.ac.uk/files-library/metasystems-mfish-protocol.pdf>

La M-FISH permet la détection d'anomalies chromosomiques de structures comme les translocations, les délétions, les insertions, les isochromosomes etc. La M-FISH peut être utilisée dans l'identification des anomalies chromosomiques complexes, qui ne sont généralement pas identifiables par les méthodes de marquages conventionnelles. Certaines des limitations de M-FISH est qu'il ne peut pas détecter les inversions, les amplifications, les délétions ou les réarrangements de paires homologues, à moins qu'il n'y ait des changements évidents dans la position du centromère ou la taille du chromosome.

2.2.6.6.10. Mesure de l'intensité de fluorescence

Les intensités de fluorescence émises par les télomères hybridés sont mesurées par des logiciels spécialisés et le plus utilisé est le module télomère incorporé dans ISIS (MetaSystem, Germany). Le module télomère de ISIS mesure l'intensité de fluorescence au niveau de chaque bras chromosomique. Par conséquent, pour une métaphase donnée, 92 mesures de l'intensité des télomères sont générées indiquant les intensités de fluorescence des 92 télomères individuels (télomères sur les bras longs et courts de chaque chromosome) (Figure 18). En général, on mesure l'intensité des télomères de 20 à 30 métaphases. En plus d'évaluer l'intensité des télomères, on mesure également l'intensité de fluorescence émise par l'hybridation d'un ou de plusieurs centromères en les ciblant par des sondes spécifiques. L'intensité de fluorescence des centromères permet de normaliser les variations expérimentales d'une lame à une autre, ainsi on peut comparer l'intensité de fluorescence des télomères individuels donnés d'un patient à ceux d'un autre patient.

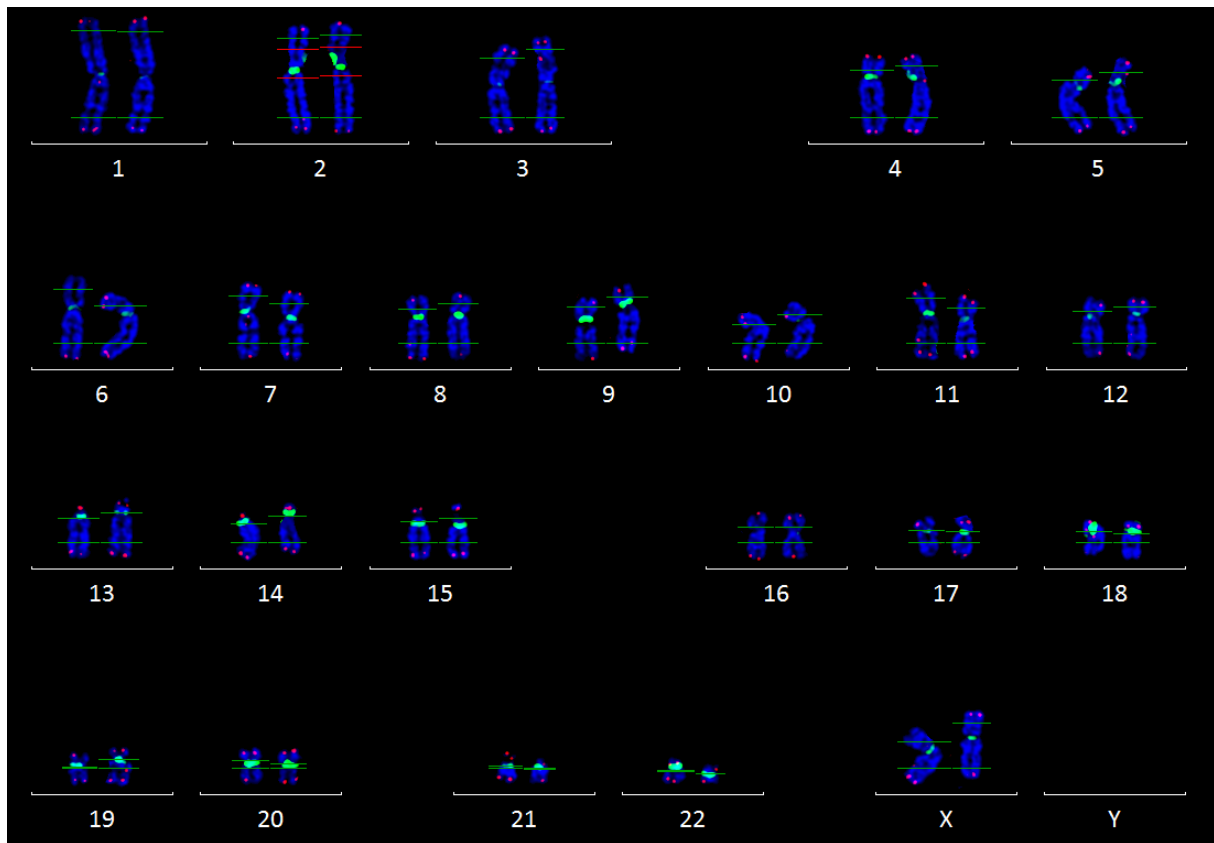


Figure 18: Caryogramme d'une métaphase d'un patient LMC.

Les colorations rouges sur les extrémités des chromosomes représentent les télomères et les colorations vertes correspondent aux centromères.

2.2.6.6.11. Approches analytiques

La qualité de la mesure de la longueur des télomères individuels par la technique Q-FISH sur métaphases peut être affectée par divers facteurs environnementaux ou expérimentaux, qui peuvent conduire à des variations inter ou intra expérimentales. Pour minimiser ces variations, une normalisation vis-à-vis d'une valeur de référence telle que la fluorescence émise par l'hybridation des centromères (106), la longueur physique moyenne des télomères en kb (6) ou par des méthodes statistiques (107) sont souvent employées. La normalisation statistique permet l'établissement plus précis du profil des télomères individuels au niveau cellulaire et déterminer la clonalité télomérique (107). L'inconvénient majeur de cette méthode est qu'on ne peut pas évaluer le raccourcissement ou l'allongement des télomères.

METHODOLOGIE

3. METHODOLOGIE

Le but de ce travail était d'analyser les anomalies chromosomiques et de mesurer la longueur des télomères individuels dans la leucémie myéloïde chronique chez des patients présentant des formes atypiques de signaux fusion *BCR::ABL1* à la FISH.

3.1. Cadre d'étude

Nous avons recruté les patients dans le service hémato-oncologie du CHU Point G, l'hôpital mère-enfant le Luxembourg et l'hôpital du Mali. La culture cellulaire, la récolte des chromosomes, la FISH télomérique et spectrale, et l'acquisition des images microscopiques ont été faites dans le laboratoire de Neurosciences de la FMOS.

3.2. Type et période d'étude

Nous avons effectué une étude retro-prospective qui s'est déroulée sur une période de trente-trois (33) mois, allant du 1^{er} septembre 2019 au 31 juin 2022.

3.3. Population d'étude

3.3.1. Critères d'inclusion

Nous avons inclus dans cette étude tous les patients diagnostiqués d'une LMC durant la période d'étude et présentant des signaux nucléaires de fusion atypiques par la technique FISH et les patients ayant accepté de participer à l'étude. Durant la période de recrutement de l'étude, 43 patients répondaient aux critères d'inclusion. Parmi ces patients, nous avons choisi aléatoirement 5 d'entre eux (sélectionnés au hasard parmi les 43 échantillons) pour effectuer les travaux de cette thèse. Le choix de ce nombre limité de patients était dû au temps que nous devrions mettre pour faire la mise au point de la technique de Q-FISH et M-FISH car c'était la première fois de réaliser ces techniques au Mali. En outre, ces techniques sont difficiles à réaliser et nécessitent énormément de temps technique.

3.3.2. Critères de non-inclusion

N'étaient pas inclus dans cette étude, les patients chez lesquels, la FISH-*BCR::ABL1* était typique et ceux chez lesquels nous n'avons pas trouvé de métaphase lors de la récolte cellulaire, également ceux dont le consentement n'a pas été obtenu.

3.4. Collecte des données

3.4.1. Données cliniques

Nous avons collecté les données démographiques, cliniques et paracliniques de chaque patient. Une base de données Excel MS nous a permis de recueillir ces données.

3.4.2. Données cytogénétiques

Après avoir recueilli le sang périphérique total chez chaque patient, nous avons fait la culture cellulaire, la récolte des chromosomes et leurs étalement, la FISH BCR::*ABL1*, la Q-FISH sur métaphases et la M-FISH.

3.4.2.1. Culture cellulaire (Annexe 1)

Le principe de la culture cellulaire est d'induire une division cellulaire afin de multiplier les cellules pour ensuite isoler les chromosomes à la métaphase dans un environnement artificiel hors de leur milieu naturel. La culture cellulaire pour la LMC consiste à mettre 200-400 µL de sang périphérique dans 5 ml milieu de culture, enrichi d'oligoéléments et d'acides aminés, à 37°C et 5% de CO₂ pendant 24 heures. (Voir annexe 1 pour plus de détails).

3.4.2.2. Récolte des chromosomes

Le principe de la récolte des chromosomes est d'arrêter la division des cellules à la métaphase par un agent anti-mitogène notamment la colchicine qui est un toxique des microtubules inhibant ainsi la formation de fuseau mitotique. Ensuite, les cellules subissent un choc hypotonique par le chlorure de potassium (KCl) provoquant ainsi la turgescence cellulaire qui est indispensable à l'obtention d'un étalement adéquat de chromosomes. La dernière étape qui est la fixation cellulaire et chromosomique permet une bonne préservation de la morphologie (structure) cellulaire et chromosomique, et cette fixation se fait par un mélange d'acide acétique et de méthanol. (Voir annexe 2 pour plus de détails)

La récolte des chromosomes est suivie de leur étalement sur la lame qui doit être vieillie à 37°C pendant 24 heures avant de procéder aux techniques FISH BCR::*ABL1* ou Q-FISH sur métaphases.

3.4.2.3. FISH BCR::*ABL1*

La FISH était la principale technique employée à la recherche du gène de fusion *BCR::*ABL1** sur des préparations cytologiques. Elle est effectuée sur des étalements cellulaires ou chromosomiques. Après une hybridation à 37°C pendant de 24 à 48 heures avec des sondes ciblant les loci *BCR* et *ABL1*, on capture les images chromosomiques nucléaires avec l'aide d'un microscope à épifluorescence. Pour chaque patient, nous avons analysé 20 métaphases et 200 noyaux interphasiques. Le résultat est exprimé en terme de pourcentage, c'est-à-dire la proportion du nombre de cellules présentant le réarrangement *BCR::*ABL1** sur le nombre total de cellules examinées, autant pour les métaphases. (Voir annexe 3 pour plus de détails)

concernant le protocole). Nous avons utilisé la dernière version de nomenclature de « International System for Human Cytogenomic Nomenclature » (108).

3.4.2.4. Quantitative-FISH (Q-FISH)

Chez chaque patient, nous avons fait plusieurs étalements chromosomiques sur des lames et choisi la lame sur laquelle les métaphases présentaient peu ou pas de chevauchement des bras chromosomiques. Ensuite, nous avons procédé à la technique Q-FISH sur métaphases. (Voir annexe 4 pour plus de détails).

3.4.2.5. Multicouleur-FISH (M-FISH)

Après la capture microscopique des images de Q-FISH, nous avons effectué la technique M-FISH sur la même lame qui a servi pour faire la technique Q-FISH. Voir annexe 5 pour plus de détails sur le protocole.

3.4.3. Données Microscopiques

Nous avons utilisé le system microscopique Zeiss Imager 2 (Zeiss, MA, USA) associé à une camera CoolCube 1m 1360 x 1024 pixels ; 6.45 μm x 6.45 μm 2/3" CCD, monochrome et le logiciel ISIS (MetaSystem, Germany).

Après la technique Q-FISH, nous avons capturé les images de métaphase par l'objectif 100X sous huile d'immersion. Les temps d'exposition utilisés étaient 40 millisecondes coloration bleue (DAPI- chromosomes), 40 millisecondes pour la coloration verte (Alexa 488-Centromères) et 60 millisecondes (Cy3-Téломères). A la fin de la capture de chaque image Q-FISH, nous avons repéré les métaphases grâce à leur coordonnée (x, y) à l'objectif 100X sous huile d'immersion pour pouvoir retrouver les mêmes métaphases lors de la capture des images M-FISH.

Le même microscope a été utilisé pour la capture des images M-FISH. Grace aux coordonnées enregistrées lors de la capture des images Q-FISH, nous avons localisé chaque métaphase analysée par Q-FISH. Pour chaque image le temps d'exposition était automatique pour les 6 différentes couleurs des filtres.

Nous avons procédé d'abord au caryotype M-FISH qui nous a guidé pour faire le caryotype Q-FISH.

3.4.4. Analyse des télomères

La mesure des télomères a été effectuée sur 20 métaphases par patient. La quantification des intensités des télomères et de quatre centromères (centromères des chromosomes 2, 3, 4 et 5) a été ensuite effectuée par un module de mesure télomérique qui est intégré au logiciel ISIS.

Les mesures brutes ont été réorganisées par Microsoft Excel 365 et puis transportées vers SPSS. Les données représentaient 11 variables : patients, sexe, chromosomes, homologues, centromères, moyenne de référence, référence, bras, index, intensité télomérique et télomère_normalisé.

3.4.5. Analyse Statistique

L'analyse des données a été réalisée par le logiciel SPSS Version 25 et Microsoft Excel 365. Nous avons utilisé le test non paramétrique de **Mann -Whitney** pour celle des médianes. Le test a été considéré statistiquement significatif lorsque le $p < 0.05$. Le ratio a été utilisé pour comparer la proportion des hommes et femmes.

3.4.6. Considérations éthiques

Étant donné que l'étude devrait recueillir des données génomiques des patients, il était nécessaire d'avoir le consentement des patients avant la collecte de celles-ci. Par conséquent chaque patient a bénéficié d'une explication de l'étude afin d'obtenir leur consentement libre et éclairé. Le but de cette explication était de s'assurer que chaque patient ait compris les détails et les éléments importants qui étaient : le caractère volontaire, la possibilité de se retirer à tout moment, le but, les critères de participations, les procédures, les risques liés à la participation à l'étude. Le formulaire est en annexe 6 de la thèse.

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 télomérique des patients leucémiques au Mali en vue d'améliorer leur santé et d'étendre les perspectives de recherche.

RESULTATS

4. RESULTATS

4.1. Données socio-démographiques

4.1.1. Âge

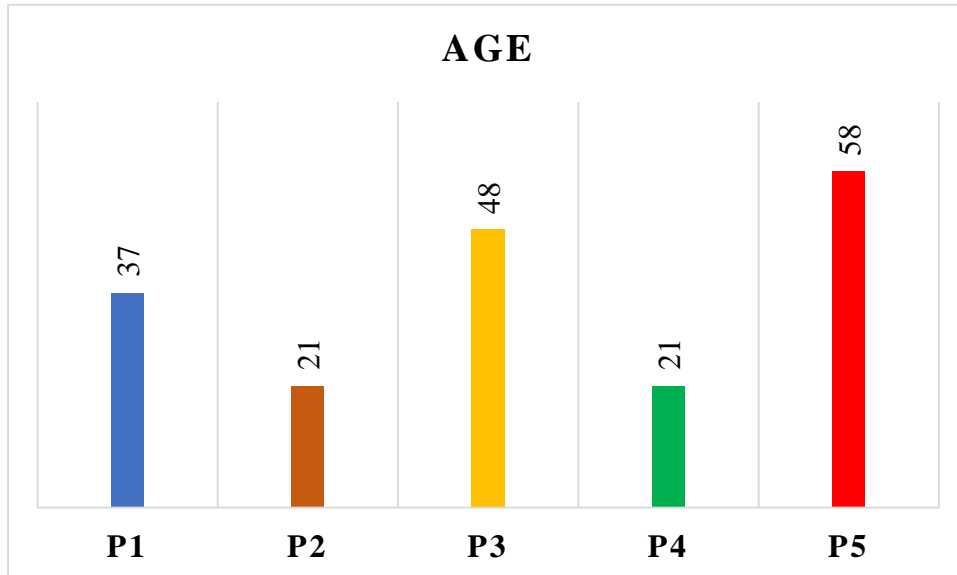


Figure 19: Répartition des patients en fonction de l'âge.

L'âge moyen des patients était de $36,6 \pm 16,4$ ans et la médiane d'âge de 35 ans avec des extrêmes de 21 ans et 58 ans.

4.1.2. Sexe

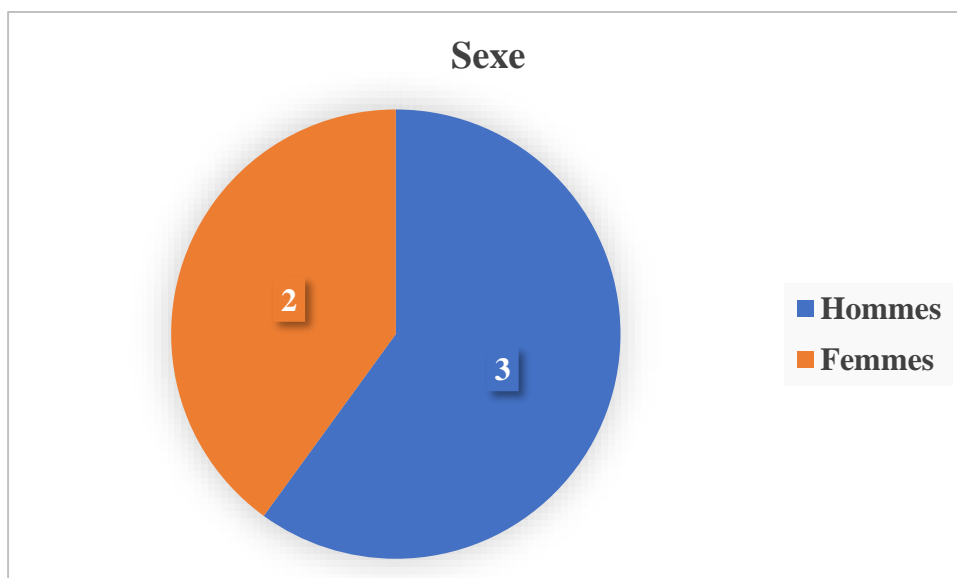


Figure 20: Répartition des patients en fonction du sexe

Les hommes étaient plus représentés avec un sexe ratio de 1,5.

4.2. Données cliniques

4.2.1. Paramètres hématologiques

Tableau VI: Répartition des patients en fonction de la NFS

Paramètres hématologiques	Moyennes	Extrêmes
Leucocytes ($10^9/L$)	405,24	[289,2 0 – 735,06]
Neutrophiles ($10^9/L$)	250,8	[115,68 – 382,23]
Basophiles ($10^9/L$)	5,9	[1,93 – 11,57]
Plaquettes ($10^9/L$)	976,4	[385 – 1660]
Hématocrite (%)	25,68	[19 – 30,1]
Hémoglobine (g/dL)	8,2	[5,1 – 10,4]

Tous les patients présentaient une hyperleucocytose avec une valeur moyenne de $405,4 \times 10^9/L$, avec des extrêmes de $289,2 \times 10^9/L$ et $735,06 \times 10^9/L$. Cette hyperleucocytose était de prédominance granulaire. Chez l'ensemble des patients, nous avons retrouvé une anémie avec une valeur moyenne d'hémoglobine de 8,2 g/dL avec des extrêmes de 5,1 g/dL à 10,4 g/dL. Enfin, nous avons observé une thrombocytose chez quatre des cinq patients. La valeur moyenne des plaquettes était de $976,4 \times 10^9/L$ avec des extrêmes de $385 \times 10^9/L$ et $1660 \times 10^9/L$.

4.2.2. Données cytogénétiques

4.2.2.1.FISH BCR::ABL1

Tableau VII: Répartition des types de signaux BCR et ABL1 dans le noyau chez les 5 patients

Signaux atypiques	Effectifs	Fusion
Type 1	3	1F1R1G
Type 2	1	1F2R1G
Type 3	1	2F1R2G

F : fusion (1F : un signal de fusion) R : red (signal rouge), G : green (signal vert). Les signaux atypiques de type 1R1V1F (Type 1) étaient les plus fréquents, présents chez 3 des 5 patients. Les images représentant les différents types de fusion sont illustrées par la figure 21.

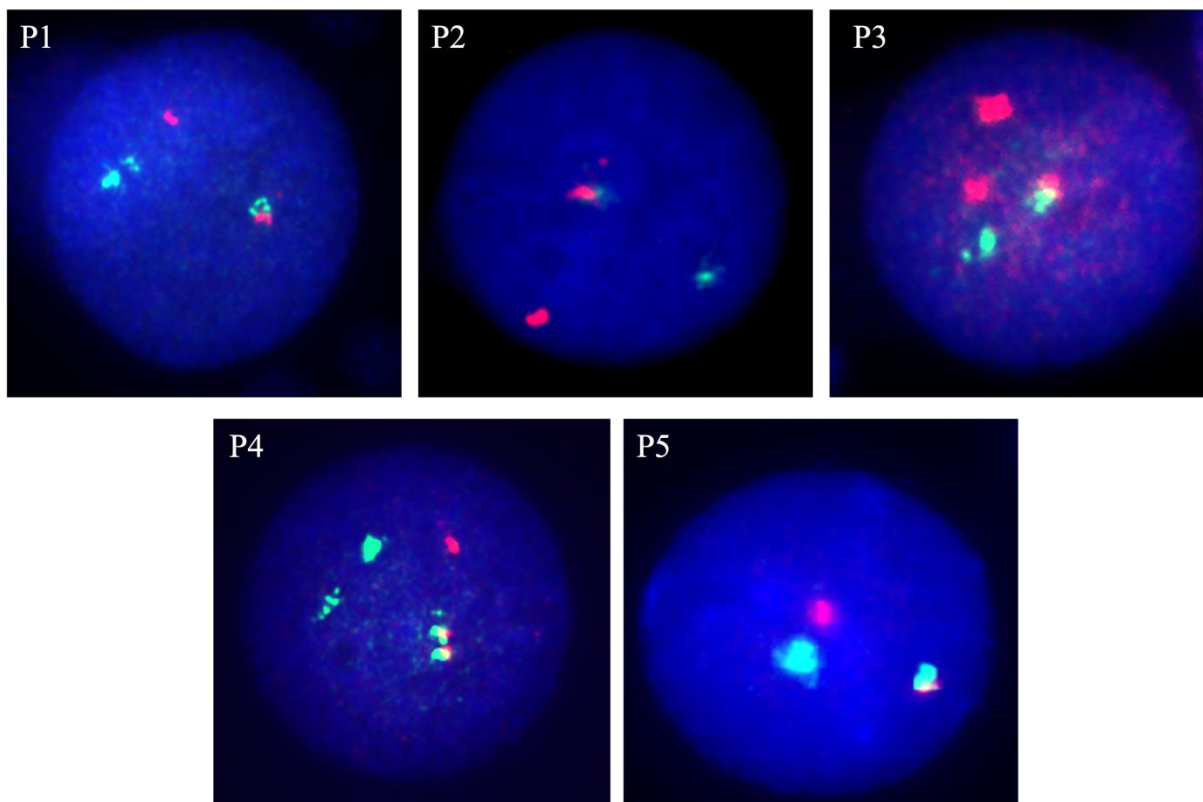


Figure 21: Différents profils des signaux atypiques nucléaires chez les cinq patients.

P1:1F1R1G ; **P2:** 1F1R1G ; **P3:** 1F2R1G ; **P4:** 2F1R2G ; **P5:** 1F1R1G)

Tableau VIII: Répartition des types de signaux BCR et ABL1 sur les métaphases

Patients	Fusion (F)	Rouge (R)	Vert (G)
P1	1F (der(22))	1R (9)	1G (22)
P2	1F (der(22))	1R (9)	1G (22)
P3	1F (??)	1R (9), 1R (??)	1G (22)
P4	1F (der(22)), 1F (??)	1R (9)	1G (22) 1G (der(9))
P5	1F (der(22))	1R (9)	1G (22)

Les patients (**P1**, **P2** et **P5**) qui présentaient le même profil de signaux *BCR* et *ABL1* dans les noyaux avaient aussi le même profil de répartition des signaux *BCR* et *ABL1* sur leurs métaphases. Chez un patient (**P3**), nous n'avons pas pu indiquer la présence chromosomique du signal de fusion et d'un signal rouge. Enfin, le patient **P4** présentait un signal vert sur le dérivé 9 au lieu de présenter un signal de fusion.

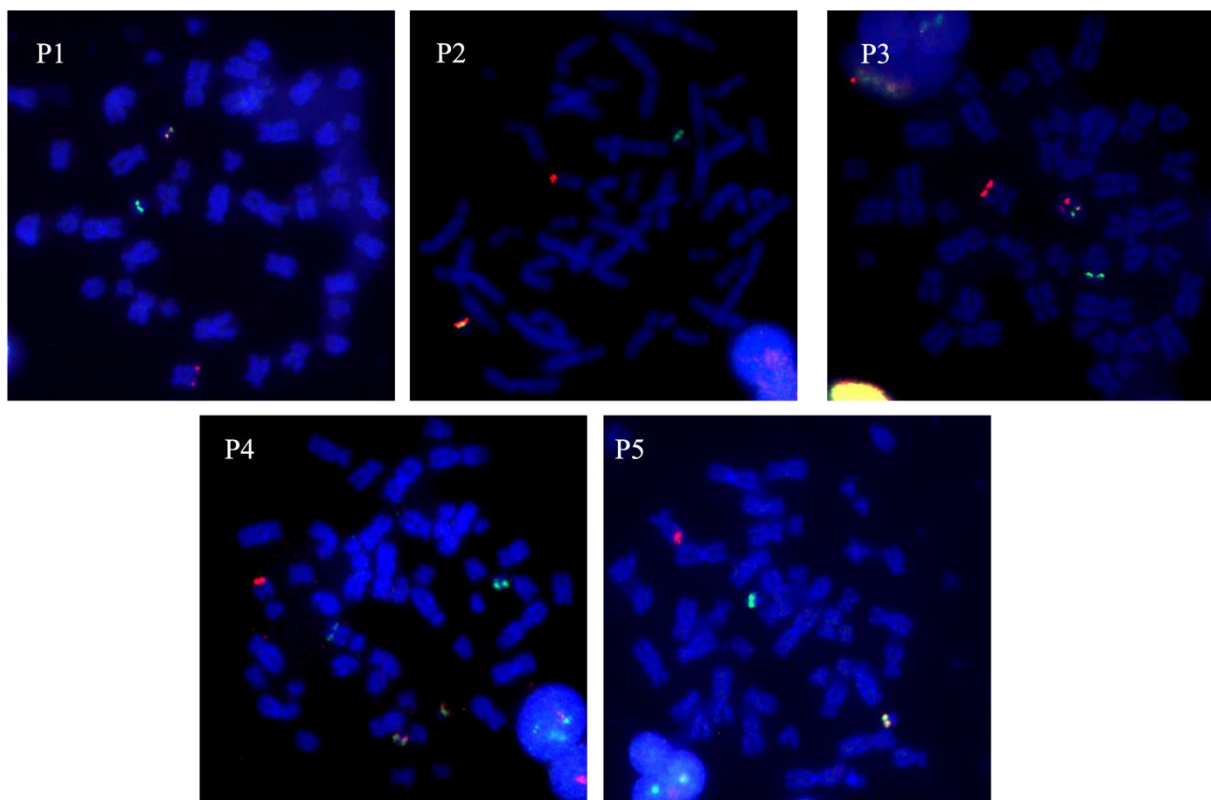


Figure 22 : Différents profils des signaux atypiques métaphasiques chez les cinq patients.

Les patients **P1**, **P2** et **P5** présentaient un même profil de signaux. Ce profil était constitué d'un signal de fusion (*BCR::ABL1*) sur le dérivé de 22, un signal rouge (*ABL1*) sur le chromosome

9 et un signal vert (BCR) sur le chromosome 22. Nous avons retrouvé chez la patiente **P3**, un signal de fusion (*BCR::ABL1*) et un signal rouge (*ABL1*) sur une anomalie chromosomique non identifiable, un signal rouge (*ABL1*) sur le chromosome 9, et signal vert (*BCR*) sur le chromosome 22. Le patient **P4** présentait deux signaux de fusion (*BCR::ABL1*) sur deux dérivés de 22, un signal rouge sur le chromosome 9, et un signal vert (BCR) sur le chromosome 22 et un autre vert sur le dérivé 9.

Tableau IX: Annotation cytogénétique selon la nomenclature de « International System for Human Cytogenomic Nomenclature » (108).

Fusions	Metaphases	Interphases
Type 1	ish t(9;22)(BCR+,ABL1+)	Nuc ish(ABL1,BCR)x2(ABL1 con BCRx1)
Type 2	ish t(9;22)(BCR+,ABL1+)	Nuc ish(ABL1x3,BCRx2),(ABL1 con BCRx1)
Type 3	Ish der(9)t(9;22)del(9)(q34q34)(ABL1-,BCR),der(22)t(9;22)(BCR+,ABL1+)	Nuc ish(ABL1x3,BCRx4),(ABL1 con BCRx2)

Tableau X : Résumé clinique, biologique de FISH BCR::ABL1

Patients	Sexe	Age	GB: (10 ³ /µl)	Basophiles (10 ³ /µl)	Plaquette (10 ³ /µl)	Metaphase	Interphase
P1	F	27	419,37	3,11	1004	ish t(9;22)(BCR+,ABL1+)	Nuc ish(ABL1,BCR)x2(ABL1 con BCRx1)
P2	M	21	288,97	5,77	385	ish t(9;22)(BCR+,ABL1+)	Nuc ish(ABL1,BCR)x2(ABL1 con BCRx1)
P3	F	48	289,2	11,57	1660	ish t(9;22)(BCR+,ABL1+)	Nuc ish(ABL1x3,BCRx2),(ABL1 con BCRx1)
P4	M	21	735,06	7,35	580	Ish der(9)t(9;22)del(9)(q34q34)(AB L1- ,BCR),der(22)t(9;22)(BCR+,AB L1+)	Nuc ish(ABL1x3,BCRx4),(ABL1 con BCRx2))
P5	M	58	293,6	1,93	1253	ish t(9;22)(BCR+,ABL1)	Nuc ish(ABL1,BCR)x2(ABL1 con BCRx1)

L'analyse intégrée des données cliniques et de la FISH BCR::ABL1 a montré : 1) La patiente **P3** qui présentait la valeur la plus élevée des plaquettes était aussi la seule qui avait un signal de fusion sur un chromosome non identifiable. 2) Le patient **P4** qui avait l'hyperleucocytose la plus importante présentaient de deux chromosomes Philadelphie sur certaines de ses métaphases.

4.2.2.2. Multicouleur-FISH (M-FISH)

Tableau XI: Résumé des anomalies chromosomiques par M-FISH.

Patients	Sexe	Age	Caryotype	Anomalies chromosomiques supplémentaires
P1	F	27	46, XX, der(9)t(9;22)inv(9)	Oui
P2	M	21	46, XY, t(9;22)(q34;q11)	Non
P3	F	48	47, XXX, t(9;16;22), +X	Oui
P4	M	21	46, XY, t(9;22)(q34;q11)	Non
P5	M	58	46, XY, t(9;22)(q34;q11)	Non

Deux des cinq patients présentaient des anomalies chromosomiques autres que la t(9;22). Le patient **P1** avait une inversion au niveau du dérivative du chromosome 9. La patiente **P3** présentait une translocation complexe impliquant les chromosomes 9, 16, et 22, et associée à une trisomie du chromosome X. Les autres ne présentaient pas de réarrangement observable par la technique M-FISH.

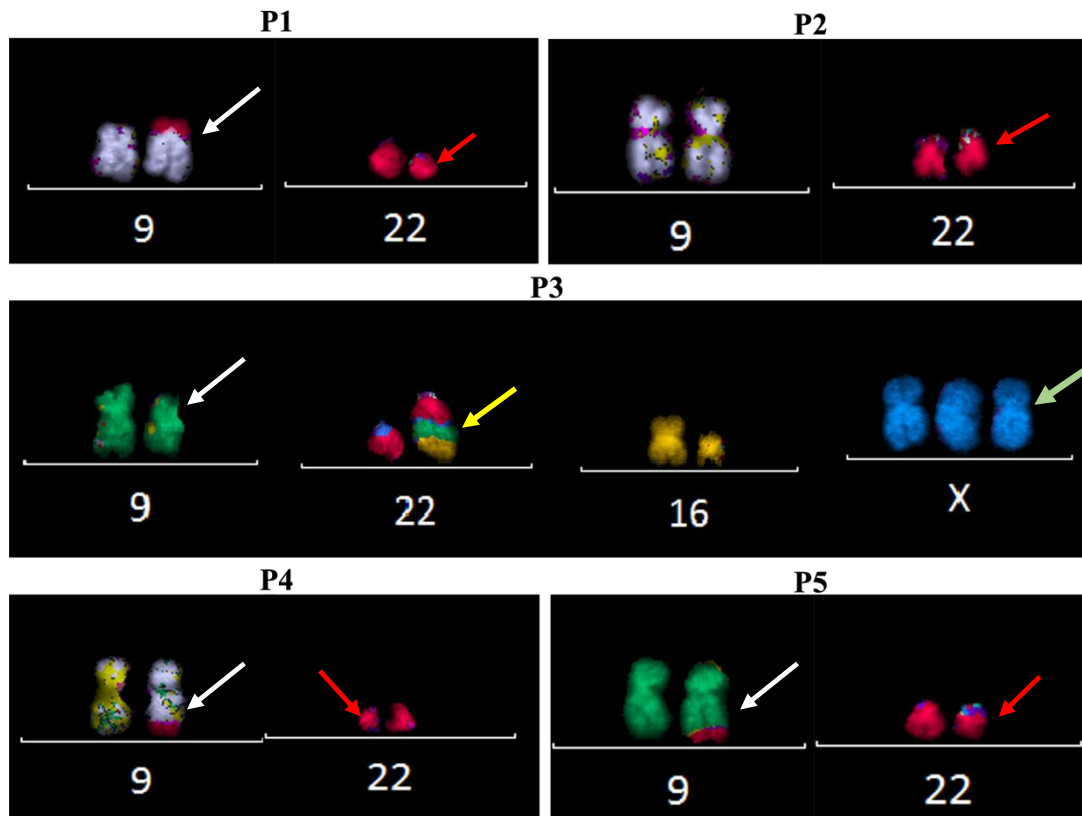


Figure 23 : Caryogramme partiel représentant les anomalies chromosomiques retrouvées chez les cinq patients.

1. Les flèches blanches indiquent les dérivés 9, c'est-à-dire les chromosomes 9 qui ont transloqué avec les chromosomes 22. Nous avons remarqué seulement chez les patients **P4** et **P5** la présence d'un des fragments du bras long chromosomique 22. Chez le patient **P1**, nous avons observé une inversion péricentrique du dérivé 9 impliquant la partie transloquée de 22. Chez le patient **P2**, nous n'avons pas observé de fragment transloqué de 22 sur le 9, donc on ne pouvait pas déterminer le dérivé 9. Chez la patiente **P3** aussi, nous n'avons pas remarqué une partie du chromosome 22 qui devrait être transloquée sur le chromosome 9.
2. Chez quatre des cinq patients, les flèches rouges indiquent les dérivés du chromosome 22, le chromosome Philadelphie. La résolution de M-FISH ne nous a pas permis d'observer la partie terminale du bras long du chromosome 9 est sur les dérivés 22. Cependant, l'intégration des données FISH BCR::ABL1 (Figure 21) permet d'objectiver une partie du locus ABL1 sur les dérivés 22.
3. Nous avons observé d'autres anomalies chromosomiques telles que la trisomie X (flèche verte) et un réarrangement complexe impliquant le chromosome 16, le bras long du chromosome 9 et le dérivé 22 (indiqué par la flèche jaune) chez la patiente **P3**.

1.1.1.1. Quantitative-FISH (Q-FISH)

4.2. Mesures globales de l'intensité des télomères

4.2.1. Intensité globale par patient

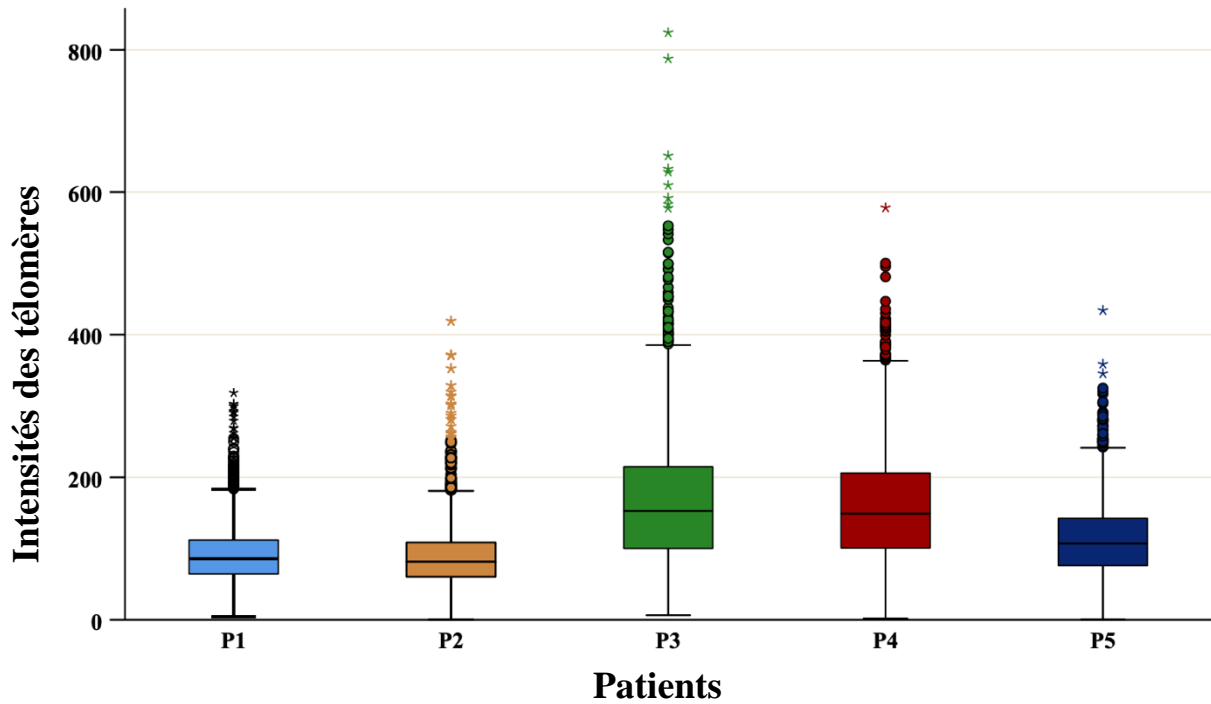


Figure 24: Représentation de l'intensité globale des télomères par le diagramme de boîte à moustaches.

Nous avons déterminé la médiane des intensités télomériques chez chaque patient à partir de la mesure des intensités des 92 télomères (télomères des bras chromosomiques) présent dans chacune des 20 cellules analysées. Nous avons observé que la patiente **P3** avait les télomères (la médiane était de 153 unités de fluorescence) plus longs que ceux des autres patients, alors que les télomères de **P2** (la médiane était 81 d'unités de fluorescence) étaient les plus courts.

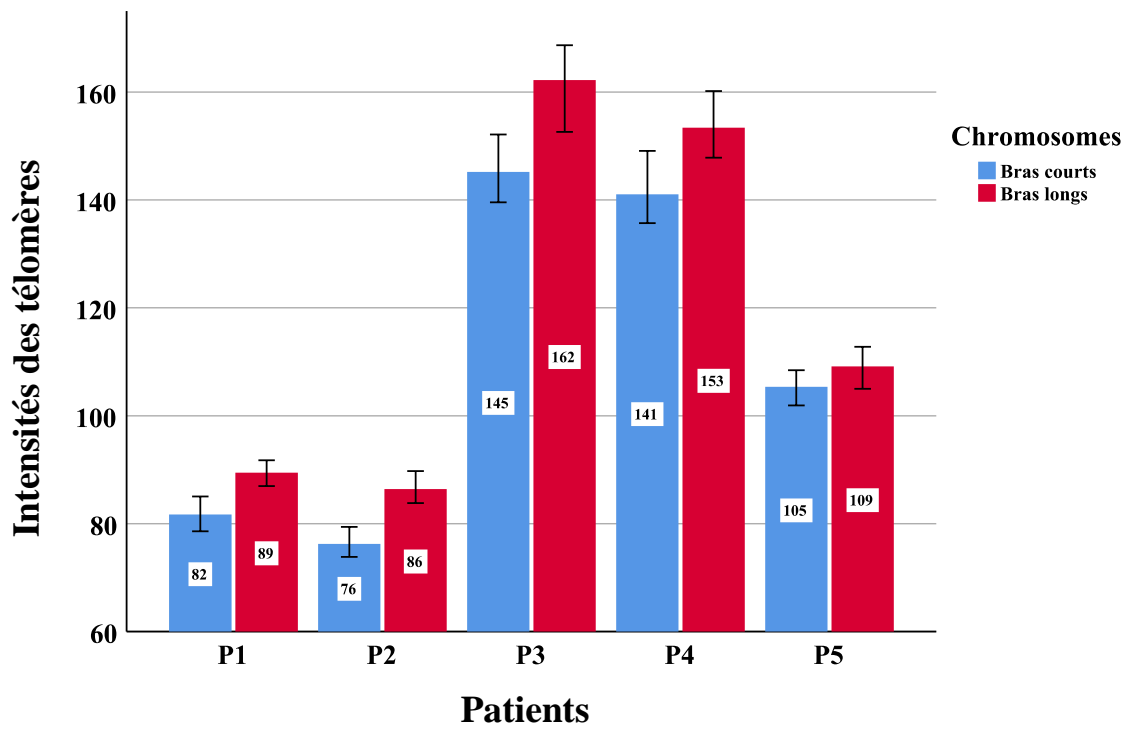


Figure 25: Représentation de la médiane des intensités télomériques en fonctions des bras chromosomiques.

La médiane des intensités télomériques des bras longs était élevée chez tous les patients comparés à celle des bras courts.

1.1.2. Intensité globale par chromosome

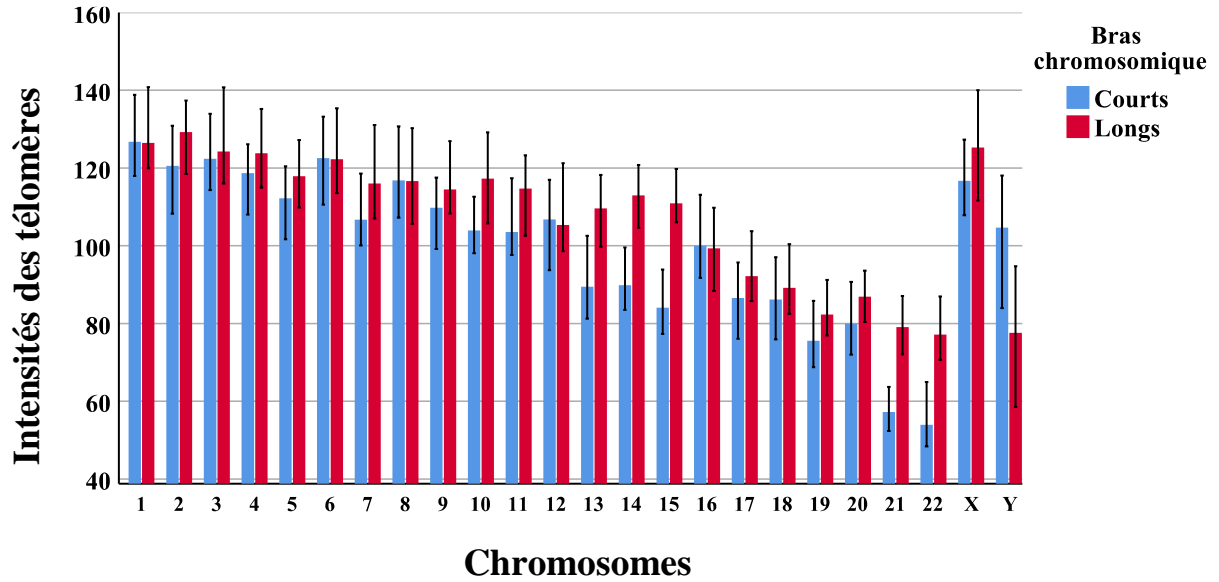


Figure 26 : Représentation de la médiane des intensités télomériques en fonction des chromosomiques.

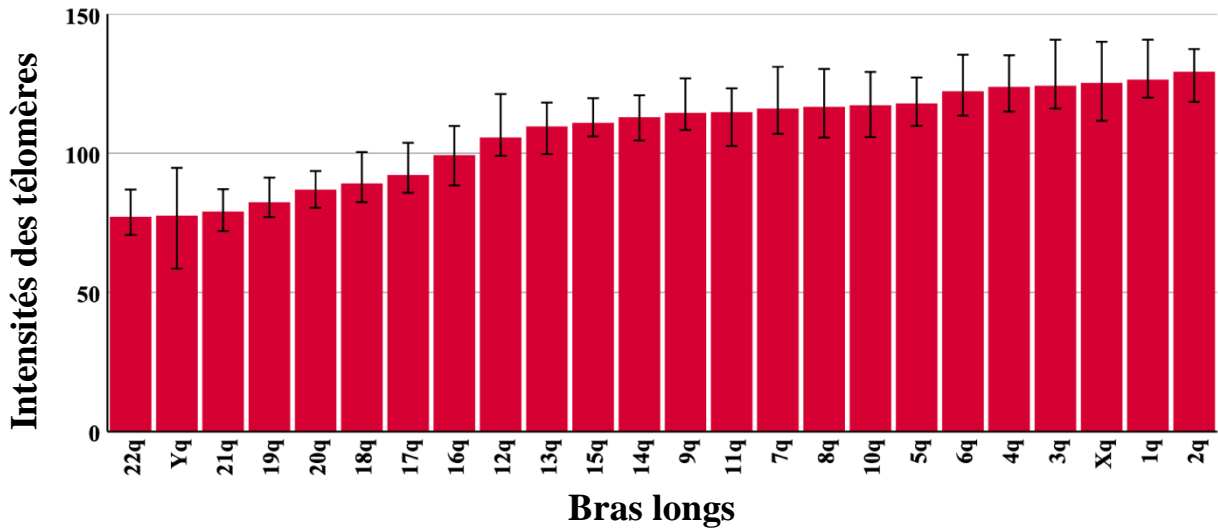


Figure 27: Représentation de la médiane des télomères individuels sur les bras chromosomiques longs.

Nous avons noté les télomères sur le 22q, Yq et 21q étaient les plus courts alors que ceux sur le 2q, 1q et Xq étaient les plus longs des bras longs des chromosomes.

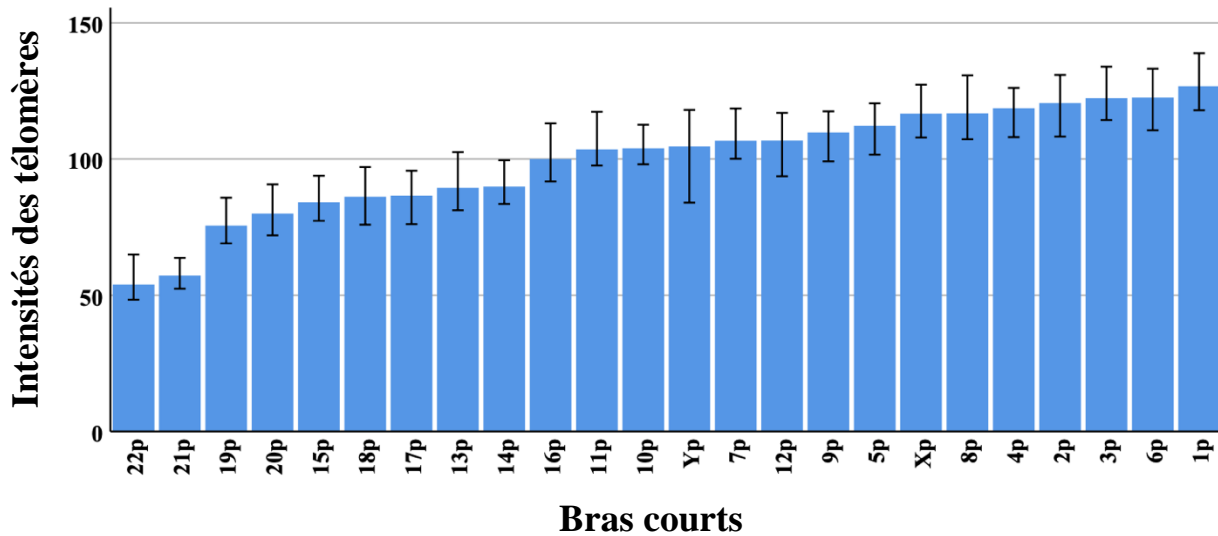


Figure 28: Représentation de la médiane des télomères individuels des bras courts.

Les télomères sur le 22p, 21p et 19p étaient les plus courts alors que ceux sur le 1p, 6p et 3p étaient les plus longs des bras chromosomiques courts. Et parmi les longueurs individuelles des bras courts, 1p a la médiane la plus élevée et 22p la plus basse médiane.

Comparaison globale des patients par bras chromosomiques

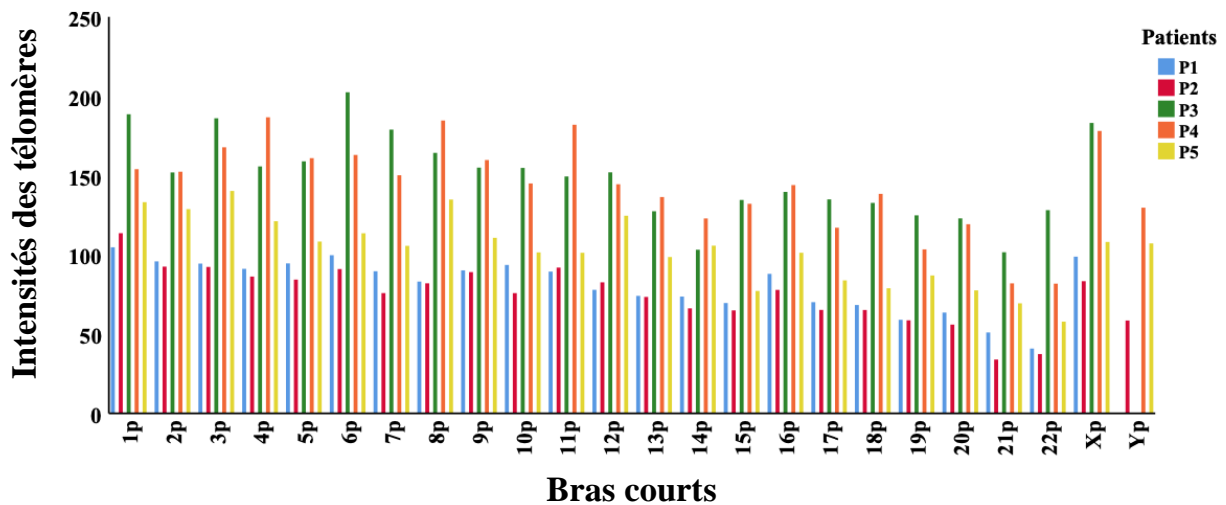


Figure 29 : Distribution de la médiane des intensités télomériques des bras courts.

Les télomères sur le 6p, 1p et Xp de la patiente **P3** étaient les télomères les plus longs alors les plus courts étaient 21p (**P2**), 22p (**P2**) et 22p (**P1**) sur les bras chromosomiques courts.

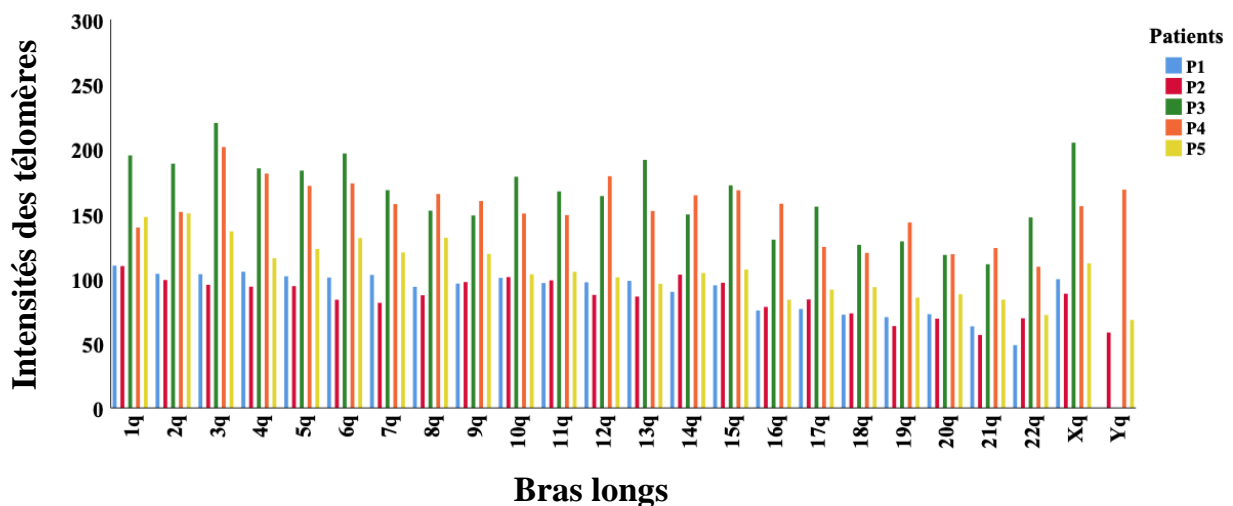


Figure 30 : Distribution de la médiane des intensités télomériques des bras longs.

Sur les bras longs des chromosomes, la patiente **P3** présentait les télomères individuels (3q, Xq et 1q) les plus longs alors que les plus courts étaient ceux 22q(**P1**), Yq(**P2**) 21q(**P1**).

Intensités télomériques et leur variation cellulaire

Le coefficient de variation (CV) est une mesure statistique de la dispersion des points de données dans une série de données autour de la moyenne. Le coefficient de variation représente le rapport entre l'écart-type et la moyenne, et, ceci est une statistique utile pour comparer le degré de variation d'une série de données à une autre, même si les moyennes sont radicalement différentes les unes des autres. L'intensité de fluorescence des télomères est très variable, et peut être affectée par les différentes étapes expérimentales ou même par la capture d'image. Ainsi l'intensité n'est pas la même d'une métaphase à une autre de même que d'une cellule à une autre. Ici nous utilisons le coefficient de variation pour mettre en évidence cette variabilité inter-cellulaire.

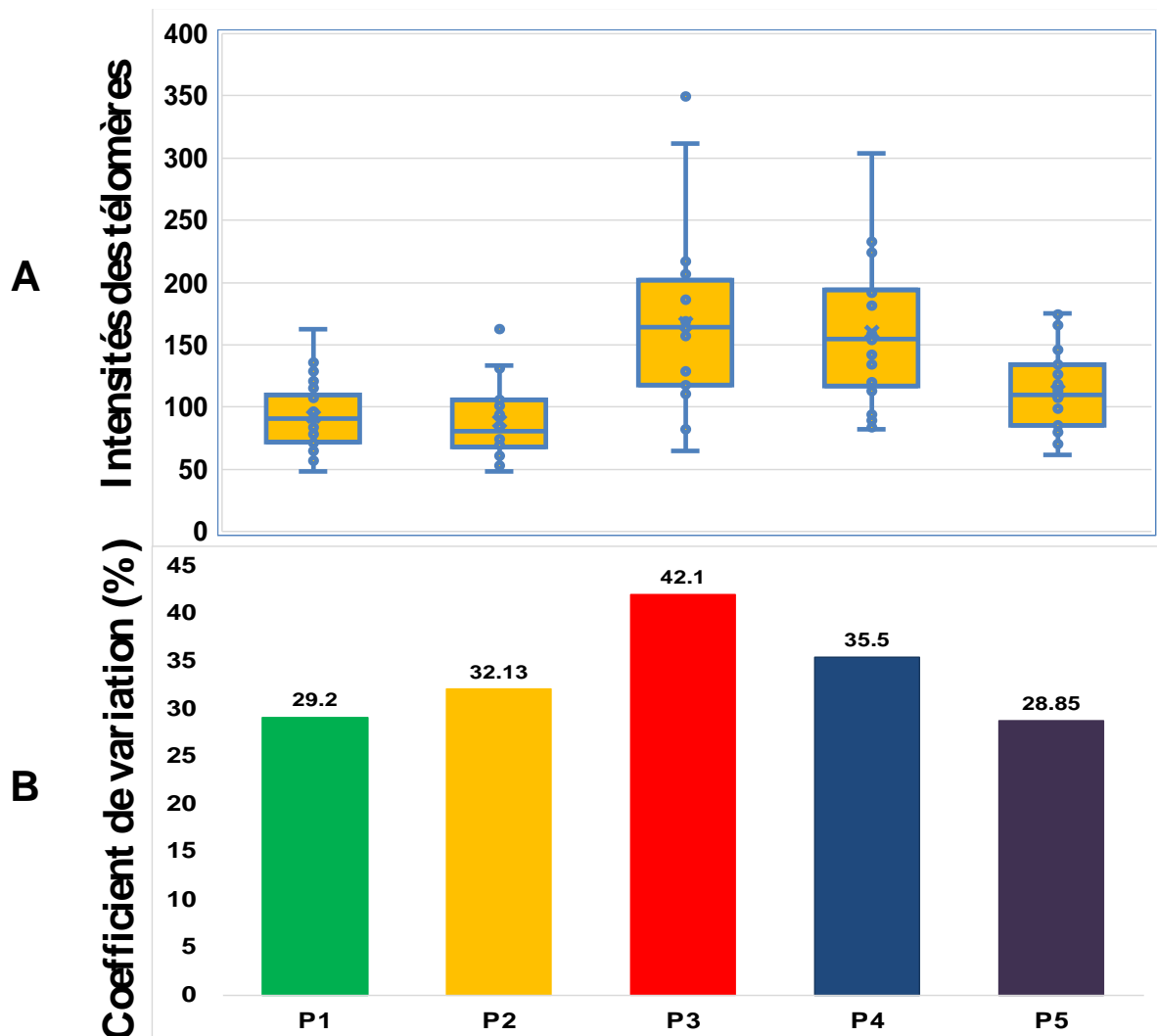


Figure 31 : Coefficient de variation de l'intensité des télomères entre les patients.

(A) Nous avons mesuré la médiane d'intensité télomérique de chaque métaphase chez un patient donné. Ensuite, nous avons déterminé le profil de l'intensité des médianes des 20 métaphases

analysées chez chaque patient. La patiente **P3** présentait les télomères les plus longs. En outre, nous avons observé que les métaphases de P3 étaient les plus hétérogènes en termes de leurs intensités télomériques.

4.3. Longueurs individuelles des télomères par patient

4.3.1. Patiente : P1

C'était une patiente de 37 ans qui a été référée pour une suspicion de LMC sur la base biologique d'une hyperleucocytose. La numération formule sanguine montrait une hyperleucocytose à $419,37 \times 10^3/\mu\text{L}$ à prédominance neutrophile (85,9%) avec 14% de myélocytes, 4% de métamyélocytes. Le taux d'hémoglobine était de 5,1 g/dL et les thrombocytes étaient à $1004 \times 10^3/\mu\text{L}$. L'hybridation fluorescente *in situ* qui a montré des signaux de fusion *BCR::ABL* dans 97% des cellules et 100% des métaphases a confirmé le diagnostic de la LMC. Les patrons des signaux *BCR::ABL1* dans les noyaux étaient: 1F, 1R, 1G (Figure 32B et 32C). Sur les métaphases, on notait les signaux de *ABL1* et de *BCR*, respectivement sur les bras longs des chromosomes 9 et 22, un signal de fusion sur le chromosome Philadelphia. Le dérivé 9 n'était pas identifiable puisqu'aucun des deux chromosomes 9 ne présentait de signal du locus *ABL1* ni celui de *BCR* (Figure 32A). Le caryotype spectral (Figure 34) nous a permis d'avoir des informations supplémentaires qui ne pouvaient pas être fournies par le caryotype du DAPI. Ainsi, le caryotype spectral a mis en évidence une inversion péricentrique du dérivé 9 associée à une délétion d'une partie des loci *ABL1* et *BCR*. Les métaphases de **P1** présentaient des télomères relativement courts. Les télomères individuels les plus longs étaient le 1q, 1p et 4q alors que les plus courts étaient 22p, 22q et 21p (Figures 35 et 34). Les télomères sur les deux bras des chromosomes 9 et dérivé 9 étaient significativement plus long que ceux sur les deux bras du chromosome 22 et le dérivé 22 ($p < 0,0001$) (Figure 35).

4.3.1.1. Chromosome Philadelphie par FISH *BCR::ABL1*

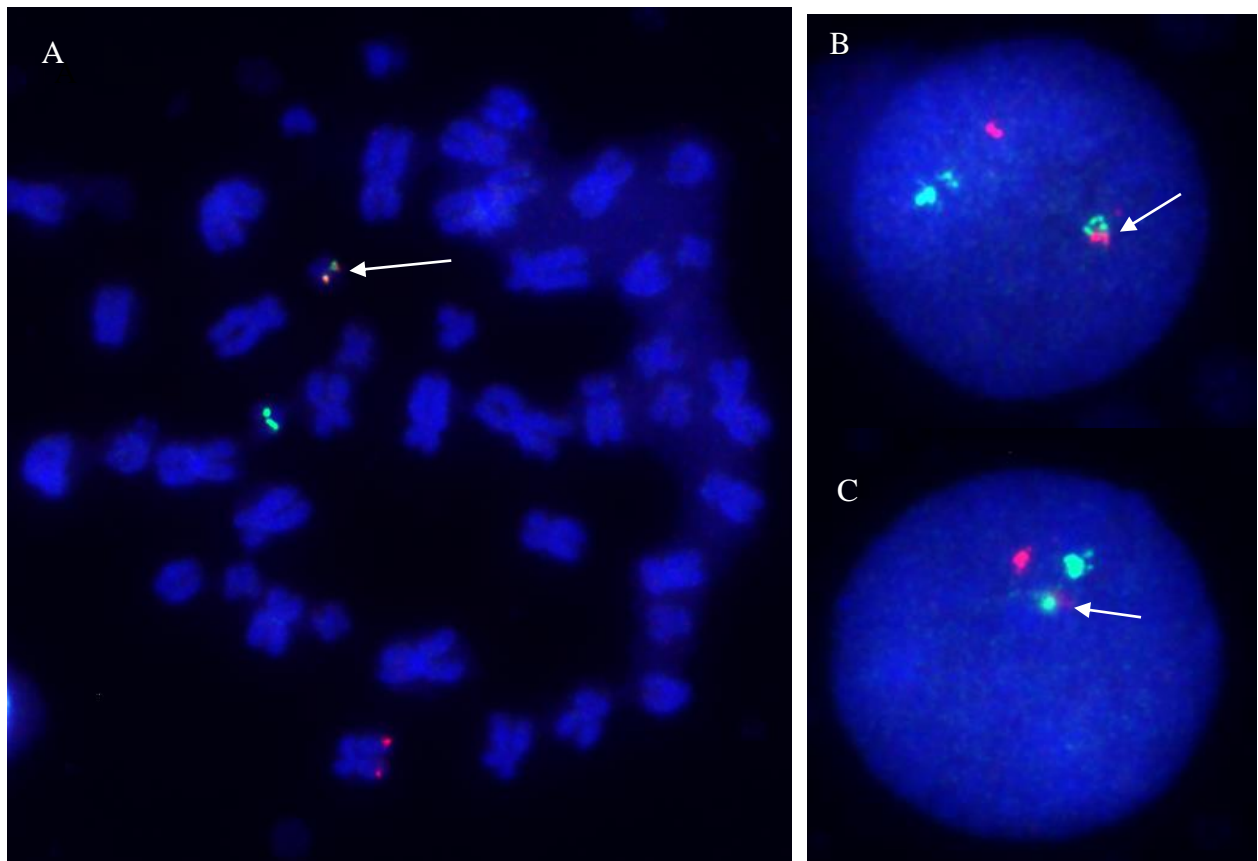


Figure 32 : Analyse FISH *BCR::ABL* de la patiente **P1**.

Les signaux de fusion sont indiqués par les flèches blanches dans les cellules de LMC. (A) Le chromosome Philadelphie, der(22)t(9;22) est indiqué par la flèche blanches (métaphases). Les image (B) et (C) représentent des noyaux interphasiques dans lesquels nous avons observé des signaux de fusion.

4.3.1.2. Caryotype

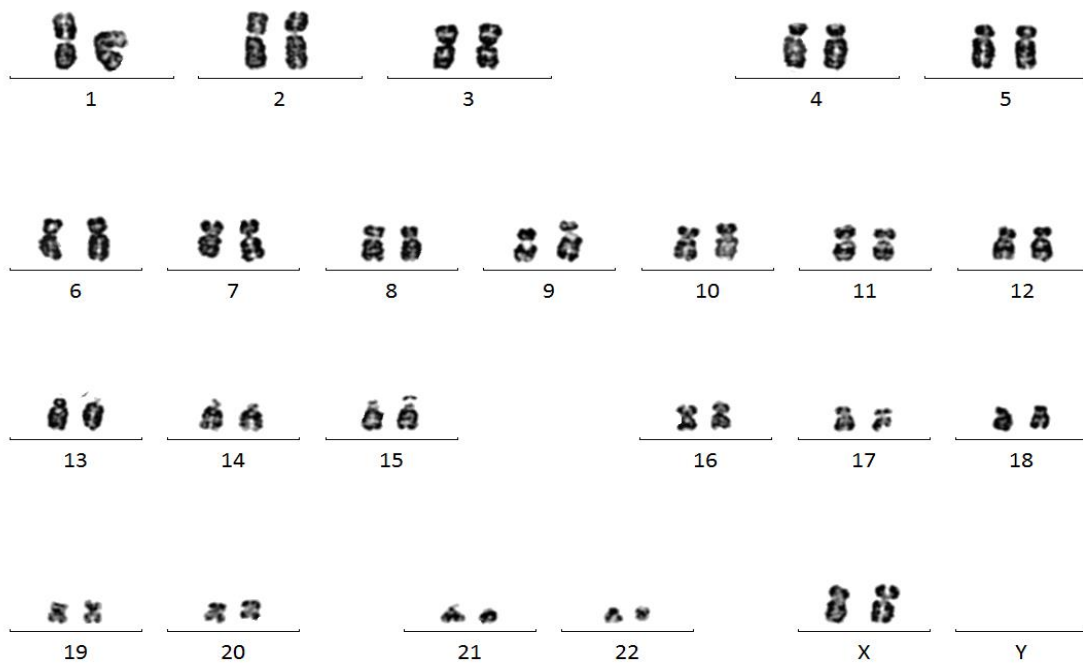


Figure 33 : Caryotype au marquage DAPI de la patiente P1.



Figure 34: Caryotype multicolore de la patiente P1.

Le chromosome Philadelphie est indiqué par la flèche rouge et le dérivé 9 présentant une inversion péricentrique est indiqué la flèche blanche.

4.3.1.3. Analyse des télomères

4.3.1.3.1. Bras courts

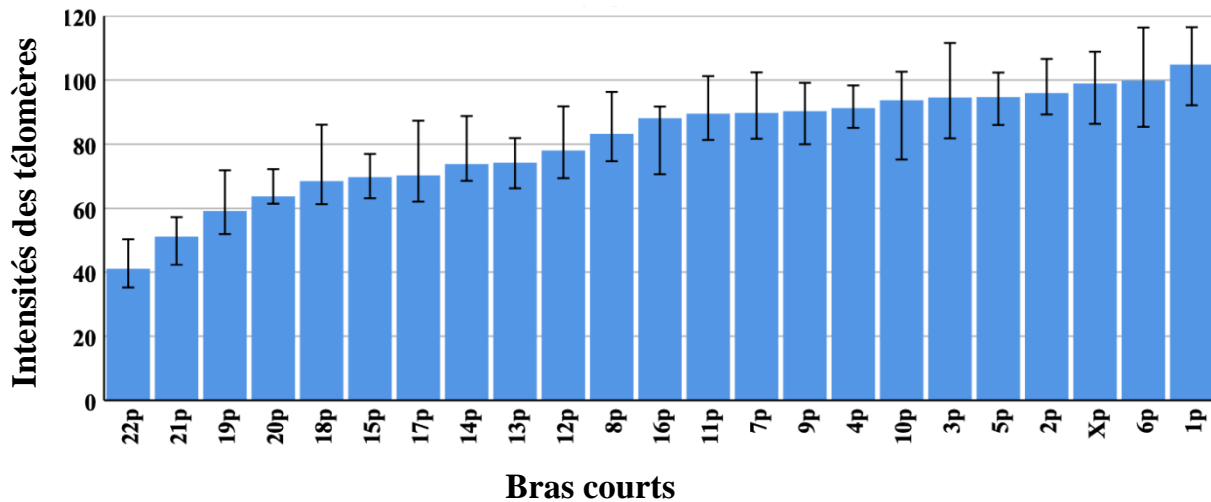


Figure 35: Représentation de la médiane des intensités télomériques des bras courts.

Les bras courts 1p, 6p et Xp présentait les intensités télomériques les plus élevées alors que celles sur les bras 22p, 21p et 19p étaient les plus faibles.

4.3.1.3.2. Bras longs

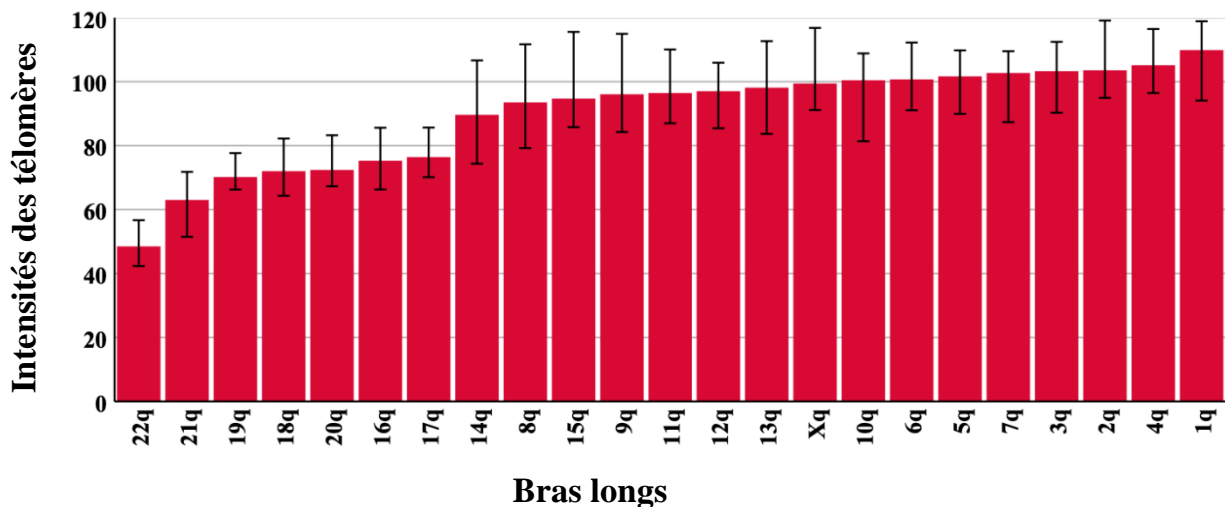


Figure 36: Représentation de la médiane des intensités télomériques des bras longs.

Les bras longs 1q, 4q et 2q avaient les médianes les plus élevées et les bras longs 22q et 21q avaient celles plus basses.

4.3.1.3.3. Profil télomérique des dérivés 9 et 22

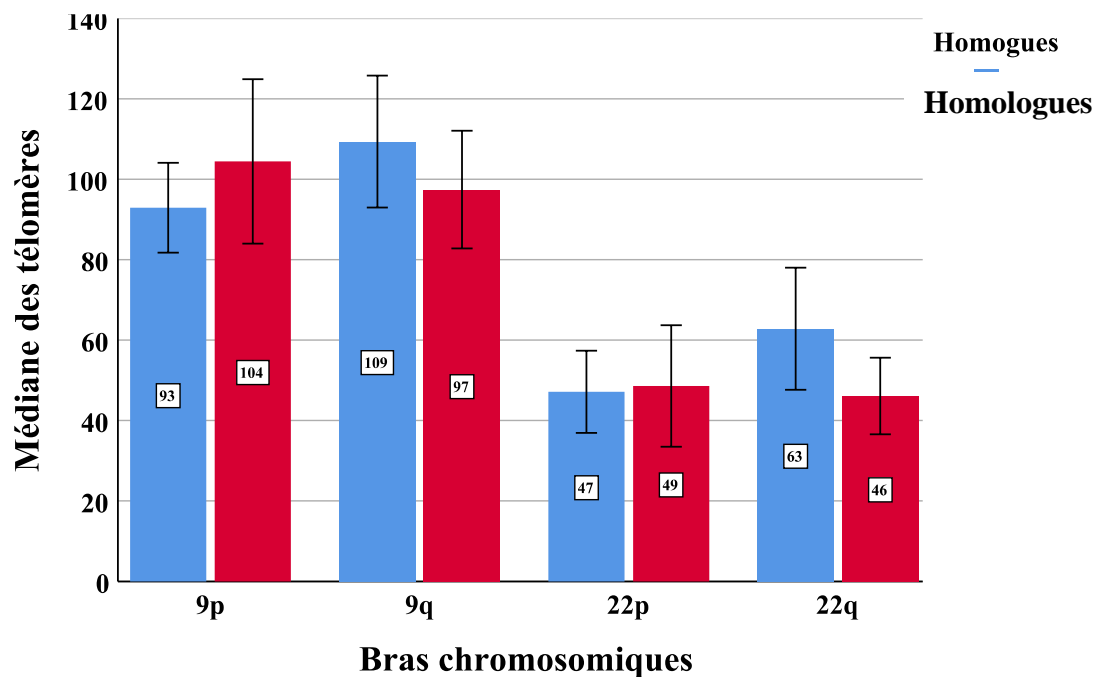


Figure 37 : Intensité globale des télomères des dérivés 9 et 22.

La couleur rouge représente les dérivés 9 et 22, bleu est celui de leur homologue normal.

4.3.1.3.4. Ratio des bras courts sur les bras longs (p/q)

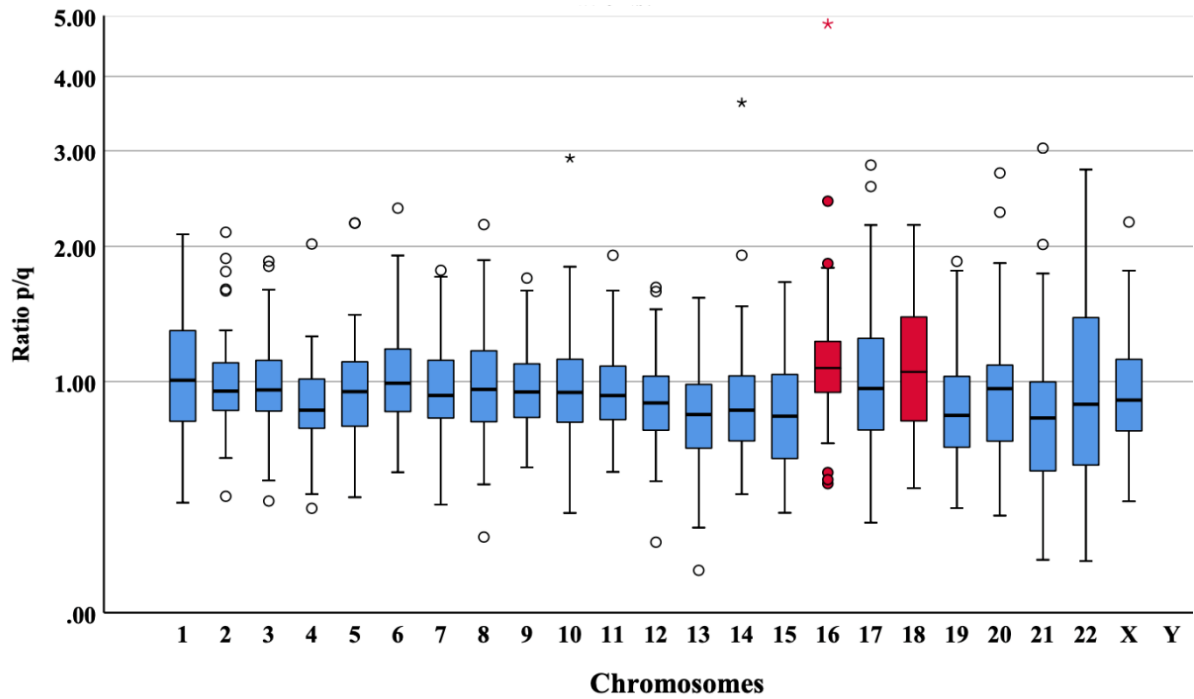


Figure 38: Représentation du ratio (p/q) des intensités télomériques.

Les médianes du ratio p/q des intensités télomériques sur les chromosomes 1 et 6 étaient presque similaires, alors qu'on remarquait que les intensités sur des télomères sur les bras courts des chromosomes 16 et 18 étaient plus élevées et ceux des bras longs de ces mêmes chromosomes.

4.3.2. Patient : P2

Le patient **P2** était un homme âgé de 21 ans qui a été référé pour une suspicion de LMC à cause d'une hyperleucocytose. La numération formule sanguine montrait une anémie normocytaire hypochrome, une hyperleucocytose à $288,97 \times 10^3/\mu\text{L}$ à prédominance neutrophile (71%) avec 14% de myélocytes, 2% de métamyélocytes, 5% de lymphocytes, 3% d'éosinophiles et 3% de basophiles. Le taux d'hémoglobine était de 5,1 g/dL et les thrombocytes étaient à $385 \times 10^3/\mu\text{L}$. L'hybridation fluorescente *in situ* a montré des signaux de fusion *BCR::ABL1* dans 100% des métaphases analysées et confirmé le diagnostic de la LMC. Les patrons de signaux à la FISH-*BCR::ABL1* des noyaux étaient : 1F, 1R, 1G (Figure 39B et 39C). Sur les métaphases, on notait les signaux normaux de *ABL1* et de *BCR*, respectivement sur les bras longs des chromosomes 9 et 22, un signal de fusion sur le chromosome Philadelphie, le dérivé 22. Le dérivé 9 n'était pas identifiable (Figure 39A). Au caryotype spectral M-FISH (Figure 41), nous n'avons pas pu déterminer les dérivés 9 et 22 à cause de leur taille relativement semblable à celle des chromosomes 9 et 22. En intégrant les données FISH *BCR::ABL1* sur métaphase à celle de M-FISH, on peut suggérer que les points de cassure de *BCR* et *ABL1* de **P2** étaient unique dans la cohorte d'étude. Les métaphases de **P2** présentaient des télomères les plus courts que celles des autres patients. Les télomères individuels les plus longs étaient 1p, 1q et 14q alors que les plus courts étaient 21p, 22p et 21q (Figures 42 et 43). La particularité des télomères individuels du patient **P2** était que les télomères sur les bras courts du chromosome 22 et du dérivé 22 étaient plus courts que ceux sur les bras longs des mêmes chromosomes (Figure 44).

4.3.2.1. Chromosome Philadelphie par FISH $BCR::ABL1$

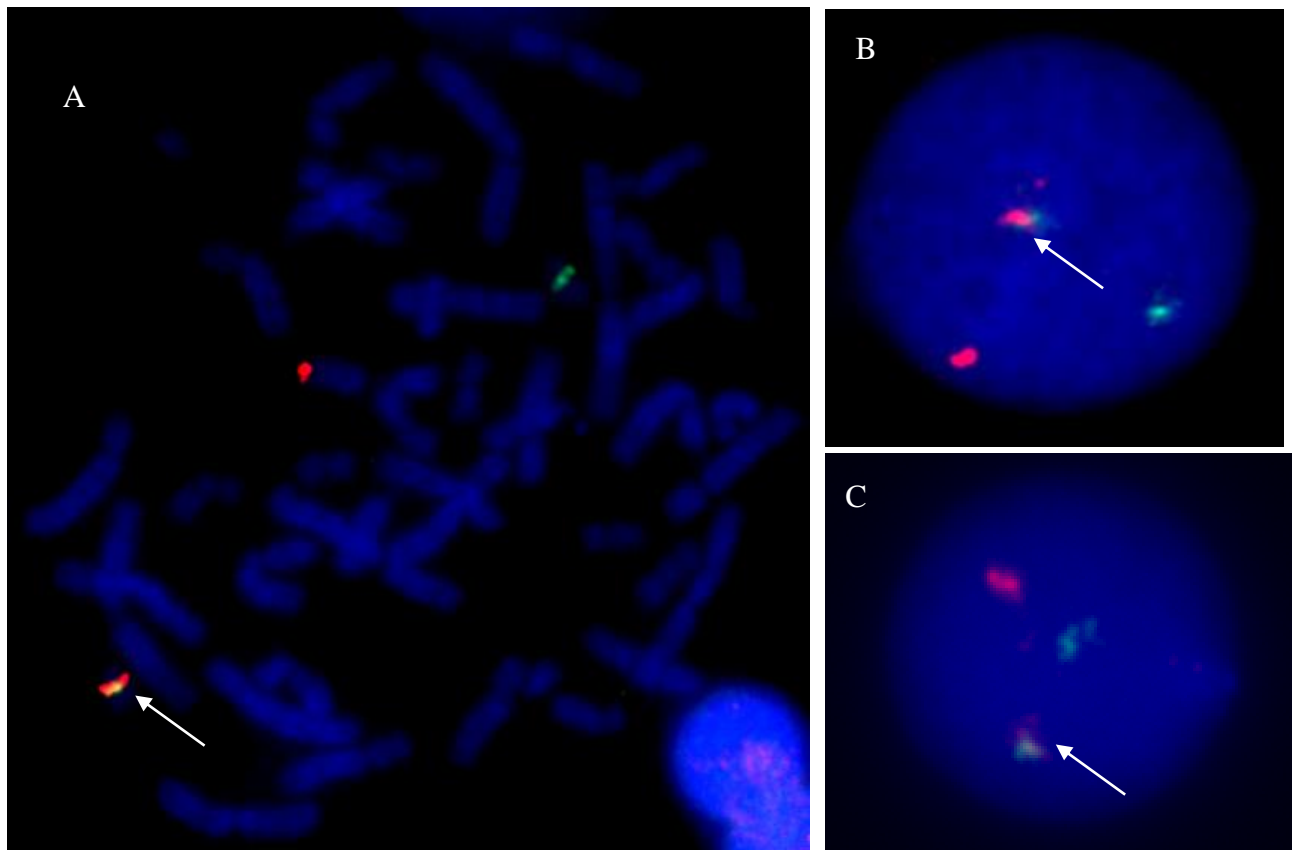


Figure 39 : Analyse FISH $BCR::ABL$ du patient **P2**

Les signaux de fusion sont indiqués par les flèches blanches dans les cellules de LMC. (A) Le chromosome Philadelphie, $der(22)t(9;22)$ est indiqué par la flèche blanches (métaphases). Les image (B) et (C) représentent des noyaux interphasiques dans lesquels nous avons observé des signaux de fusion.

4.3.2.2. Caryotype

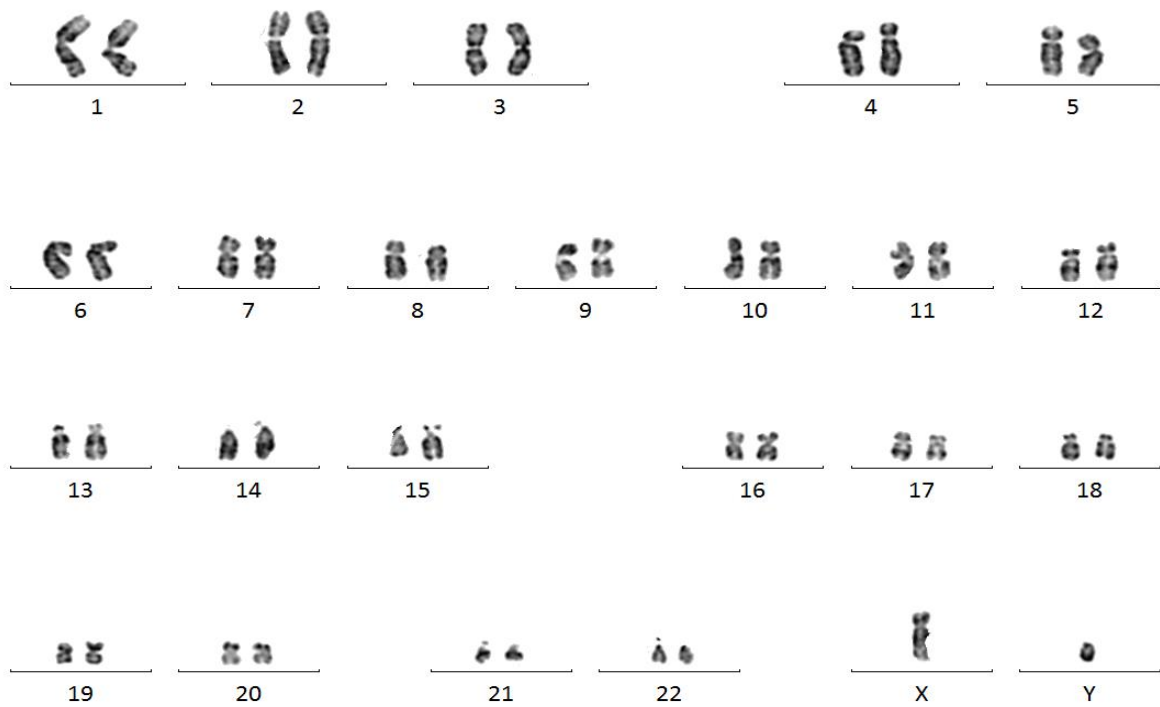


Figure 40: Caryotype au marquage DAPI du patient P2

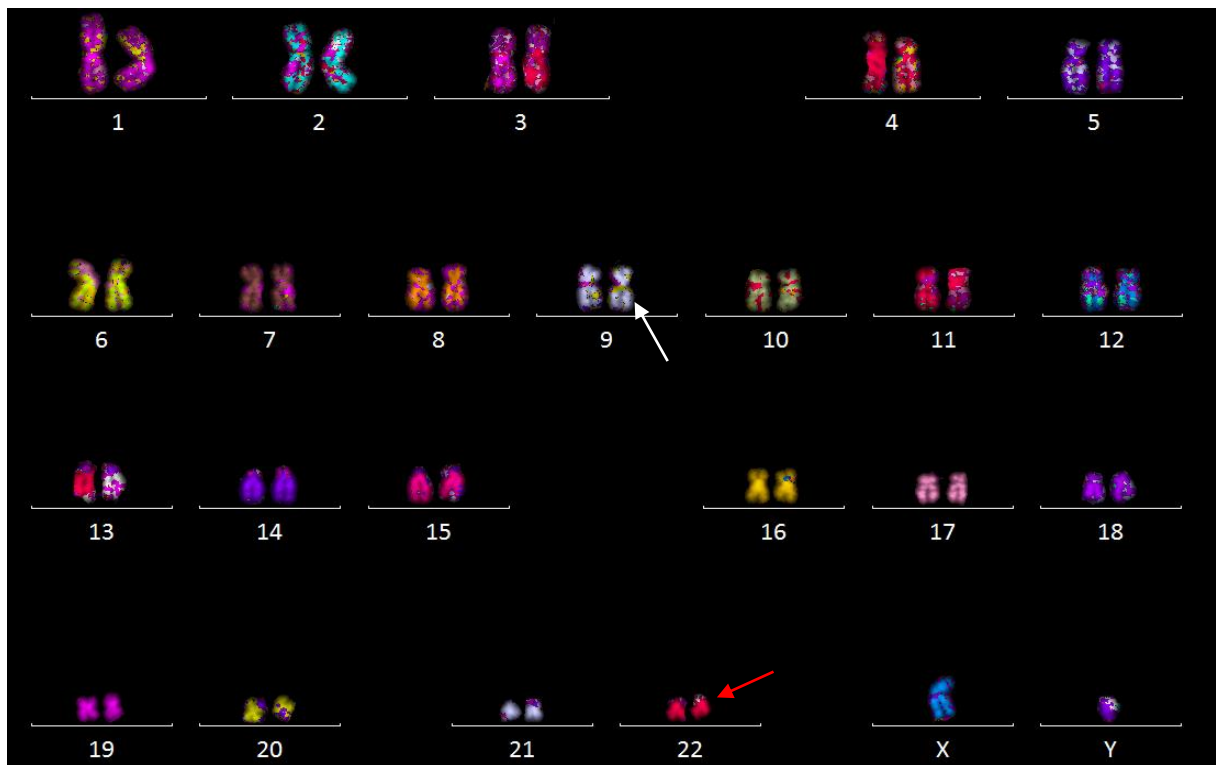


Figure 41: Caryotype multicolore du patient P2

Image FISH multicolore montrant le chromosome Philadelphie (flèche rouge) et le dérivé 9 (flèche blanc).

4.3.2.3. Analyse des télomères

4.3.2.3.1. Bras courts

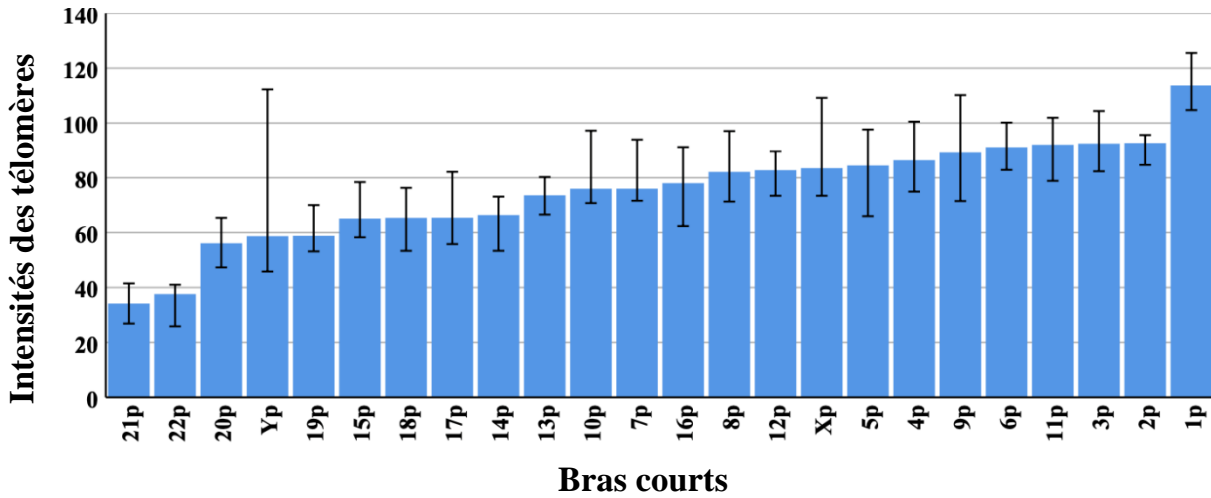


Figure 42 : Représentation de la médiane des intensités télomériques des bras courts.

Représentation de la médiane des intensités télomériques des bras courts.

Les bras courts 1p, 2p et 3p présentaient les intensités télomériques les plus élevées alors que celles sur les bras 21p et 22p.

4.3.2.3.2. Bras Longs

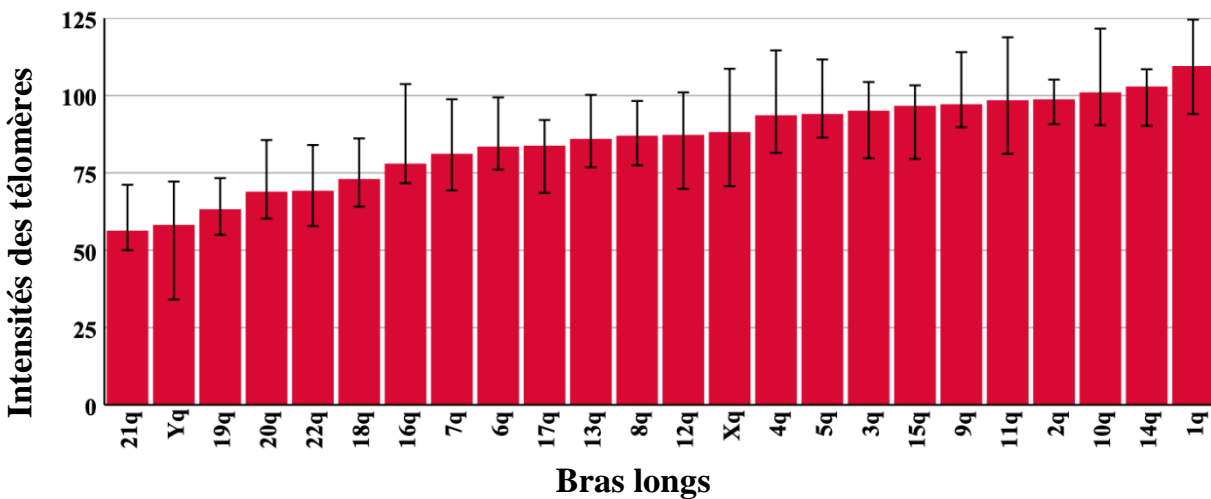


Figure 43: Représentation de la médiane des intensités télomériques des bras longs.

Les bras longs 1q, 14q et 10q avaient les médianes les plus élevées et les bras longs 21q, Yq et 19p avaient les plus basses médianes.

4.3.2.3.3. Profil télomérique des dérivés 9 et 22

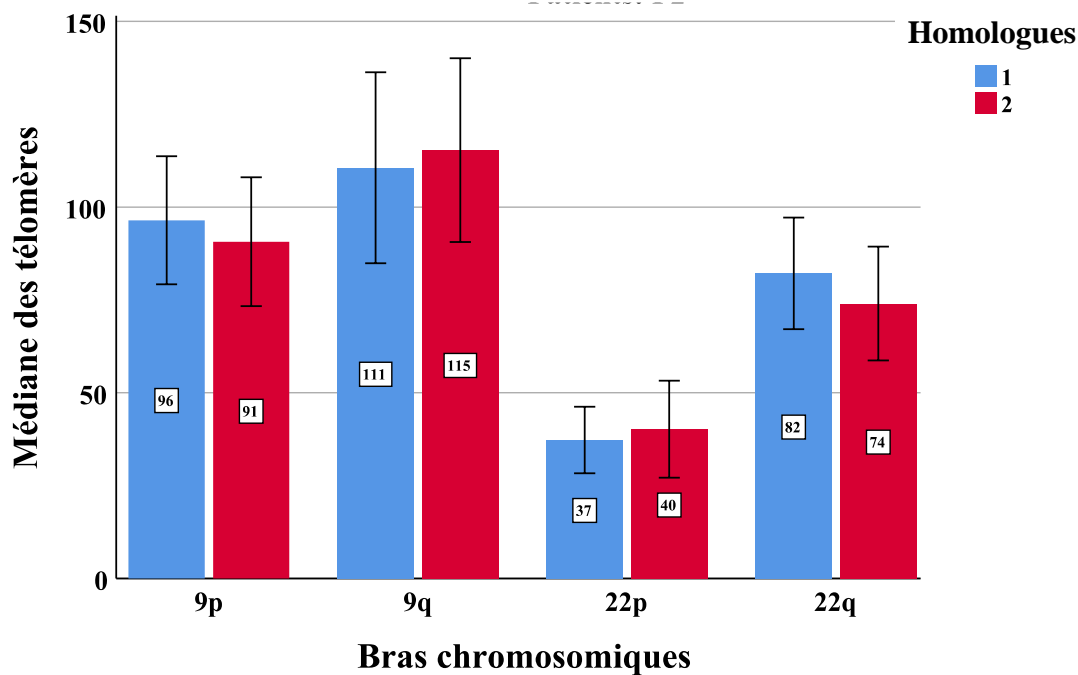


Figure 44: Intensité globale des télomères des dérivés 9 et 22.

La couleur rouge représente les dérivés 9 et 22, la bleue est celui de leur homologue normal.

4.3.2.3.4. Ratio bras court sur bras long p/q

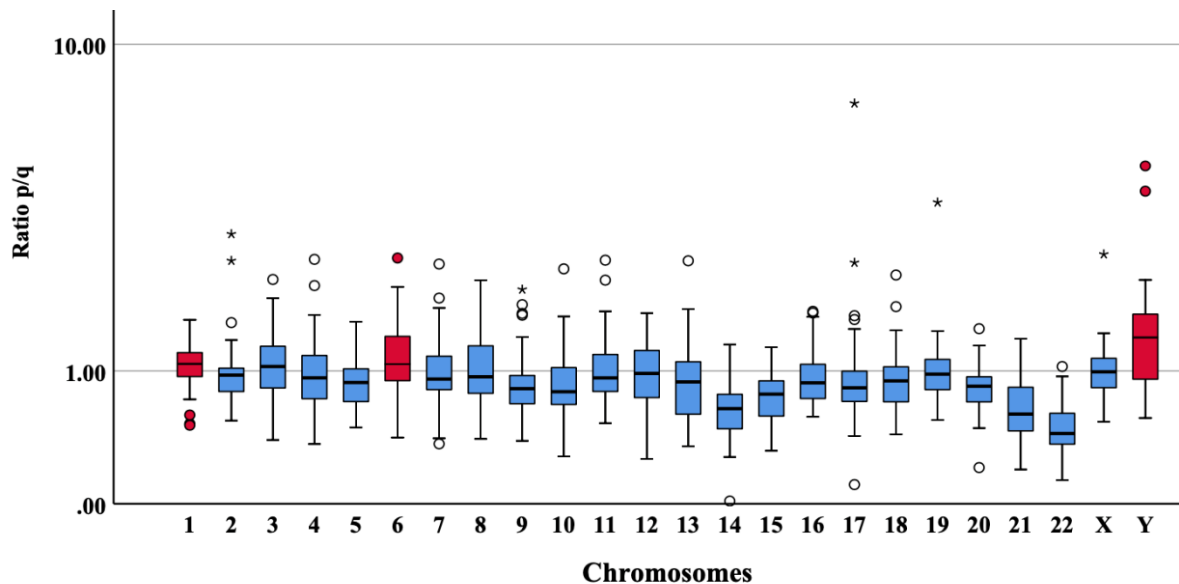


Figure 45: Représentation du ratio (p/q) des intensités télomériques.

Les médianes du ratio p/q des intensités télomériques sur les chromosomes 3 et X étaient presque similaires, alors qu'on remarquait que les intensités sur des télomères sur les bras courts des chromosomes 1, 6 et Y étaient plus élevées et ceux des bras longs de ces mêmes chromosomes.

4.3.3. Patient : P3

La patiente P3 était une femme de 48 ans qui a été référée pour une suspicion de LMC sur la base biologique d'une hyperleucocytose. La numération formule sanguine montrait une hyperleucocytose à $289,2 \times 10^3/\mu\text{l}$ à prédominance neutrophiles (40%) avec 25% de myélocytes, 6% de métamyélocytes, 3% de lymphocytes, 4% d'éosinophiles et 4% de basophiles. Le taux d'hémoglobine était de 10,4 g/dl et les thrombocytes étaient à $1660 \times 10^3/\mu\text{l}$. L'hybridation fluorescente *in situ* a montré des signaux de fusion *BCR::ABL* dans 98% des noyaux interphasiques et 100% des métaphases analysées et a confirmé le diagnostic de la LMC. Les patrons des signaux FISH-*BCR::ABL1* dans les noyaux étaient: 1F, 2R, 1G (Figure 46). Sur les métaphases, on notait les signaux normaux de *ABL1* et de *BCR*, respectivement sur les bras longs des chromosome 9 et 22, un signal de fusion sur un chromosome qui n'avait pas la morphologie typique d'un chromosome Philadelphie. Un signal *ABL1* était présent sur le bras long du chromosome sur lequel nous avons noté présentant le signal fusion (Figure 44). Il n'était pas possible de savoir avec exactitude ce qui signifiait la colocalisation du signal *ABL1* et de celui de la fusion *BCR::ABL1* sur le même chromosome. Le signal de fusion sur le dérivé 9 n'était pas présent sur aucun des deux chromosomes 9. Le caryotype spectral M-FISH (Figure 46) a fourni des informations supplémentaires concernant le chromosome porteur de fusion avec une morphologie atypique. Il s'agissait d'une translocation complexe impliquant les chromosomes 22, 9 et 16. En plus de cette translocation complexe, nous avons remarqué une trisomie X (Figure 48). Les télomères individuels les plus longs étaient 3q, Xq et 6p alors que les plus courts étaient 21p, 14p et 21q (Figures 49, 50). Sur les deux bras chromosomiques, les télomères du chromosome 9 normal étaient plus longs que ceux du dérivé 9. Cependant, c'étaient les télomères sur les bras chromosomiques du dérivé 22 qui étaient plus longs que ceux sur le chromosome 22 (Figure 51)

4.3.3.1. Chromosome Philadelphie par FISH BCR::ABL1

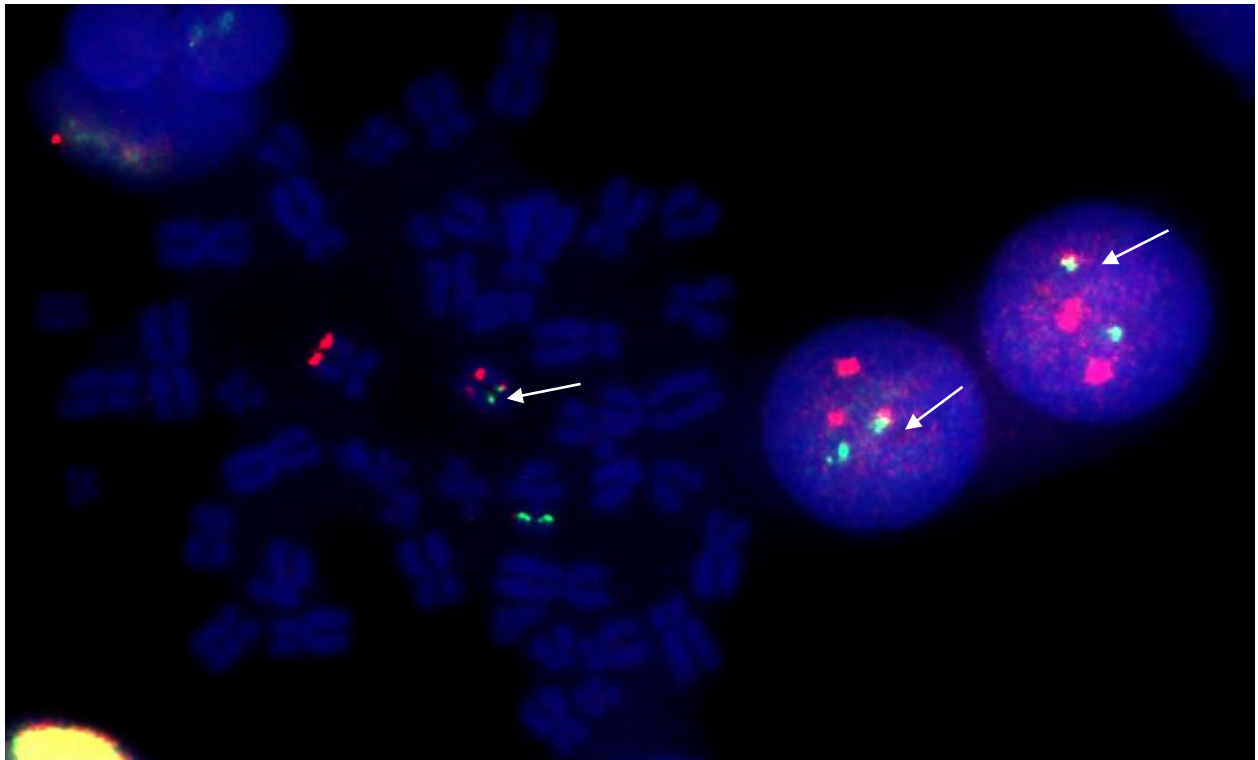


Figure 46: Analyse FISH BCR ::ABL1 du patient P3.

Les signaux de fusion sont indiqués par les flèches blanches dans les cellules de la LMC. (A) Le chromosome Philadelphie, der(22)t(9;22) est indiqué par la flèche blanche (métaphases), et dans des noyaux interphasiques dans lesquels nous avons observé des signaux de fusion.

4.3.3.2. Caryotype classique

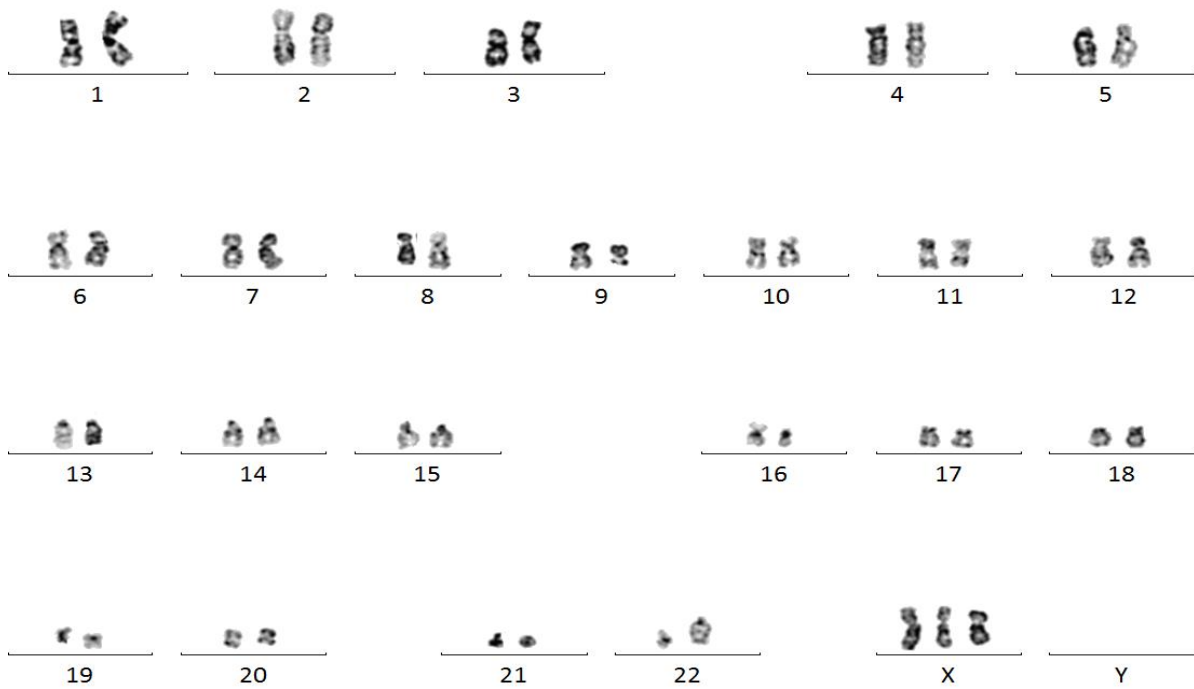


Figure 47: Caryotype au marquage DAPI de la patiente P3.

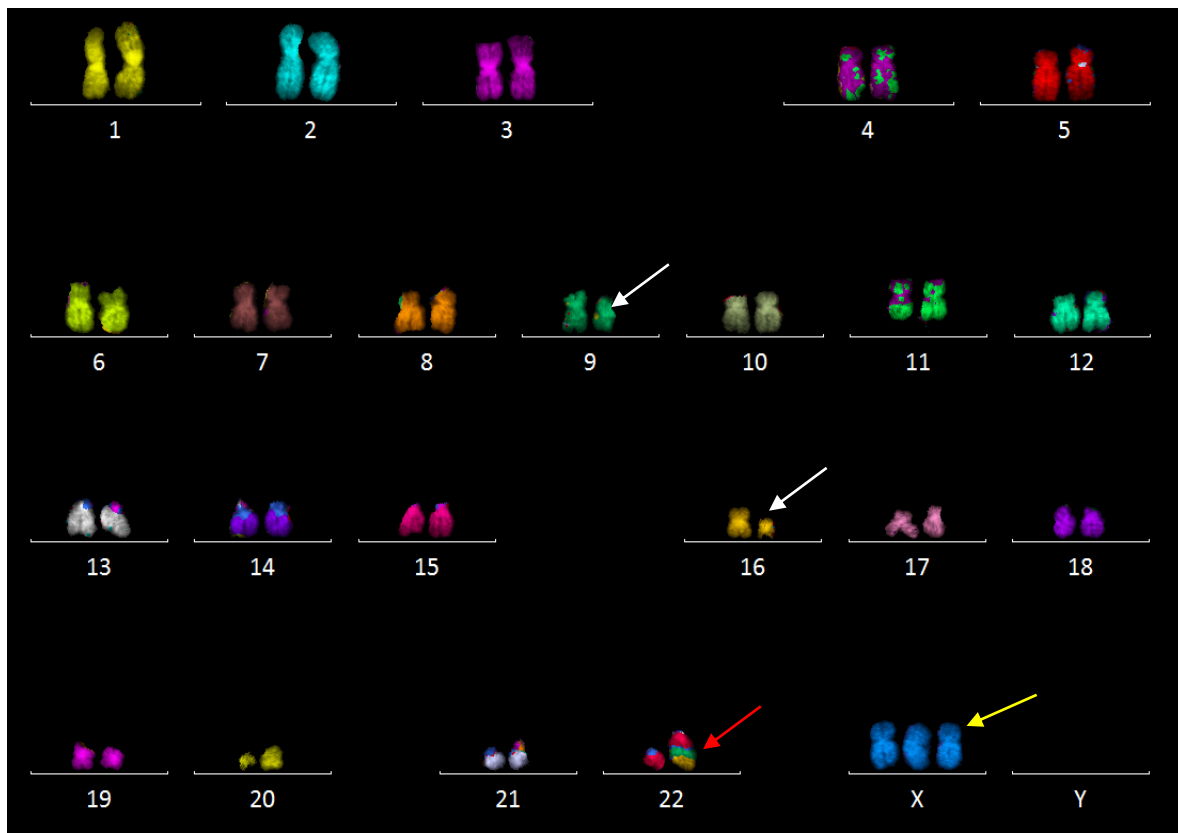


Figure 48: Caryotype FISH multicolore de la patiente P3.

Image FISH multicouleur montrant la translocation complexe t(22,9,16) (flèche rouge) sur le chromosome 22, le dérivé 9 (flèche blanc) et le dérivé 16 (flèche blanche); et une trisomie X (flèche jaune).

4.3.3.3. Analyses des télomères.

4.3.3.3.1. Bras Courts

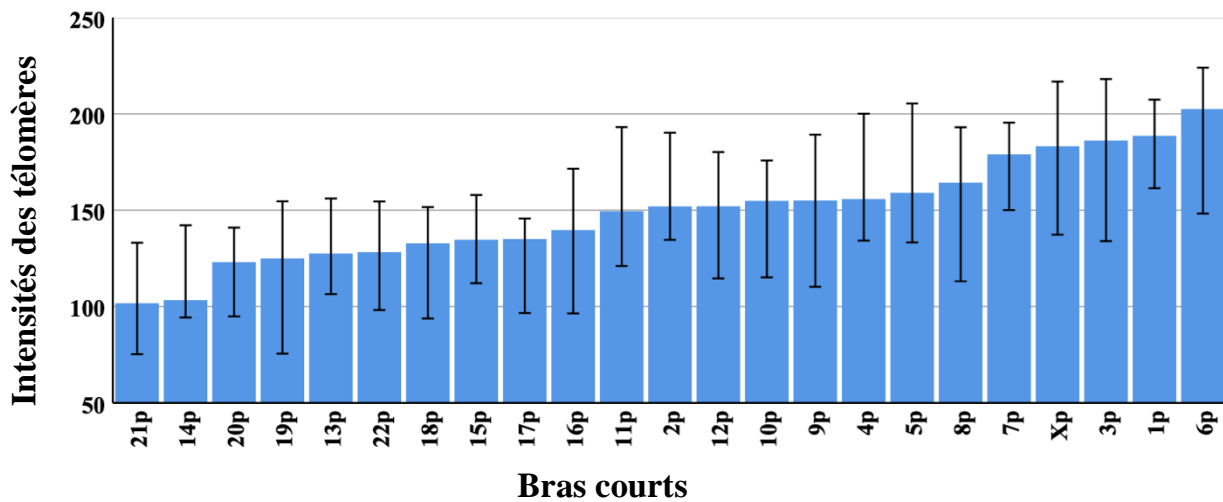


Figure 49: Représentation de la médiane des intensités télomériques des bras courts.

Les bras courts 6p, 1p, 3p et Xp présentaient les intensités télomériques les plus élevées alors que celles sur les bras 21p et 14p et 19p étaient les plus faibles.

4.3.3.3.2. Bras Longs

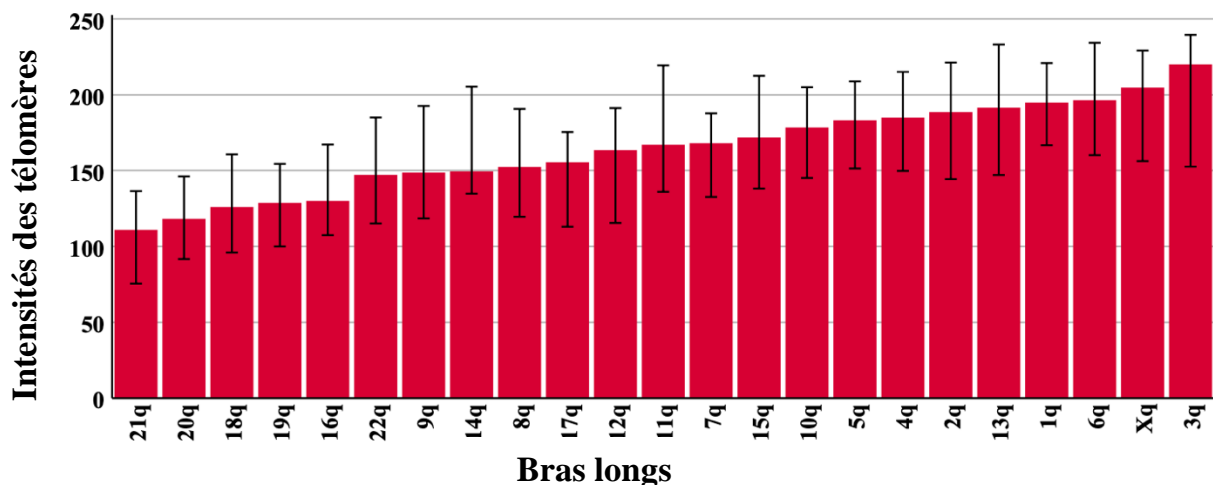


Figure 50: Représentation de la médiane des intensités télomériques des bras longs.

Les bras longs 3q, Xq et 6q avaient les médianes les plus élevées et les bras longs 21q et 22q avaient les plus basses médianes.

4.3.3.3. Intensité télomériques des dérivés 9 et 22

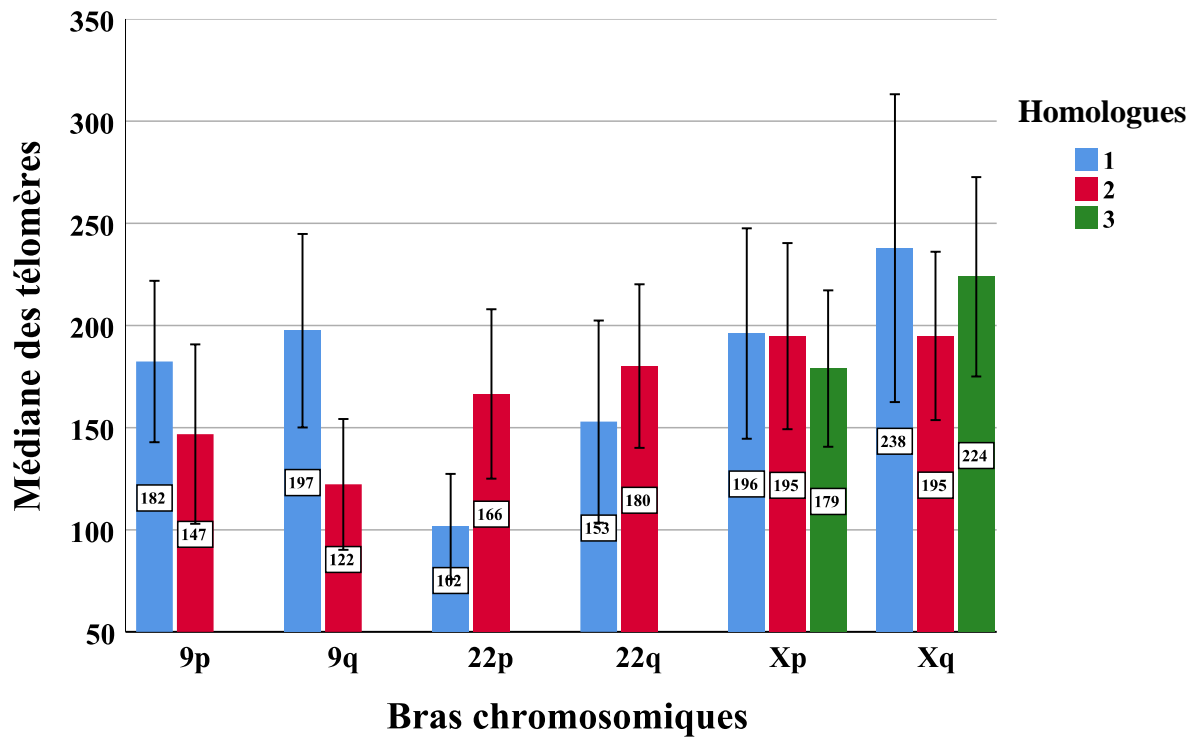


Figure 51 : Intensité globale des télomères des bras chromosomique 9 et 22.

La couleur rouge représente les dérivés 9 et 22, la bleue est celui de leur homologue normal. Et le la couleur verte pour les chromosomes X.

4.3.3.3.4. Ratio bras court sur bras long p/q

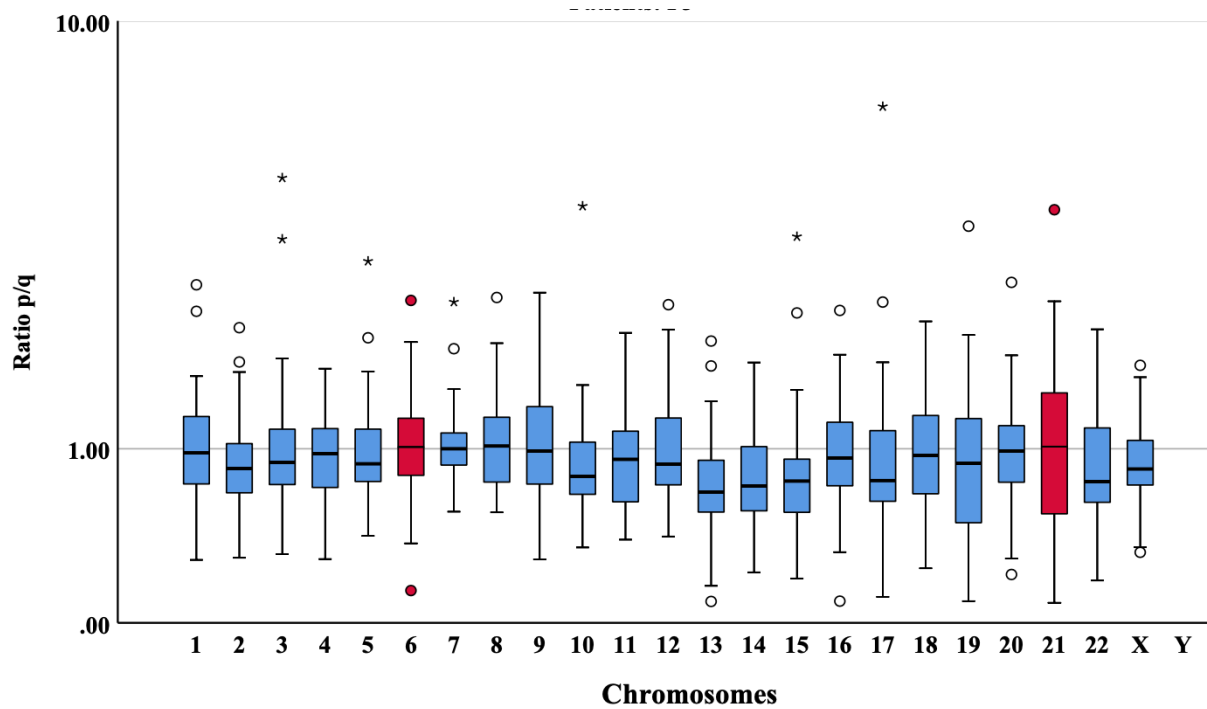


Figure 52: Représentation du ratio (p/q) des intensités télomériques.

Les médianes du ratio p/q des intensités télomériques sur les chromosomes 6 et 21 étaient presque similaires.

4.3.4. Patient : P4

Il s'agit d'un homme de 21 ans qui a été référé pour suspicion de LMC sur la base biologique d'une hyperleucocytose. La numération formule sanguine montrait une anémie normocytaire hypochrome ; une hyperleucocytose à $735,06 \times 10^3/\mu\text{L}$ à prédominance neutrophiles (52%) avec 24% de myélocytes, 4% de métamyélocytes, 1% de lymphocytes, 2% d'éosinophiles et 1% de basophiles. Le taux d'hémoglobine était de 8 g/dL et les thrombocytes étaient à $508 \times 10^3/\mu\text{L}$. L'analyse du caryotype de ses cellules de sang périphérique a montré le caryotype suivant : 46,XY,t(9;22) (Figure 49). L'hybridation fluorescente *in situ* a montré des signaux de fusion *BCR::ABL1* dans 98% des noyaux interphasiques et dans 100% des métaphases analysées et a confirmé le diagnostic de la LMC. Les patrons de signaux FISH-*BCR::ABL1* dans les noyaux étaient : 2F, 1R, 2G (Figure 53). Sur les métaphases, on notait les signaux normaux de *ABL1* et de *BCR*, respectivement sur les bras longs des chromosome 9 et 22, un signal de fusion sur le chromosome Philadelphie. On remarquait aussi la présence d'un signal de fusion d'un second chromosome Philadelphie (Figure 53). Le dérivé 9 était présent mais ne portait que le signal *BCR*. Le caryotype spectral M-FISH (Figure 55) montrait un caryotype classique de LMC. Les télomères individuels les plus longs étaient 3q, 4p et 8p alors que les plus courts étaient 22p, 21p et 19p (Figures 56 et 57). L'analyse des télomères des chromosomes impliqués dans la translocation t(9;22) a montré essentiellement que les télomères sur le bras court du chromosome 22 étaient significativement plus longs que ceux sur le bras court du dérivé 22 $P < 0,0001$ (Figure 58).

4.3.4.1. Chromosome Philadelphie par FISH BCR::ABL1

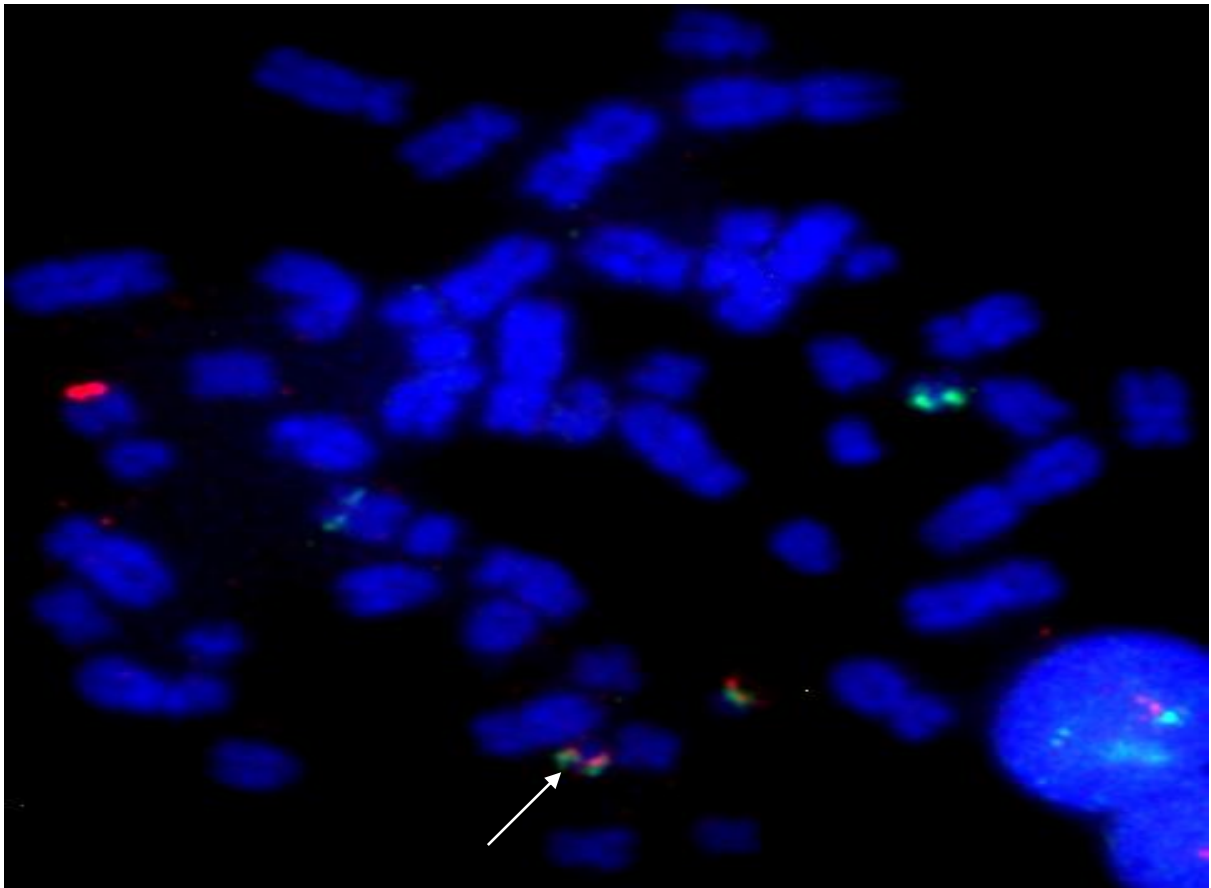


Figure 53: Analyse FISH BCR ::ABL1 du patient P4.

Les signaux de fusion sont indiqués par les flèches blanches dans les cellules de LMC. Le chromosome Philadelphie, der(22)t(9;22) est indiqué par la flèche blanche (métaphases).

4.3.4.2. Caryotype

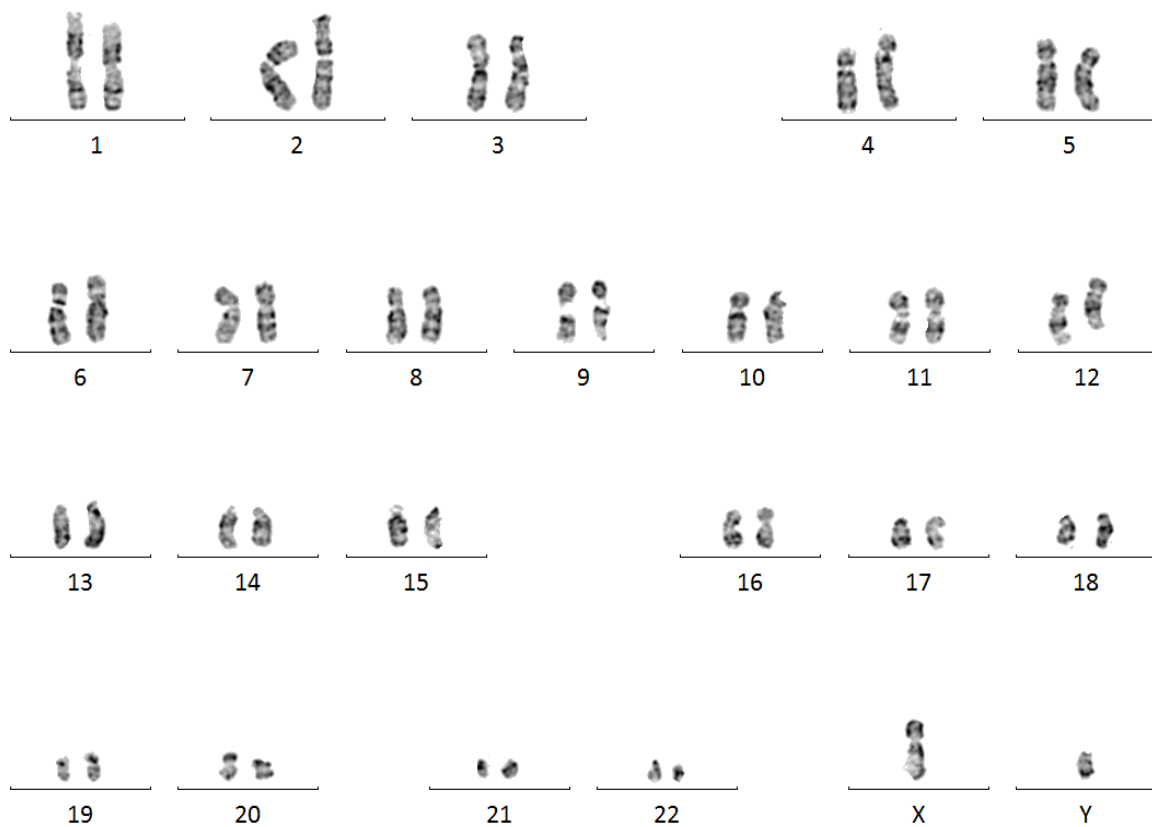


Figure 54: Caryotype au marquage DAPI du patient P4.

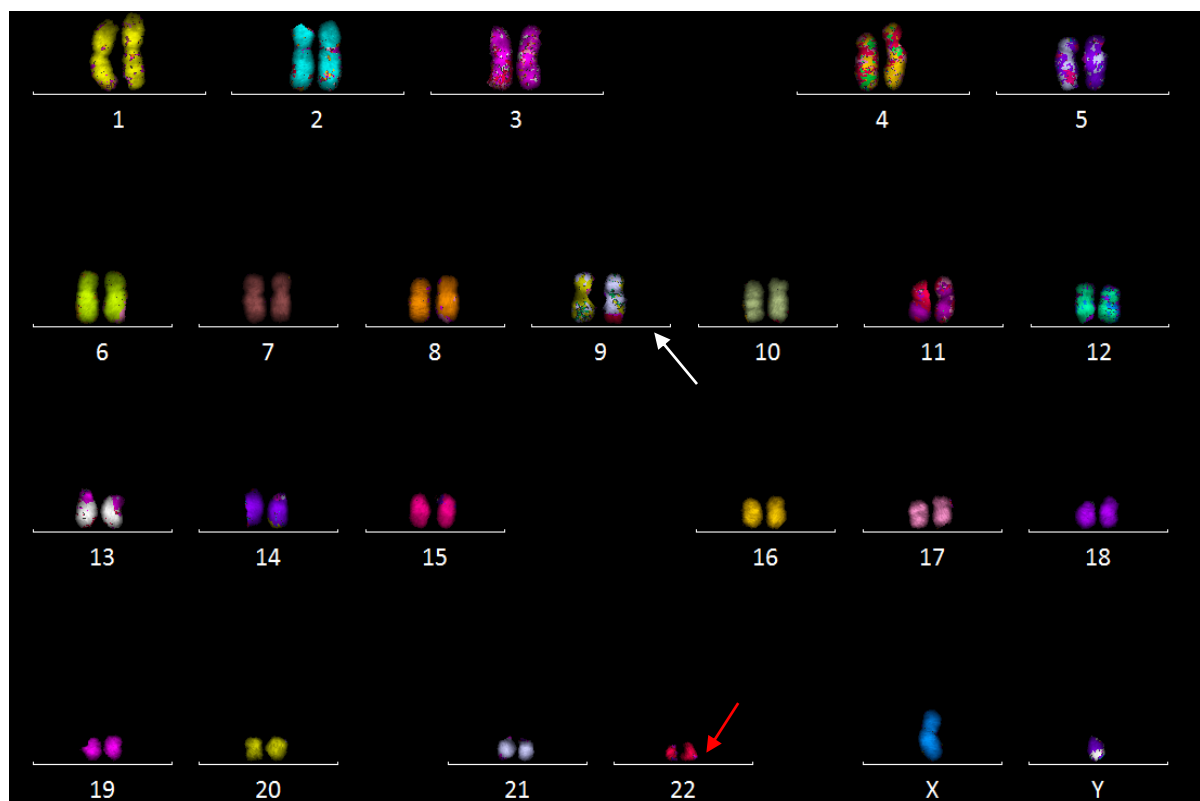


Figure 55: Caryotype multicolore du patient P4.

Le chromosome Philadelphie (flèche rouge) sur le dérivé 22 et le dérivé 9 (flèche blanc).

4.3.4.3. Analyse des télomères

4.3.4.3.1. Bras courts

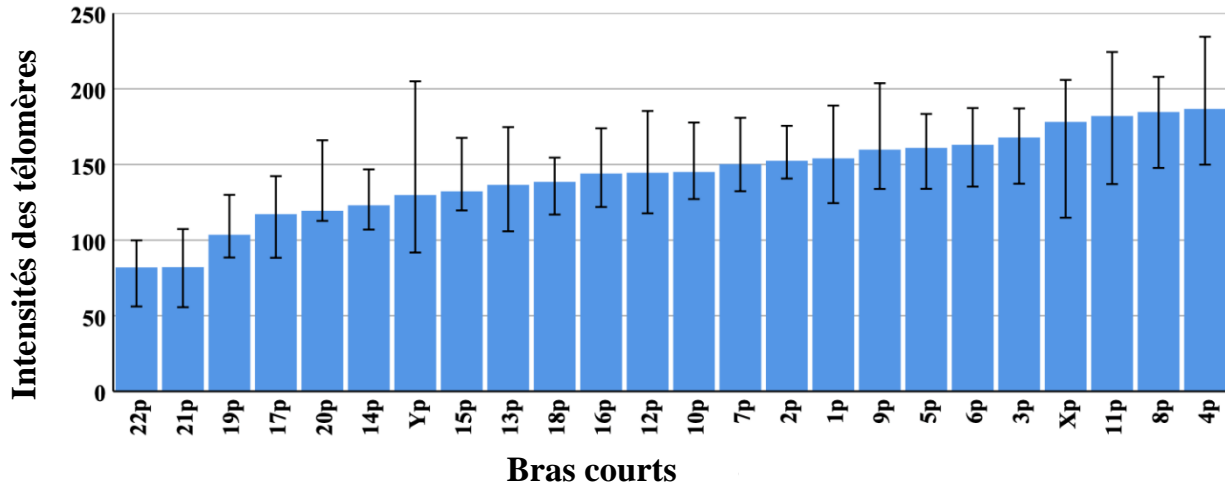


Figure 56: Représentation de la médiane des intensités télomériques des bras courts.

Les bras courts 4p, 8p, 11p et Xp présentait les intensités télomériques les plus élevées alors que celles sur les bras 22p, 21p et 19p étaient les plus faibles.

4.3.4.3.2. Bras longs

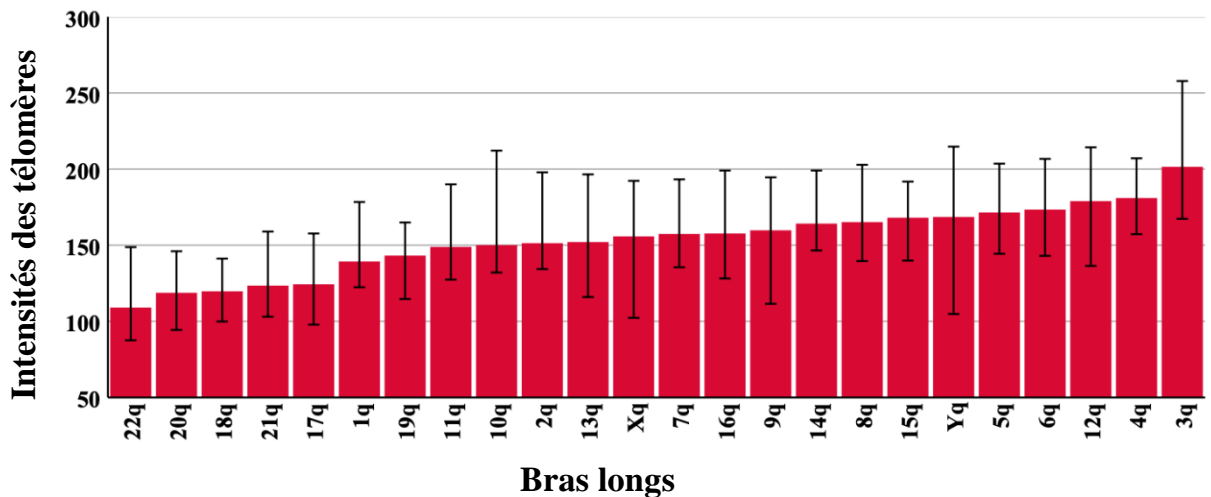


Figure 57: Représentation de la médiane des intensités télomériques des bras longs.

Les bras longs 3q, 4q et 12q avaient les médianes les plus élevées et les bras longs 22q et 20q avaient les plus basses médianes.

4.3.4.3.3. Profil télomérique des dérivés 9 et 22

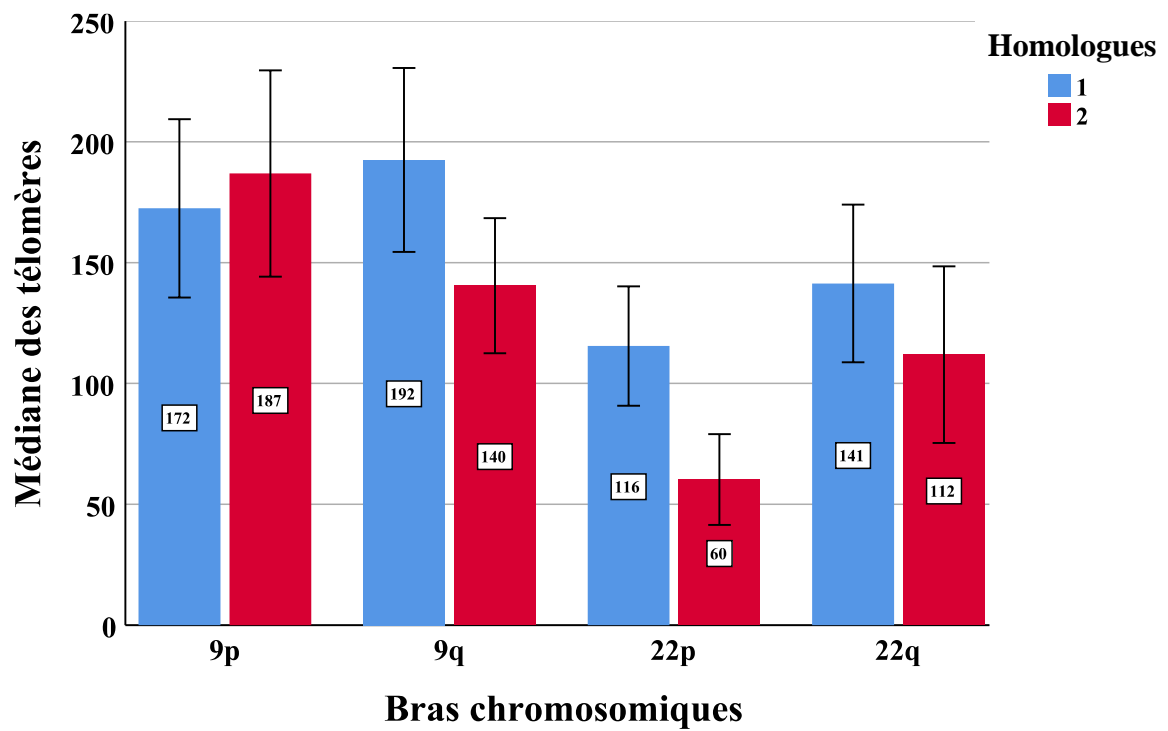


Figure 58: Intensité globale des télomères des dérivés 9 et 22.

La couleur rouge représente les dérivés 9 et 22, la bleue est celui de leur homologue normal.

4.3.4.3.4. Ratio bras court sur bras long (p/q)

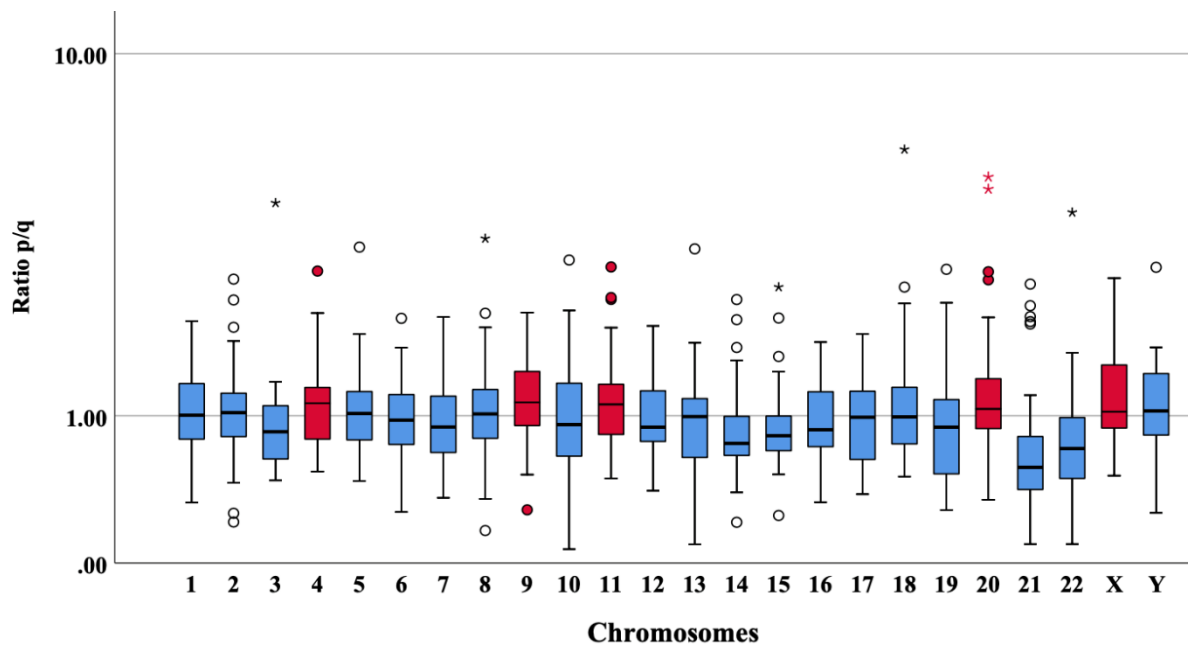


Figure 59: Représentation du ratio (p/q) des intensité télomériques.

Les médianes du ratio p/q des intensités télomériques sur les chromosomes 1, 13 et 18 étaient presque similaires, alors qu'on remarquait que les intensités sur des télomères sur les bras courts des chromosomes 4, 9, 11 et X étaient plus élevées et ceux des bras longs de ces mêmes chromosomes.

4.3.5. Patient : P5

Il s'agit d'un homme de 58 ans qui a été référé pour une suspicion de LMC sur la base biologique d'une hyperleucocytose. La numération formule sanguine montrait une anémie normocytaire hypochrome ; une hyperleucocytose à $293,6 \times 10^3/\mu\text{l}$ à prédominance neutrophiles ($190,84 \times 10^3/\mu\text{l}$) avec 14% de myélocytes, 4% de métamyélocytes, 4,5% de lymphocytes, $5,84 \times 10^3/\mu\text{l}$ d'éosinophiles et $1,93 \times 10^3/\mu\text{l}$ de basophiles. Le taux d'hémoglobine était de 8,2 g/dl et les thrombocytes étaient à $1253 \times 10^3/\mu\text{l}$. L'analyse du caryotype de ses cellules de sang périphérique a montré le caryotype suivant : 46, XY,t(9;22) (Figure 58). L'hybridation fluorescente *in situ* (FISH-BCR::ABL1) a montré des signaux de fusion BCR::ABL dans 95,5% des noyaux interphasiques et dans 100% des métaphases analysées et confirmé le diagnostic de la LMC. Le profil des signaux BCR::ABL1 dans les noyaux étaient: 1F, 1R, 1G (figure 58). Sur les métaphases, on notait les signaux normaux de ABL1 et de BCR, respectivement sur les bras longs des chromosome 9 et 22, un signal de fusion sur le chromosome Philadelphie. Le dérivé 9 n'était pas identifiable puisque son signal de fusion n'était présent sur aucun des deux chromosomes 9. Le caryotype spectral M-FISH (Figure 60) montrait un caryotype typique de la LMC. On remarquait le dérivé 9 qui n'était pas identifiable avec FISH-BCR::ABL1 sur métaphase. Les télomères individuels les plus longs étaient 2q, 3q et 1p, alors que les plus courts étaient Yq, 22p et 21p (Figures 61, 62). On notait aussi que les télomères sur les deux bras du dérivé 22 présentaient des longueurs similaires. (Figure 63).

4.3.5.1. Chromosome Philadelphie par FISH BCR::ABL1

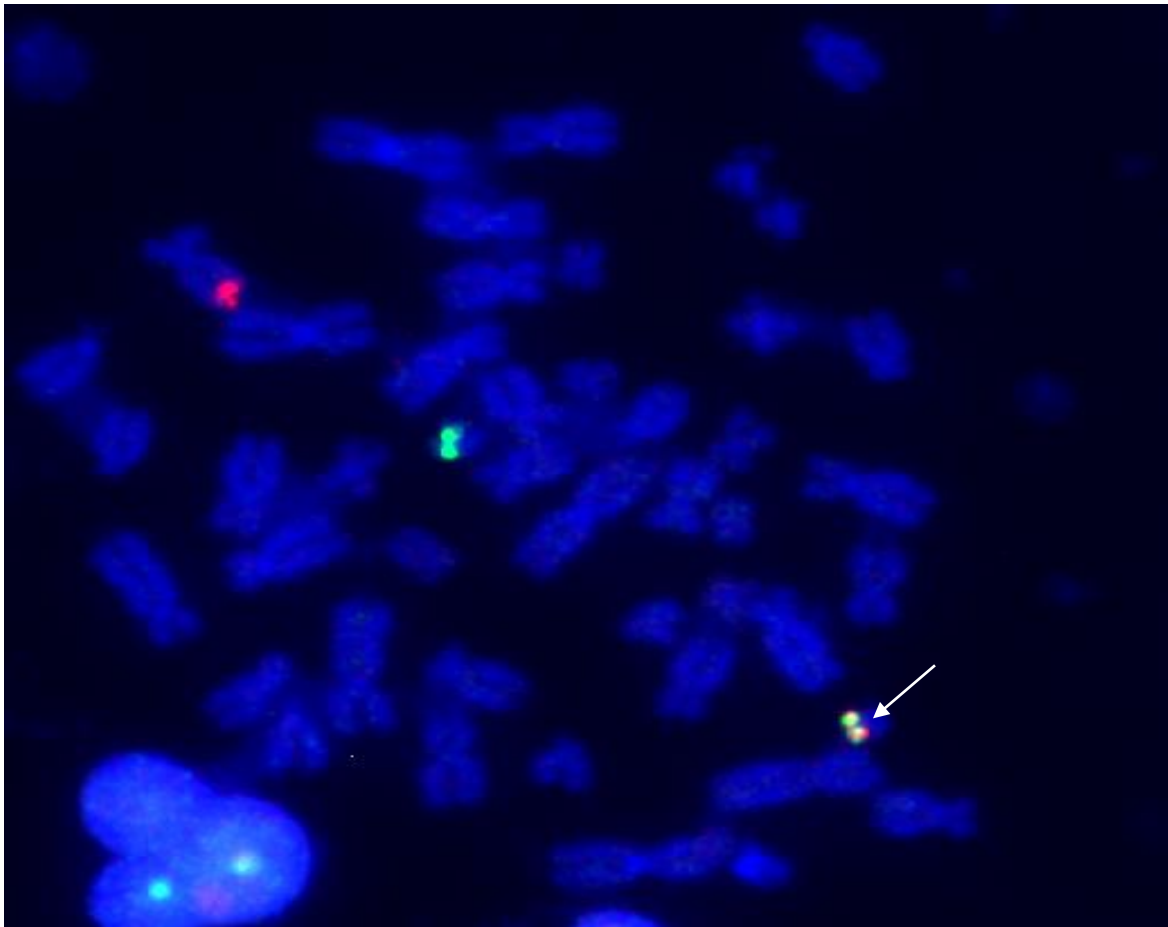


Figure 60: Analyse FISH BCR::ABL1 du patient **P5**.

Les signaux de fusion sont indiqués par les flèches blanches dans les cellules de LMC. Le chromosome Philadelphie, der(22)t(9;22) est indiqué par la flèche blanche (métaphases).

4.3.5.2. Caryotype

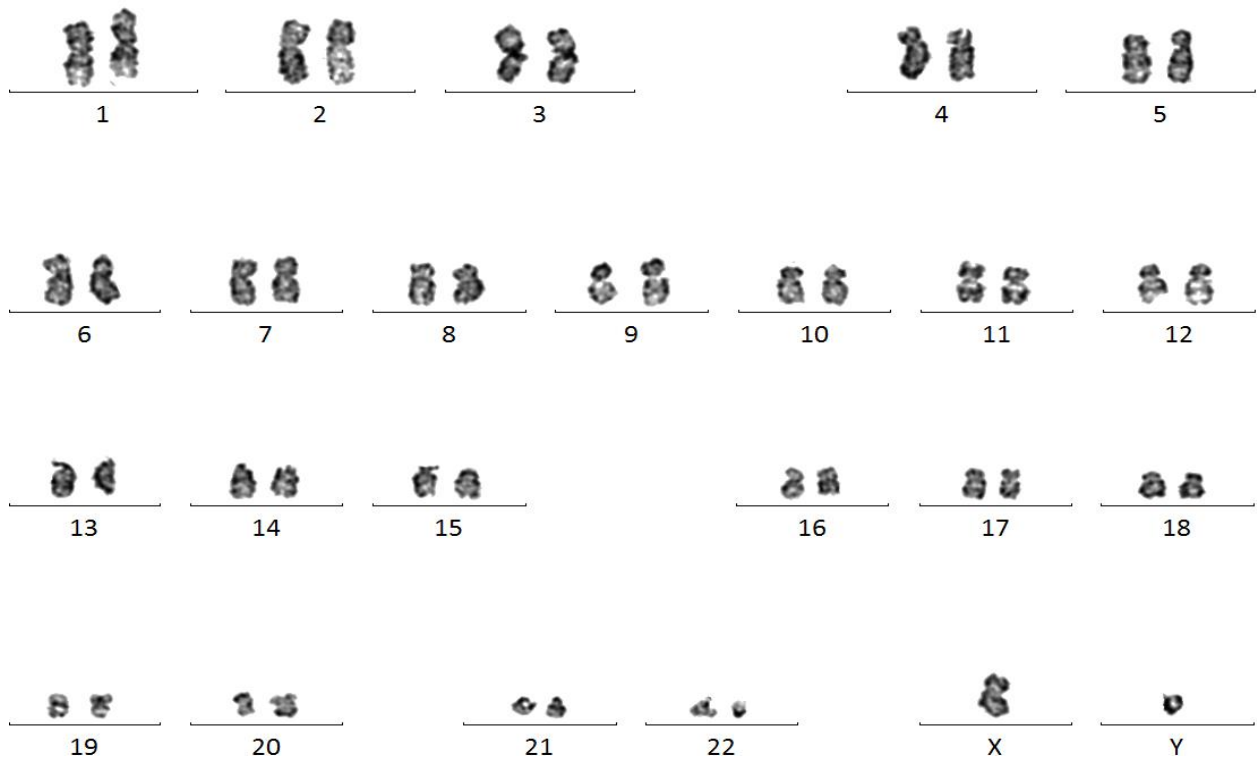


Figure 61: Caryotype au marquage DAPI du patient **P5**.

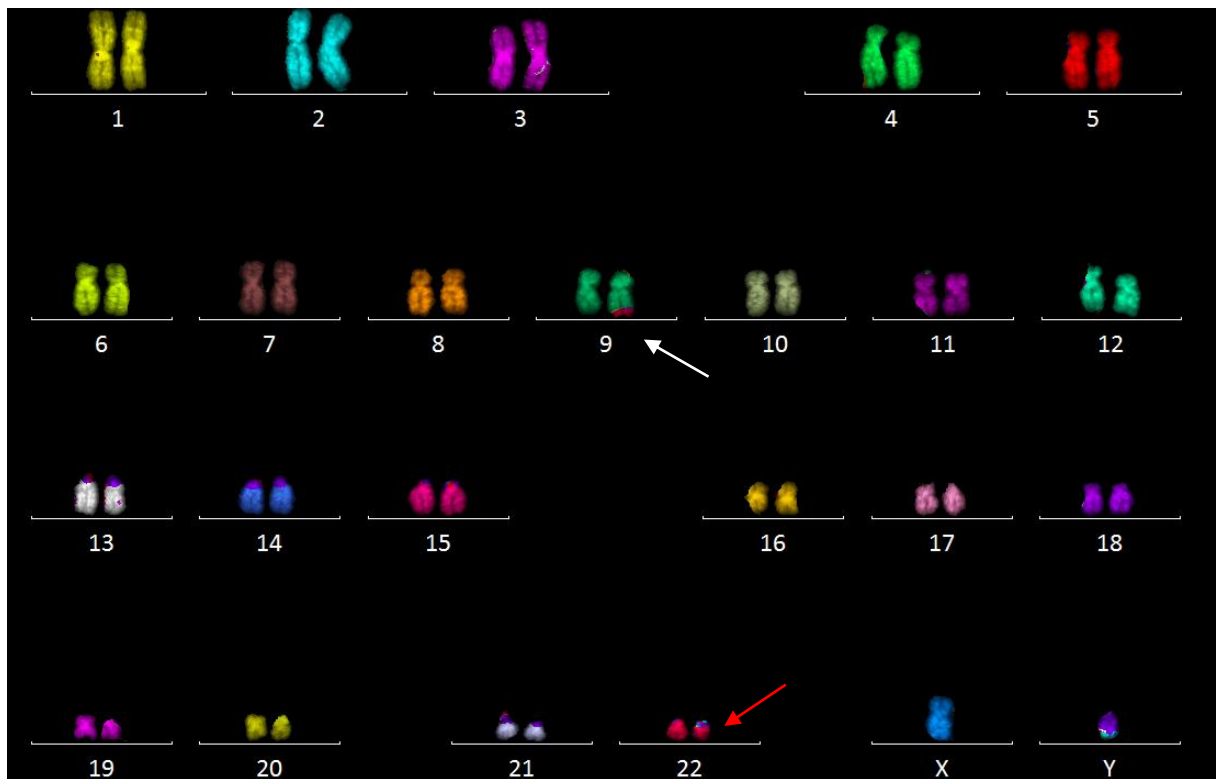


Figure 62: Caryotype multicolore du patient **P5**.

Le chromosome Philadelphie (flèche rouge) sur le dérivé 22 et le dérivé 9 (flèche blanche).

4.3.5.3. Analyse des télomères

4.3.5.3.1. Bras courts

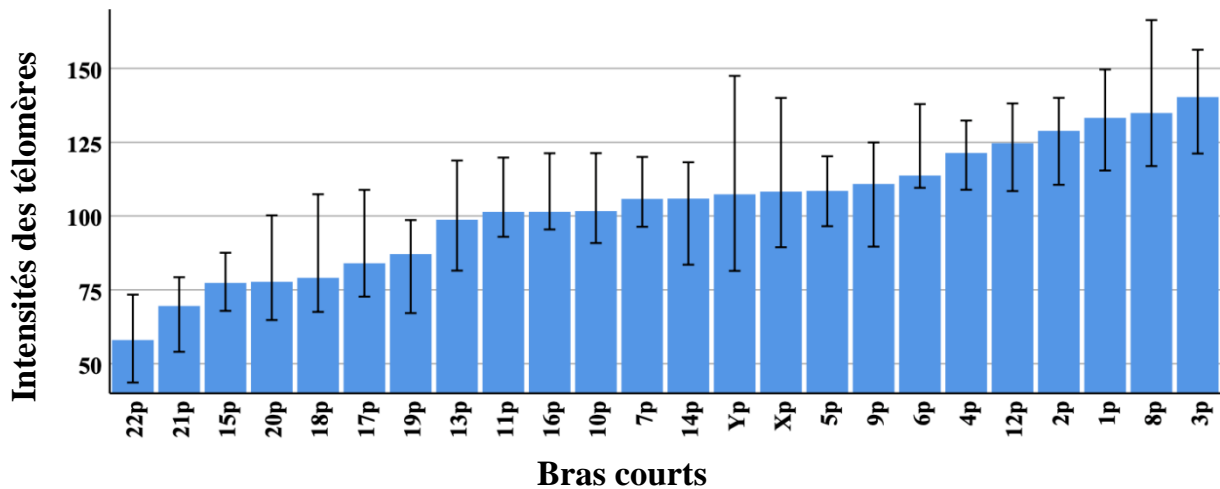


Figure 63: Représentation de la médiane des intensités télomériques des bras courts. Les bras courts 3p, 8p et 1p présentait les intensités télomériques les plus élevées alors que celles sur les bras 22p et 21p présentait celles plus faibles.

4.3.5.3.2. Bras longs

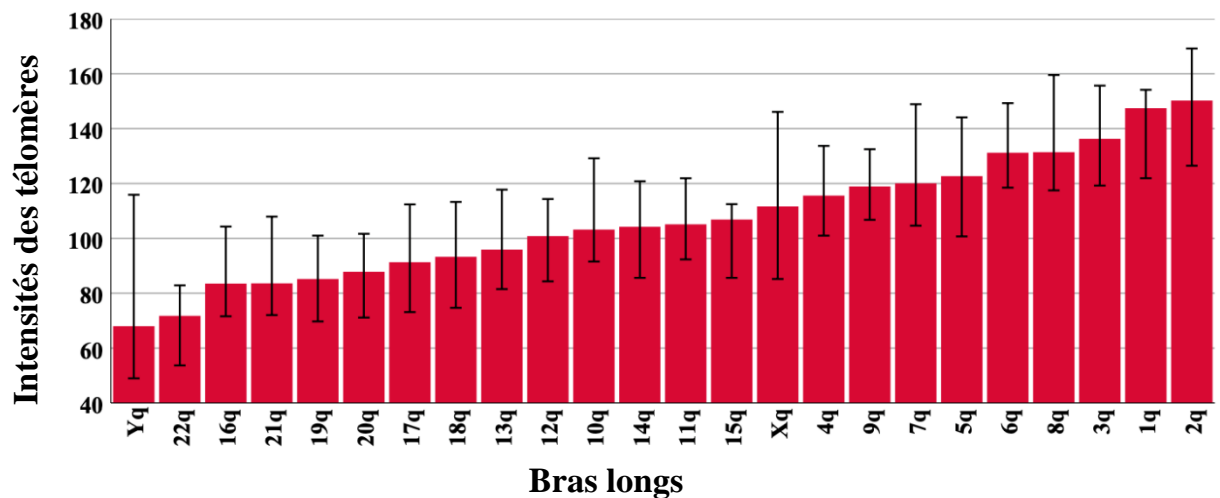


Figure 64: Représentation de la médiane des intensité télomériques des bras courts. Les bras longs 2q, 1q et 3q avaient les médianes les plus élevées et les bras longs Yq et 22q avaient les plus basses médianes.

4.3.5.3.3. Profil télomérique des dérivés 9 et 22

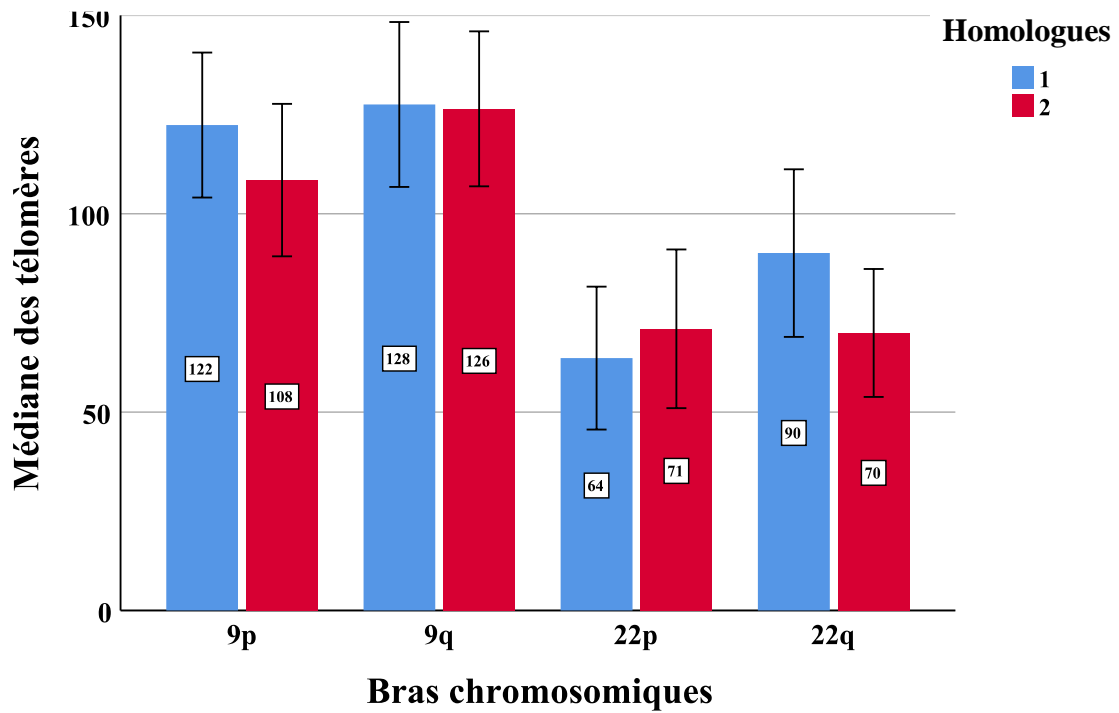


Figure 65: Intensité globale des télomères des homologues 9 et 22.

La couleur rouge représente les dérivés 9 et 22, la bleue est celui de leur homologue normal.

4.3.5.3.4. Ratio des bras courts sur les bras longs (p/q)

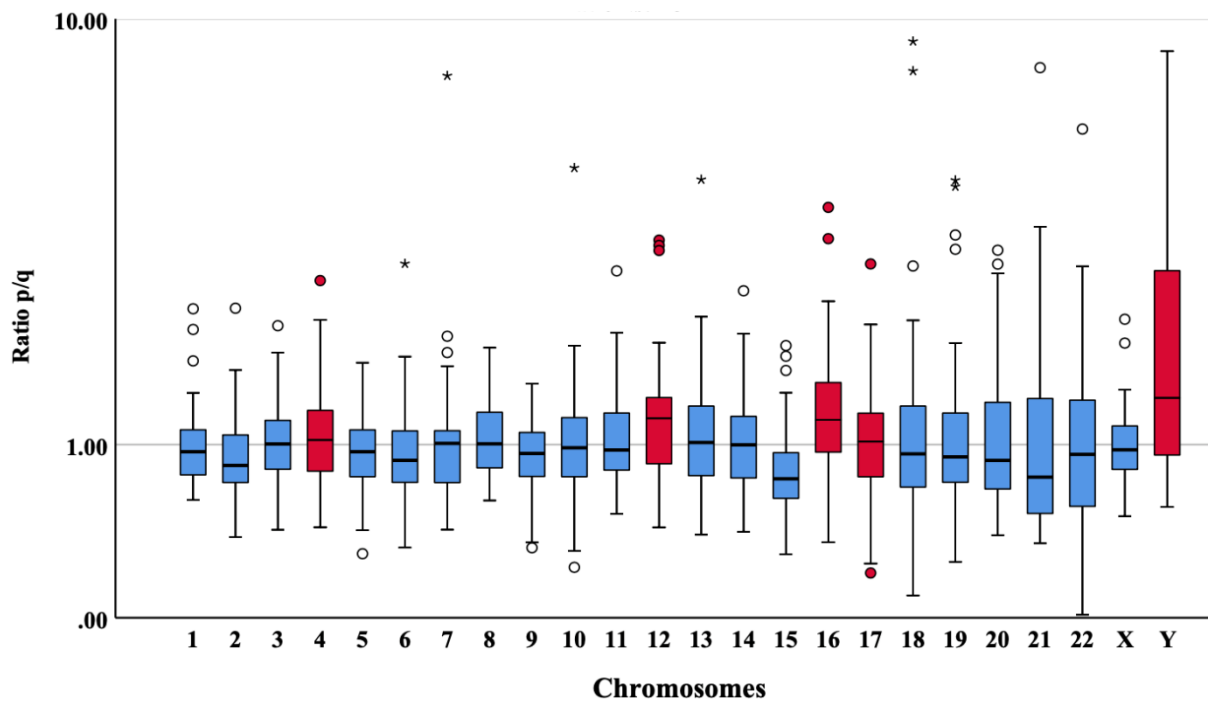


Figure 66: Représentation du ratio (p/q) des intensités télomériques.

Les médianes du ratio p/q des intensités télomériques sur les chromosomes 3, 8 et 13 étaient presque similaires, alors qu'on remarquait que les intensités sur des télomères sur les bras courts des chromosomes 4, 12, 16, 17 et Y étaient plus élevées et ceux des bras longs de ces mêmes chromosomes.

COMMENTAIRES ET DISCUSSION

5. COMMENTAIRES ET DISCUSSION

La dynamique de changement de la longueur des télomères individuels permet d'une part de comprendre l'homéostasie des télomères et le mécanisme des anomalies chromosomiques lors de l'oncogenèse, et d'autre part elle aide à la découverte de biomarqueur. C'est ainsi que nous avons initié cette étude pilote pour caractériser les anomalies chromosomiques et la longueur des télomères individuels chez les patients LMC présentant des profils de signaux atypiques *BCR::ABL1* à la FISH. À notre connaissance, cette étude est une première qui a rapporté la longueur des télomères individuels dans ces formes atypiques.

Nous avons effectué une étude retro-prospective et descriptive. Dans notre série, tous les patients ont été référés par un médecin hématologue ou oncologue pour une suspicion de LMC et avaient tous une hyperleucocytose. Parmi les 43 patients qui présentaient des signaux atypiques de *BCR::ABL1* à la FISH, nous avons inclus cinq d'entre eux. L'âge médian des patients étaient de 37 ans et trois d'entre eux étaient de sexe masculin. Malgré la taille réduite de notre échantillon, ces observations étaient semblables aux données publiées par d'autres auteurs au Mali et dans d'autres pays Africains (5,11–13).

Dans cette étude, trois (**P1**, **P2**, et **P5**) des cinq patients présentaient le même profil de signaux atypiques nucléaires (1F1R1G). Ce profil a été rapporté le plus fréquent chez les patients LMC présentant des signaux atypiques à FISH *BCR::ABL1* (18,109). Il est à noter que chez deux patientes (**P3** et **P4**) nous avons remarqué des signaux atypiques dits complexes. Les signaux atypiques complexes suggèrent la présence d'anomalies chromosomiques supplémentaires ou des variants de la translocation t(9;22) (109). A partir du profil des signaux atypiques nucléaires, nous avons déterminé leur signification cytogénétique en analysant d'abord leurs profils métaphasiques. Nous avons remarqué que les patients qui présentaient le même profil de signaux atypiques nucléaires montraient aussi le même profil chromosomique des signaux (Figure 21). Le profil de ces signaux pourrait suggérer que les trois patients présentaient les mêmes points de cassures sur les loci *ABL1* et *BCR* et pouvant impliqué leur co-délétion sur le dérivé 9. La présence de délétion de *ABL1* ou *BCR* sur le dérivé 9 a été associé à une résistance thérapeutique à l'imatinib (109). Cependant, l'analyse des métaphases des deux autres patients qui présentaient des profils de signaux atypiques complexes a fourni des informations supplémentaires. Chez le patient **P4**, nous avons noté sur le dérivé 9 une délétion du locus *ABL1* alors que le locus *BCR* y est présent et la présence d'un second chromosome Philadelphie. La patiente **P3** avait le signal de fusion sur un chromosome présentant une morphologie différente de celle du chromosome Philadelphie et lequel chromosome présentait aussi un signal

supplémentaire du locus *ABL1* (Figure 46). La présence d'un chromosome Philadelphie supplémentaire et d'un autre chromosome non identifié présentant un réarrangement complexe des loci *BCR* et *ABL1* pourrait suggérer une évolution clonale et indices de progression de la maladie (66,109). En conclusion, l'analyse des patrons de signaux atypiques de *BCR* et *ABL1* est capitale sur les métaphases, car elle fournit des informations supplémentaires pouvant impacter la prise en charge thérapeutique des patients et guider vers d'autres analyses moléculaires telle que le caryotype spectral pour mieux élucider les anomalies chromosomiques supplémentaires.

5.1. Anomalies chromosomiques

Pour décrire les anomalies chromosomiques associées, nous avons effectué le caryotype spectral des cinq patients de cette étude. Deux d'entre eux ont présenté des réarrangements chromosomiques très rares dont l'un peut être même qualifié d'unique. En effet, chez la patiente **P3** qui a présenté le signal atypique **1F2R1G** à la FISH *BCR::ABL1*, l'analyse M-FISH a donné la formule chromosomique suivante: 47,XXX,t(22;9;16). Les anomalies chromosomiques détectées étaient les suivantes : une délétion d'une partie du bras long du chromosome 9, une translocation du chromosome 22 associée à une partie du bras long du chromosome 9 et une partie du bras long du chromosome 16, et enfin une trisomie du chromosome X (Figure 67). Le mécanisme de la translocation est expliqué par la figure 63. À notre connaissance, le réarrangement génomique que nous venons de décrire est le premier cas à être rapporté selon la littérature. Bien vrai que des études ont mentionné des cas de translocations complexes impliquant le chromosome 16 en association avec les chromosomes 9 et 22 (110–112), aucune de ces translocations n'a été associée à une trisomie de X. En outre, les points de cassures rapportés dans la littérature sont différents de ceux que nous rapportons dans cette thèse. En effet, sur le dérivé du chromosome 9 où se trouvent les fragments des chromosomes 16 et 22, les dispositions des fragments étaient différents (figure 64) de ceux rapportés par la littérature (110–112).

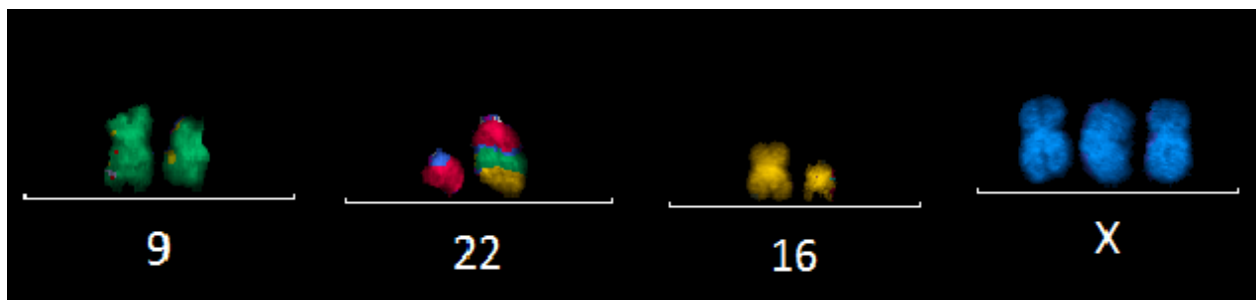


Figure 67: M-FISH montrant la translocation complexe t(9;22;16) et la trisomie X.

Nous proposons le modèle suivant pour la survenue de ce réarrangement génomique. La translocation s'est déroulée en deux étapes. La première étant la formation de la translocation $der(22)t(9;22)$ dont le point de cassure sur le dérivé 22 est plus télomérique que celui de la translocation classique. La deuxième étape est celle de la translocation entre le dérivé 22 (chromosome Philadelphie) et le chromosome 16 illustré par le schéma ci-dessus (Figure 68). Enfin, l'évolution clonale aurait conduit à l'association de la trisomie X au complexe de réarrangement $t(9;22;16)$.

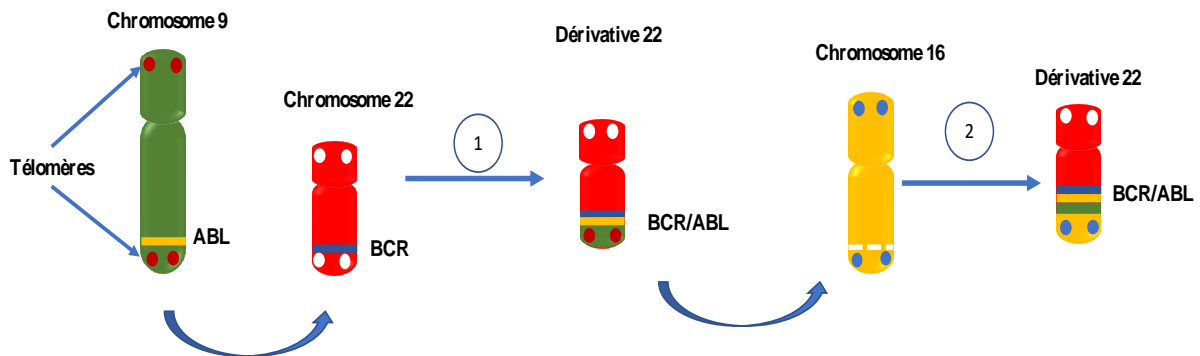


Figure 68: Mécanisme d'action de la formation du translocation $t(22;9;16)$.

1- indique la première étape correspondant à la formation de translocation classique $t(9;22)$;
2- deuxième étape à la formation du dérivé 22 issu de la translocation entre le dérivé 22 $t(9;22)$ et le bras long du chromosome 16.

La présence de variants complexes constitue un facteur de mauvais pronostic associé à un risque élevé de transformation blastique. Les cas de LMC à variant complexe sont rares. Néanmoins, quelques cas similaires ont été rapportés par Vinhas et al.;1998. (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 différents sur le gène *BCR*. Au Brésil, Otero et al.; 2011 (74) ont également observé dans leurs échantillons la présence d'un double chromosome Philadelphie chez des patients qui ne répondaient pas au traitement avec Imatinib.

La deuxième anomalie chromosomique rare de notre étude avait comme formule chromosomique $t(9;22)inv(9)(p22q34)$. Ce réarrangement est constitué d'une translocation impliquant les chromosomes 9 et 22 associées à une inversion péricentrique du dérivé du chromosome 9. Ce type de réarrangement génomique a été observé dans une étude montrant sa rareté (113). Un mécanisme de formation de ce réarrangement a été suggéré par Jinlan Pan et al 2010 (113), et ce mécanisme serait aussi réalisé en deux étapes. D'abord une translocation a lieu entre les chromosomes 9 et 22 responsables du dérivatif 22, et ensuite s'est produite sur le

dérivé du chromosome 9 une inversion péricentrique. La figure 69 montre le mécanisme d'action de la formation de ce réarrangement chromosomique.

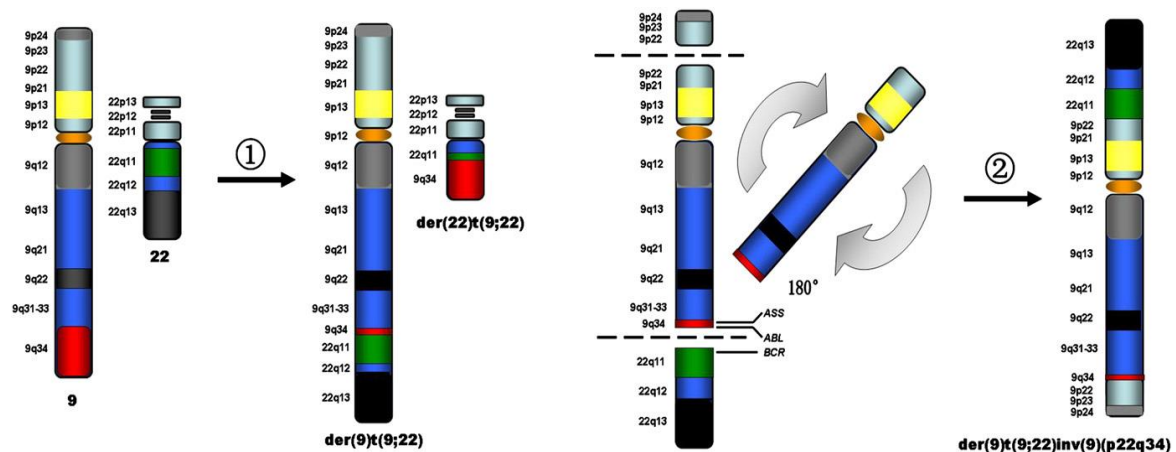


Figure 69: Schéma illustrant l'origine de der(9)t(9;22)inv(9)(p22q34) (113).

La flèche 1 indique la première étape, c'est-à-dire la formation de la translocation t(9;22).

La flèche 2 indique la deuxième étape, c'est-à-dire l'inversion inv(9)(p22q34) qui s'est produite au niveau du dérivatif der(9)t(9;22) résultant au der(9)t(9;22)inv(9)(p22q34).

Les anomalies chromosomiques complexes des dérivatifs 9 ou 22 dans la LMC ont été associées à une résistance primaire ou secondaire, et pourraient induire une résistance au traitement standard de la LMC et accélérer la transition vers les autres phases (61,66,109). Cette anomalie chromosomique dans la LMC n'a été rapportée qu'une seule fois à notre connaissance montrant sa rareté (113),

5.2. Longueurs individuelles des télomères

La mesure de la longueur des télomères individuels a un intérêt majeur d'évaluer simultanément et spécifiquement la longueur des 92 différents télomères dans une même cellule. C'est ainsi qu'elle a l'avantage sur les autres méthodes qui évaluent la longueur moyenne des télomères. Notre étude est une première, à notre connaissance, dans l'évaluation de la longueur des télomères individuels dans les formes atypiques de la LMC à la technique FISH. Étant donné que les points de cassure sont différents dans les formes atypiques, il est essentiel de comprendre le mécanisme de la dynamique de changement des télomères dans ces formes.

Chez les 5 patients, les télomères les plus longs étaient ceux sur le 1p, 1q, et 3q tandis que les plus courts étaient 21p et 22p. Nos résultats étaient superposables à ceux rapportés par Samassekou et al. 2011 (6) qui avaient aussi retrouvé que les télomères sur 21p et 22p étaient parmi les plus courts. Par contre, ces auteurs ont rapporté dans leur étude que les télomères les

plus longs étaient ceux sur le 5p, 18p et Xp. Cette différence entre les télomères dans les deux études pourrait s'expliquer par le profil génomique des patients. En effet, les patients dans l'étude de Samassekou et al. (6) présentaient un profil typique de signaux *BCR::ABL1* à la FISH alors que ceux de notre étude avaient un profil atypique.

Un fait majeur dans notre étude est la présence de télomères relativement longs chez la patiente **P3** par rapport à ceux des autres patients. Cette patiente avait aussi un réarrangement génomique complexe et unique qui résulterait d'une expansion clonale. Il a été suggéré que des télomères individuels peuvent subir une sélection clonale et s'allonger au cours de l'évolution de la LMC (104). Enfin, nous avons trouvé que le profil de la longueur des télomères des bras chromosomiques impliquées dans la translocation t(9 ;22) était différent d'un patient à un autre. En outre, chacun d'entre eux présentait au moins une particularité de longueur télomérique sur les bras chromosomiques des chromosomes 9 et 22 et des dérivés 9 et 22. Nos données montrent que le profil des télomères individuels des formes atypiques *BCR::ABL1* de la LMC présentent des caractéristiques qui seraient associées aux réarrangements chromosomiques spécifiques à ces formes. Il est essentiel d'analyser un nombre plus important d'échantillons pour confirmer cette hypothèse.

CONCLUSION

6. CONCLUSION

Cette étude qui est une première au Mali a permis la mise en place de la technique Q-FISH et M-FISH au Mali. Elle est également la première à mesurer la longueur des télomères individuels dans les formes *BCR::ABL1* atypiques de la LMC. L'aspect le plus important de cette étude est la découverte d'un réarrangement génomique qui n'a pas été rapporté dans la littérature et d'une anomalie chromosomique rare. Enfin, cette étude a permis de proposer un pipeline d'analyse des formes atypiques *BCR::ABL1* objectivées à la FISH des noyaux interphasiques. Ainsi nous pouvons conclure que la complémentarité de FISH-*BCR::ABL1* sur noyau et métaphase, la M-FISH et la Q-FISH permettent une compréhension plus approfondie des anomalies chromosomiques et des mécanismes sous-jacents à leur formation dans la LMC.

7. RECOMMANDATIONS

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

Aux autorités sanitaires et politiques

- Besoin urgent d'un service d'hématologie génétique
- Concevoir des laboratoires d'analyse cytogénétique.
- Développer la recherche de la génétique, en finançant des projets de recherche génétique et oncogénétiques.
- Renforcer la communication et la sensibilisation sur les hémopathies malignes.
- Améliorer le plateau technique des structures de recherche clinique et biomédicale.

Aux personnels soignants et à la communauté scientifique

- Explorer davantage la génomique de la LMC.
- Rendre accessible le diagnostic moléculaire des hémopathies.
- Référer toute suspicion de LCM dans un service hématologique ou oncologique.
- Intégrer systématiquement la FISH et le caryotype dans la prise en charge de la LMC.
- 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.
- Demander un avis médical approprié dès les premiers signes fonctionnels de la LMC.
- Participer aux études de recherche sur la LMC
- S'organiser en groupe de pression pour soutenir la recherche sur la LMC

REFERENCES

8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues (Revised 4th edition). 4th ed. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al., editors. IARC. Lyon; 2017. p. 30.
2. Hochaus A. Chronic Myeloid Leukemia Spotlight. *Leukemia*. 2010;
3. Sangaré M. La leucémie myéloïde chronique au Sénégal: étude multicentrique à propos de 297 cas [Thèse de Pharmacie]. [Dakar, Sénégal]: Université Cheikh Anta Diop de Dakar; 2016.
4. Camara D. Le traitement de la leucémie myéloïde chronique par l'imatinib mesylate «GLIVEC» à propos de 16 cas observés dans le service d'hématologie-oncologie médicale du CHU du Point G du 1er Janvier 2005 au 31 decembre 2008 [Thèse de Médecine]. [Bamako, Mali]: Université des Sciences, Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB); 2011.
5. SIDIBE CO. Exploration Cytogénétique de la Leucémie Myéloïde Chronique par la Technique FISH Au MALI [Thèse de Médecine]. [Bamako, Mali]: Université des Sciences Techniques et des Technologies de Bamako (USTTB); 2020.
6. Samassekou O, Ntwari A, Josée H, Yan J. Individual Telomere Lengths in Leukemia. *Neoplasia*. 2009;11(11):1146–54.
7. National Comprehensive Cancer Network. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines) Chronic Myeloid Leukemia [Internet]. Version(1.2023) . 2022 [cited 2022 Sep 22]. Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/cml.pdf
8. Vardiman J, Melo J, Baccarani M, Radich J, Kvasnicka H. Chronic myeloid leukaemia, BCR-ABL1-positive. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al, eds. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon, France: IARC Press; 2017. 30–59 p.
9. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2020 update on diagnosis, therapy and monitoring. *Am J Hematol*. 2020 Jun 1;95(6):691–709.
10. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer Statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010;60:277–300.
11. N'Dhatz Comoe E, Koffi K, Ayemou R, Nanho Danho C, Alla D, Kouakou B, et al. Prevalence et incidence des hemopathies malignes au CHU de Yopougon. *Rev int sc*

- méd. 2012;14(3):205–8.
12. Ngoudjeu D TE, Tomowiak C, Okalla C, Sume G, Cazenave M, Araujo C, et al. Profil épidémiologique des hémopathies à l'hôpital général de Douala, Cameroun, de septembre 2007 à septembre 2011. *Horizons Héματο*. 2013 Apr;Volume 03(Numéro 02).
 13. Gragnic G, Mounkaila B, Mounkaila I, Toure IA. Hémopathies malignes à Niamey : a propos de 90 observations sur 6 ans. *Med Afr noire (En ligne)*. 1996;472–5.
 14. Corso A, Lazzarino M, Morra E, Merante S, Astori C, Bernasconi P, et al. Chronic myelogenous leukemia and exposure to ionizing radiation--a retrospective study of 443 patients. *Ann Hematol*. 1995 Feb;70(2):79–82.
 15. Bizzozero OJ, Johnson KG, Ciocco A, Hoshino T, Itoga T, Toyoda S, et al. Radiation-related leukemia in Hiroshima and Nagasaki, 1946-1964. I. Distribution, incidence and appearance time. *N Engl J Med*. 1966 May 19;274(20):1095–101.
 16. Deininger MWN, Bose S, Gora-Tybor J, Yan XH, Goldman JM, Melo J V. Selective induction of leukemia-associated fusion genes by high-dose ionizing radiation. *Cancer Res*. 1998;58(3):421–5.
 17. Mysorekar, Subramanian M, Kilara N, Sundareshan TS. Variant Philadelphia translocations in chronic myeloid leukemia: A report of five cases. *J Cancer Res Ther*. 2015 Jul 1;11(3):654.
 18. Jain P, Aby A, Ahmed R, George B, Mathews V, Parihar M, et al. Fluorescence in situ hybridization patterns of BCR/ABL1 fusion in chronic myelogenous leukemia at diagnosis. *Indian J Pathol Microbiol*. 2012 Jul;55(3):347–51.
 19. Turhan AG. Leucémie myéloïde chronique : actualités biologiques et thérapeutiques. *Bull Cancer*. 2005;92:75–82.
 20. Martin R. H, Peter J. H. *Hématologie*. Campus ill. Masson, editor. 2002. P 44-45.
 21. Anonymous. Definition of BCR-ABL fusion gene - NCI Dictionary of Cancer Terms [Internet]. National Cancer Institute. 2017 [cited 2022 Aug 14]. Available from: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/bcr-abl-fusion-gene>
 22. Messaoudi N. Leucémie Myéloïde Chronique chez l'adulte [Thèse]. Université Abderrahmane Mira de Bejaia; 2016.
 23. Translocation t(9;22)(q34;q11) des leucémies myéloïdes chroniques (gène de fusion BCR-ABL) [Internet]. [cited 2022 Sep 21]. Available from: https://www.imgt.org/IMGTeducation/Tutorials/Cancer/_FR/Oncogene/translocation.html

24. Taagepera S, McDonald D, Loeb JE, Whitaker LL, Mcelroy AK, Wang JYJ, et al. Nuclear-cytoplasmic shuttling of C-ABL tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jun 6;95(13):7457.
25. Sawyers CL, McLaughlin J, Goga A, Havlik M, Witte O. The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. *Cell*. 1994 Apr 8;77(1):121–31.
26. Leguay T, Mahon F-X. Leucémie myéloïde chronique. *Lille Med J la Fac Med Pharm l'Universite Lille*. 1968 Apr;13(4):477–85.
27. Zhou T, Medeiros LJ, Hu S. Chronic Myeloid Leukemia: Beyond BCR-ABL1. *Curr Hematol Malig Reports* 2018 136. 2018 Oct 29;13(6):435–45.
28. McWhirter JR, Galasso DL, Wang JY. A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol Cell Biol*. 1993 Dec;13(12):7587–95.
29. Kantarjian HM, Giles FJ, Bhalla KN, Pinilla-Ibarz J, Larson RA, Gattermann N, et al. Nilotinib is effective in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase after imatinib resistance or intolerance: 24-month follow-up results. *Blood*. 2011 Jan 27;117(4):1141–5.
30. Issaad C, Ahmed M, Novault S, Bonnet ML, Bennardo T, Varet B, et al. Biological effects induced by variable levels of BCR-ABL protein in the pluripotent hematopoietic cell line UT-7. *Leukemia*. 2000 Apr 3;14(4):662–70.
31. Pane F, Frigeri F, Sindona M, Luciano L, Ferrara F, Cimino R, et al. Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: A distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood*. 1996 Oct 1;88(7):2410–4.
32. Deininger MWN, Goldman JM, Melo J V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Vol. 96, *Blood*. American Society of Hematology; 2000. p. 3343–56.
33. Hughes TP, Kaeda J, Branford S, Rudzki Z, Hochhaus A, Hensley ML, et al. Frequency of Major Molecular Responses to Imatinib or Interferon Alfa plus Cytarabine in Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2003 Oct 9;349(15):1423–32.
34. Raitano AB, Halpern JR, Hambuch TM, Sawyers CL. The Bcr-Abl leukemia oncogene activates Jun kinase and requires Jun for transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Dec 12;92(25):11746–50.
35. Ahmed M, Dusanter-Fourt I, Bernard M, Mayeux P, Hawley RG, Bennardo T, et al. BCR-ABL and constitutively active erythropoietin receptor (cEpoR) activate distinct mechanisms for growth factor-independence and inhibition of apoptosis in Ba/F3 cell line. *Oncogene*. 1998 Feb 3;16(4):489–96.

36. Sillaber C, Gesbert F, Frank DA, Sattler M, Griffin JD. STAT5 activation contributes to growth and viability in Bcr/Abl-transformed cells. *Blood*. 2000 Mar 15;95(6):2118–25.
37. Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine Phosphorylation of Death Agonist BAD in Response to Survival Factor Results in Binding to 14-3-3 Not BCL-XL. *Cell*. 1996 Nov 15;87(4):619–28.
38. Dubrez L, Eymin B, Sordet O, Droin N, Turhan AG, Solary E. BCR-ABL Delays Apoptosis Upstream of Procaspase-3 Activation. *Blood*. 1998 Apr 1;91(7):2415–22.
39. Amarante-Mendes GP, Kim CN, Liu L, Huang Y, Perkins CL, Green DR, et al. Bcr-Abl Exerts Its Antiapoptotic Effect Against Diverse Apoptotic Stimuli Through Blockage of Mitochondrial Release of Cytochrome C and Activation of Caspase-3. *Blood*. 1998 Mar 1;91(5):1700–5.
40. Bichet M. Stratégie thérapeutique dans la LMC : Arrêt du traitement : Mythe ou réalité [Thèse]. [France]: Université de Lorraine; 2016.
41. Dorfman LE, Maiara ;, Floriani A, Tyana ;, Oliveira MRDR, Cunegatto B, et al. The role of cytogenetics and molecular biology in the diagnosis, treatment and monitoring of patients with chronic myeloid leukemia.
42. Spiers AS. Clinical manifestations of chronic granulocytic leukemia. *Semin Oncol*. 1995 Aug;22(4):380–95.
43. Liberati AM, Donti E, Rosso C, Coco F Lo, Dore F, Pardini S, et al. Repeated PCR in CML during IFN- α therapy. *Eur J Haematol*. 1994 Mar 1;52(3):152–5.
44. Hoffmann VS, Baccarani M, Hasford J, Lindoerfer D, Burgstaller S, Sertic D, et al. The EUTOS population-based registry: incidence and clinical characteristics of 2904 CML patients in 20 European Countries. *Leukemia*. 2015 Jun 9;29(6):1336–43.
45. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick H, et al. The chronic myeloid leukaemias: guidelines for distinguishing chronic granulocytic, atypical chronic myeloid, and chronic myelomonocytic leukaemia. Proposals by the French-American-British Cooperative Leukaemia Group. *Br J Haematol*. 1994;87(4):746–54.
46. Noguera M-E, Cayuela J-M, Souni F, Copin H, Braud A-C, Leymarie V, et al. Leucémie myéloïde chronique avec monocytose exprimant des transcrits BCR-ABL du type e1 a2 : un nouveau syndrome myéloprolifératif? *Hématologie*. 1998 May 7;4(2):142–6.
47. 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. Vol. 127, *Blood*. American Society of Hematology; 2016. p. 2391–405.
48. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al.

- European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 2013 Aug 8;122(6):872–84.
49. Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leuk* 2020 344. 2020 Mar 3;34(4):966–84.
 50. Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst*. 1960;25(1):85–109.
 51. Hughes TP, Hochhaus A, Branford S, Müller MC, Kaeda JS, Foroni L, et al. Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS). *Blood*. 2010 Nov 11;116(19):3758–65.
 52. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, Branford S, Radich J, Kaeda J, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood*. 2006 Jul 1;108(1):28–37.
 53. Cross NCP. Detection of BCR-ABL in Hematological Malignancies by RT-PCR. *Methods Mol Med*. 1996 Nov 14;6:25–36.
 54. 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)*. 2016 Oct;74(5):511–5.
 55. Signes biologiques et bilans de la LMC [Internet]. [cited 2022 Aug 14]. Available from: <http://www.lmc-cml.org/fr/pag13-Signes-biologiques-et-bilans.html>
 56. 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 Fr des Lab*. 2002 Jan 1;2002(339):27–31.
 57. Dewald GW, Wyatt WA, Silver RT. Atypical BCR and ABL D-FISH Patterns in Chronic Myeloid Leukemia and their Possible Role in Therapy. <https://doi.org/103109/10428199909058475>. 2009;34(5–6):481–91.
 58. Švabek Željka Tkalčić Josipović Marina HIZRD-MS. The incidence of atypical patterns of BCR-ABL1 rearrangement and molecular-cytogenetic response to tyrosine kinase inhibitor therapy in newly diagnosed cases with chronic myeloid leukemia (CML). *br*. 2018;53(2):152–9.

59. Chauffaille M de LLF, Bandeira AC de A, Da Silva ASG. Diversity of breakpoints of variant Philadelphia chromosomes in chronic myeloid leukemia in Brazilian patients. *Hematol Transfus Cell Ther.* 2015 Jan 1;37(1):17–20.
60. Naumann S, Decker HJ. Genesis of variant Philadelphia chromosome translocations in chronic myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2003 Nov 1;147(1):18–22.
61. Gorusu M, Benn P, Li Z, Fang M. On the genesis and prognosis of variant translocations in chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007 Mar;173(2):97–106.
62. Balk B, Fabarius A, Haferlach C. Cytogenetics of Chronic Myeloid Leukemia (CML). In: *Hematologic Malignancies.* Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2021. p. 1–16.
63. O'Brien S, Thall PF, Siciliano MJ. Cytogenetics of chronic myelogenous leukaemia. *Baillieres Clin Haematol.* 1997;10(2):259–76.
64. El-Zimaity MMT, Kantarjian H, Talpaz M, O'Brien S, Giles F, Garcia-Manero G, et al. Results of imatinib mesylate therapy in chronic myelogenous leukaemia with variant Philadelphia chromosome. *Br J Haematol.* 2004 Apr;125(2):187–95.
65. Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol.* 2002;107(2):76–94.
66. Marzocchi G, Castagnetti F, Luatti S, Baldazzi C, Stacchini M, Gugliotta G, et al. Variant Philadelphia translocations: molecular-cytogenetic characterization and prognostic influence on frontline imatinib therapy, a GIMEMA Working Party on CML analysis. *Blood.* 2011 Jun 23;117(25):6793–800.
67. Loncarevic IF, Römer J, Starke H, Heller A, Bleck C, Ziegler M, et al. Heterogenic molecular basis for loss of ABL1-BCR transcription: deletions in der(9)t(9;22) and variants of standard t(9;22) in BCR-ABL1-positive chronic myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 2002;34(2):193–200.
68. Potter AM, Watmore AE, Cooke P, Lilleyman JS, Sokol RJ. Significance of non-standard Philadelphia chromosomes in chronic granulocytic leukaemia. *Br J Cancer.* 1981;44(1):51–4.
69. Reid AG, Huntly BJP, Grace C, Green AR, Nacheva EP. Survival implications of molecular heterogeneity in variant Philadelphia-positive chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2003 May;121(3):419–27.
70. Baunin V. La leucémie myéloïde chronique de l'enfant et de l'adolescent : réarrangements moléculaires BCR-ABL1 au diagnostic [These]. [Poitiers, France]: Université de Poitiers; 2013.

71. Leguay T, Mahon F-X. Leucémie myéloïde chronique. EMC - Hématologie. 2005 Sep 1;2(3):187–205.
72. Sokal J, Gomez G, Baccarani M, Tura S, Clarkson B, Cervantes F, et al. Prognostic Significance of Additional Cytogenetic Abnormalities at Diagnosis of Philadelphia Chromosome-positive Chronic Granulocytic Leukemia. *Blood*. 1988 Jul 1;72(1):294–8.
73. Hasford J, Pfirrmann 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. *J Natl Cancer Inst*. 1998 Jun 3;90(11):850–8.
74. Hasford J, Baccarani M, Hoffmann V, Guilhot J, Saussele S, Rosti G, et al. Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score. *Blood*. 2011 Jul 21;118(3):686–92.
75. Bardin C. Leucémies chroniques: Traitement de la leucémie myéloïde chronique. *Pharm Clin Prat en Oncol*. 2016;247-266.e13.
76. Tulliez M. Treatment of chronic myeloid leukemia in 2007. Vol. 37, *Revue Francophone des Laboratoires*. Elsevier Masson; 2007. p. 25–9.
77. Savage DG, Antman KH. Imatinib Mesylate — A New Oral Targeted Therapy. *N Engl J Med*. 2002 Feb 28;346(9):683–93.
78. Buxeraud J, Alexis S. Sprycel ® - dasatinib. *Actual Pharm*. 2008;47(471):46–52.
79. Fiche SPRYCEL ® professionnels de santé SPRYCEL ® dasatinib.
80. Reshef R, Huffman AP, Gao A, Luskin MR, Frey N V., Gill SI, et al. High graft CD8 cell dose predicts improved survival and enables better donor selection in allogeneic stem-cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *J Clin Oncol*. 2015 Jul 20;33(21):2392–8.
81. Bhamidipati P, Kantarjian H, ... JC-T, 2013 undefined. Management of imatinib-resistant patients with chronic myeloid leukemia. *journals.sagepub.com*. 2013;4(2):103–17.
82. Al Baghdadi T, Abonour R, Boswell HS. Novel Combination Treatments Targeting Chronic Myeloid Leukemia Stem Cells. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2012 Apr 1;12(2):94–105.
83. Chaidos A, Patterson S, Szydlo R, Chaudhry MS, Dazzi F, Kanfer E, et al. Graft invariant natural killer T-cell dose predicts risk of acute graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 2012 May 24;119(21):5030–6.
84. Vigil CE, Griffiths EA, Wang ES, Wetzler M. Interpretation of cytogenetic and molecular results in patients treated for CML. *Blood Rev*. 2011 May;25(3):139.

85. Greider CW, Blackburn EH. A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*. 1989;337(6205):331–7.
86. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, et al. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*. 1999 May 14;97(4):503–14.
87. Bernal A, Tusell L. Telomeres: Implications for cancer development. Vol. 19, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2018. p. 294.
88. Palm W, De Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres. *Annu Rev Genet*. 2008;42:301–34.
89. What are Telomeres? [Internet]. [cited 2022 Aug 14]. Available from: <https://www.news-medical.net/life-sciences/what-are-Telomeres.aspx>
90. Calado RT, Young NS. Telomere maintenance and human bone marrow failure. *Blood*. 2008 May 5;111(9):4446–55.
91. Gilson E, Laroche T, Gasser SM. Telomeres and the functional architecture of the nucleus. Vol. 3, *Trends in Cell Biology*. Elsevier Current Trends; 1993. p. 128–34.
92. Marcand S, Buck SW, Moretti P, Gilson É, Shore D. Silencing of genes at nontelomeric sites in yeast is controlled by sequestration of silencing factors at telomeres by Rap1 protein. *Genes Dev*. 1996;10(11):1297–309.
93. Samassekou O. Dynamic Length Changes of Telomeres and Their Nuclear Organization in Chronic Myeloid Leukemia. *Cancers (Basel)*. 2013 Aug 22;5(4):1086–102.
94. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts. *Cell*. 1985;43(2 PART 1):405–13.
95. Poon SSS, Martens UM, Ward RK, Lansdorp PM. Telomere length measurements using digital fluorescence microscopy. *Cytometry*. 1999;36(4):267–78.
96. Lansdorp PM, Verwoerd NP, Van De Rijke FM, Dragowska V, Little MT, Dirks RW, et al. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet*. 1996 May;5(5):685–91.
97. Samassékou O. Dynamique des changements de la longueur des télomères individuels et de leur architecture nucléaire dans les cellules néoplasiques. 2011.
98. Marcand S, Brun C, Ancelin K, Gilson É. Telomeres, normal and pathological aspects. Vol. 13, *Medecine/Sciences*. 1997. p. 1250–8.
99. Brümmendorf TH, Holyoake TL, Rufer N, Barnett MJ, Schulzer M, Eaves CJ, et al. Prognostic implications of differences in telomere length between normal and malignant cells from patients with chronic myeloid leukemia measured by flow cytometry. *Blood*. 2000 Mar;95(6):1883–90.

100. Londoño-Vallejo JA, DerSarkissian H, Cazes L, Thomas G. Differences in telomere length between homologous chromosomes in humans. *Nucleic Acids Res.* 2001 Aug 1;29(15):3164–71.
101. Samassekou O, Malina A, Hébert J, Yan J. Presence of alternative lengthening of telomeres associated circular extrachromosome telomere repeats in primary leukemia cells of chronic myeloid leukemia. *J Hematol Oncol.* 2013;6(1).
102. Montpetit AJ, Alhareeri AA, Montpetit M, Starkweather AR, Elmore LW, Filler K, et al. Telomere Length: A Review of Methods for Measurement. *Nurs Res.* 2014;63(4):289.
103. Wu K Da, Hansen ER. Shortened telomere length is demonstrated in T-cell subsets together with a pronounced increased telomerase activity in CD4 positive T cells from blood of patients with mycosis fungoides and parapsoriasis. *Exp Dermatol.* 2001;10(5):329–36.
104. Doumbia O. Etude de l'architecture nucléaire des télomères dans les cellules circulantes urinaires du cancer de la vessie Au Mali. A Propos de 10 Cas [Thèse]. [Bamako, Mali]: Université des Sciences, des Techniques et des Technologie de Bamako (USTTB); 2021.
105. Dewald G, Stallard R, Al Saadi A, Arnold S, Bader PI, Blough R, et al. A multicenter investigation with interphase fluorescence in situ hybridization using X- and Y-chromosome probes. *Am J Med Genet.* 1998 Apr;76(4):318–26.
106. Perner S, Brüderlein S, Hasel C, Waibel I, Holdenried A, Ciloglu N, et al. Quantifying Telomere Lengths of Human Individual Chromosome Arms by Centromere-Calibrated Fluorescence in Situ Hybridization and Digital Imaging. *Am J Pathol.* 2003 Nov 1;163(5):1751–6.
107. Oumar Samassekou, Huiyu Li, Josée Hébert, Aimé Ntwari, Haixia Wang, Catherine Grenier Cliché, et al. Chromosome Arm – Specific Long Telomeres : A New Clonal Event in Primary Chronic Myelogenous. *Neoplasia.* 2011;13(6):550–60, IN15–7.
108. McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M. ISCN : an international system for human cytogenomic nomenclature (2016). 2016;139.
109. Zhang Z, Chen Z, Jiang M, Liu S, Guo Y, Wan L, et al. Heterogeneous BCR-ABL1 signal patterns identified by fluorescence in situ hybridization are associated with leukemic clonal evolution and poorer prognosis in BCR-ABL1 positive leukemia. *BMC Cancer.* 2019 Oct 8;19(1).
110. Espinoza JPM, Cárdenas VJP, Jiménez EAV, Angulo MG, Flores MAE, García JRG. A complex translocation (9;22;16)(q34;q11.2;p13) in chronic myelocytic leukemia. *Cancer*

- Genet Cytogenet. 2005;157(2):175–7.
111. Manabe M, Yoshii Y, Mukai S, Sakamoto E, Kanashima H, Inoue T, et al. A Rare t(9;22;16)(q34;q11;q24) Translocation in Chronic Myeloid Leukemia for Which Imatinib Mesylate Was Effective: A Case Report. *Leuk Res Treatment*. 2011 Jul 5;2011:1–3.
 112. Shu Y, Yang W, Zhang X, Xu X. Recurrent chronic myeloid leukemia with t (9;22;16) (q34; q11; p13) treated by nilotinib: A case report. *Medicine (Baltimore)*. 2018 Oct 1;97(42).
 113. Pan J, Xue Y, Qiu H, Chen S, Zhang J, Wu Y, et al. A pericentric inv(9)(p22q34) of the der(9)t(9;22)(q34;q11.2) is a recurrent secondary anomaly in Ph-positive leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010 Dec;203(2):333–40.

9. ANNEXES

9.1.ANNEXE 1

Protocole standard de mise en culture cellulaire de cellules sanguines cancéreuses

1. 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 cancéreuses et s'adresse aux personnes ayant eu un minimum de requis en Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL) pour travailler dans le laboratoire.

2. 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.

3. 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.

4. 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 flasque

T15 : tube de 15 millilitres

T50 : tube de 50 millilitres

VIDE : éthanol dilué à 10%

ml : millilitre

µl : microlitres

5. Exigences relatives aux échantillons :

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

6. Réactifs et produits chimiques :

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

7. 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.

8. 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 préétablie.

Étape 3 : mettre le Marrow Max dans l'étuve à 37°C pendant 1 heure puis passer à l'étape 4 avant le délai.

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

Étape 4 : mettre seulement les matériels nécessaires dans la hotte, à savoir ; le nombre de pipettes pasteurs qu'il faut, le paquet d'embouts de 1000ml, la pipette de 1000ml, le vide, les flasques identifiés;

NB : Pour chaque échantillon une pipette pasteur.

Étape 5 : après le délai d'une heure écoulée, enlever le Marrow Max dans l'étuve et le mettre dans la hotte.

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

Étape 7 : homogénéiser doucement le mélange dans le flasque de façon horizontale, puis desserrer un peu la fermeture du flasque et mettez-le dans l'étuve pour 24 heures, et passez chaque 6 heures pour l'homogénéiser après la mise en culture.

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

9.2. ANNEXE 2

Protocole standard de récolte cellulaire de cellules sanguines cancéreuses

1. 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.

2. Principe :

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

3. Responsabilité :

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

4. Définitions et abréviations :

Bromure : Bromure d'éthidium

Colcemid : colchicine

Fixateur : mélange de méthanol (3/4) et d'acide acétique glacial (1/4).

KCl : chlorure de potassium dilué à 0,56%

Flasque : flacon multi flasque

T15 : tube de 15 millilitres

T50 : tube de 50 millilitres

VIDE : éthanol dilué à 10%

ml : millilitre

µl : microlitre

min : minute

5. Exigences relatives aux échantillons :

Une mise en culture cellulaire respectant un délai de 24 heures dans une étuve à 37°C et à 5% de CO₂.

6. 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.

7. Procédure :

Arrêt de la division cellulaire :

Étape 1 : Mettre 50µl 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 min.

Étape 2 : après ce délai, mettez 50µl 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 min.

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 en raison de 25,000 tours/min pendant 10 min.

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 d'une 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.

Choc Hypotonique :

Étape 5 : mettez 10 ml de KCl à 37°C sur l'échantillon, puis mettez-le dans l'étuve pendant 25 à 30 minutes.

Préfixation :

Étape 6 : après ce délai de 25 à 30 min passé, préparez le fixateur et mettez 1ml de fixateur sur l'échantillon, puis centrifugez en raison de 25,000 tours/min pendant 10 min.

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

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

Fixations

Étape 8 : ajoutez 10 ml 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 5 ml de fixateur dans tous les tubes, puis complétez à 10 ml de façon à équilibrer le niveau de tous les tubes et par ordre de prise.

Répétez l'étape 8 jusqu'à ce que l'échantillon devienne clair et le fixateur limpide généralement après 3 fixations.

9.3. ANNEXE 3

Titre : Protocole technique de l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) pour la détection du gène de fusion *BCR::ABL1*

Solution :

DAPI/Vectachield (150ng/ml)

Température de stockage = 2-8°C

Éthanol 80%

Ajouter 10 ml d'eau distillée sur 40 ml d'éthanol 100%

Température de stockage = -20°C

Éthanol 90%

Ajouter 5 ml d'eau distillée sur 45 ml d'éthanol 100%

Température de stockage = -20°C

Éthanol 100%

Mettre 50 ml d'éthanol 100% dans le Coplin jar

Température de stockage = -20°C

Sonde BCR/ABL

Température de stockage = -20°C

Solution de pepsine

Température de stockage = 2-8°C

Solution saline tamponnée au tris (TBS)

Température de stockage = 2-8°C

Solution de rinçage (Rinse Solution)

Température de stockage = 15-30°C

Solution de lavage (Wash solution)

Température de stockage = 15-30°C

Equipment

Lamelle

Thermobrite

Coplin jar

Bain marie

Procédure :

Prétraitement

Étape 1 : Mettre 35-40 ml de TBS dans le Coplin jar.

Étape 2 : Mettre 5µl de pepsine sur 10 ml d'eau distillée dans un autre Coplin jar.

Étape 3 : Préparer une série d'éthanol dilué à 80%, 90% et 100% dans trois Coplin jar différents pour un volume total de 45 ml et les fermer.

Étape 4 : Mettre les lames dans le TBS pendant 10 min.

Étape 5 : Mettre les lames dans la solution de pepsine pendant 10 min.

Étape 6 : Mettre les lames dans la solution de TBS pendant 5 min

Étape 7 : Mettre les lames dans une autre solution de TBS pendant 5 min

Étape 8 : Mettre les lames dans l'éthanol dilué à 80% pendant 2 min

Étape 9 : Mettre les lames dans l'éthanol dilué à 90% pendant 2 min

Étape 10 : Mettre les lames dans l'éthanol dilué à 100% pendant 2 min

Étape 11 : Placer les lames à la température pièce pour qu'elles sèchent pendant 10-15 min

Dénaturation et hybridation

Étape 12 : Mettre 8µl de la sonde sur la lame et poser une lamelle là-dessus dans une pièce sombre ou demi éclairée

NB : la manipulation de la sonde se fait dans une pièce sombre et les lames contenant la sonde ne doivent pas être exposées à la lumière.

Étape 13 : Programmer le thermobrite à 75°C pour la dénaturation et 37°C pour l'hybridation pendant 24 à 48h et placez les lames dans le thermobrite pour l'hybridation.

Lavage

Étape 14 : Mettre 1ml de solution de lavage sur 50ml d'eau distillée dans un Coplin jar

Étape 15 : Mettre 1ml de la solution rinçage sur 50ml d'eau distillé dans un autre Coplin jar

Étape 16 : Placer les deux Coplin jar dans le bain marie chauffer à 72°C pendant 20 min

Étape 17 : Décoller doucement la lamelle sur la lame avec la main mouillée à l'eau.

Étape 18 : Mettre les lames dans la solution de lavage pendant 3 min

NB : secouer le tube à chaque min

Rinçage

Étape 19 : Mettre les lames dans la solution de rinçage avant qu'elle ne sèche pendant 3 min

NB : secouer le tube à chaque minute

Étape 20 : Mettre les lames dans l'éthanol dilué à 80% pendant 2 min

Étape 21 : Mettre les lames dans l'éthanol dilué à 90% pendant 2 min

Étape 22 : Mettre les lames dans l'éthanol dilué à 100% pendant 2 min

Étape 23 : Placer les lames dans la température de la pièce pendant 5-10 min pour sécher

Contre coloration

Étape 24 : Mettre 20µl de DAPI/Vectachield sur la zone d'étalement de la lame et couvrir avec une lamelle 22cm x 22cm dans une pièce sombre.

NB : La manipulation du DAPI/Vectachield se fait dans l'obscurité et les lames contenant le DAPI ne doivent pas être exposées à la lumière.

Observation microscopique

Étape 25 : Pour que le contre colorant agisse bien, laisser la lame emballée dans un papier aluminium à une température de -20°C pendant au moins 30min avant l'observation avec un microscope à fluorescence.

9.4. ANNEXE 4

Protocole technique Q-FISH

Solutions :

TBS 1X

Vider le contenu d'un sachet dans 1 L d'eau distillée, pour chaque expérience 232 ml est requis

TBS 10 X

Vider le contenu d'un sachet dans 100 ml d'eau distillée, pour chaque expérience, 4 ml est requis

40ml de formaldéhyde à 3,7%

4 ml formaldéhyde 37%

4 ml TBS 10X

32 ml TBS 1X

10 ml de solution de pepsine

5 µl de la solution mère de pepsine

10 ml diH₂O (eau distillée)

50 ml de solution lavage à 1X (à dupliquer)

1 ml wash solution 50x (Agilent Dako, Canada)

49 ml diH₂O

50 ml de solution de rinçage à 1X

1 ml rinse solution 50X (Agilent Dako, Canada)

49 ml diH₂O

50 ml d'une série d'éthanol 70%, 85% et 100%

35 ml éthanol pour 15 ml diH₂O

42.5 ml éthanol pour 7.5 ml diH₂O

50 ml éthanol

8 µl de sonde PNA (Agilent Dako, Canada) mixée avec la sonde centromérique
20 µl du contre colorant
DAPI mélangé avec le Vectachield (Agilent Dako Canada)

Procédure :

Prétraitement :

Étape 1 : Immerger la lame dans le TBS1 (1X) pendant 2 min.

Étape 2 : Immerger la lame dans 3,7% de formaldéhyde pendant exactement 2 min.

Étape 3 : Laver la lame successivement dans le TBS1 (1X) et TBS2 (1X) chacun 5 min.

Étape 4 : Couvrir la zone d'étalement de la lame par la solution de pepsine pendant 10 min.

Étape 5 : Laver la lame successivement dans le TBS3 (1X) et TBS4 (1X) chacun 5 min.

Étape 6 : Immerger ensuite la lame dans la série d'éthanol 70%, 85% et 100% chacun pendant 2 min.

Étape 7 : Déposer la lame verticalement à la température ambiante jusqu'à dessèchement pendant 5 min.

Dénaturation et hybridation

Étape 8 : Chauffer la lame à 85°C pendant 10 min.

Étape 9 : Chauffer la sonde PNA à 85°C pendant 5 min.

Étape 10 : Ajouter 8 µl de la sonde télomérique PNA sur la zone d'étalement.

Étape 11 : Couvrir la zone avec une lamelle de 22 x 22 mm.

Étape 12 : Placer la lame dans un incubateur (ThermoBrite) préchauffé et ajusté à 85°C pendant 5 minutes.

Étape 13 : Placer ensuite la lame dans le noir à température ambiante pendant 30 min.

Rinçage

Étape 14 : Immerger la lame dans la solution de rinçage pour enlever la lamelle.

Lavage

Étape 15 : Laver la lame dans une première solution de lavage à 55~60°C pendant 10 min.

Étape 16 : Laver par la suite la lame dans une seconde solution de lavage à température ambiante pendant 5 min.

Étape 17 : Immerge ensuite la lame dans la même série précédente d'éthanol 70%, 85% et 100% chacun pendant 2 min.

Étape 18 : Placer verticalement la lame dans le noir pour qu'elle dessèche pendant 5 min.

Contre coloration :

Étape 19 : Appliquer 20 µl de solution de contre colorant sur la lame et mettre là-dessus une lamelle de 24 x 50 mm.

Observation :

Étape 20 : Pour que le contre colorant agisse bien, laisser la lame emballée dans un papier aluminium dans le noir à température ambiante de 48 à 72 heures avant l'observation avec un microscope à fluorescence.

9.5. ANNEXE 5

Protocole technique M-FISH

Solutions

TBS 0.05 X à pH 7,0 à 7,5

1:19 d'eau distillée et TBS 1X puis titré pour ajuster le pH, pour chaque expérience 100 ml est nécessaire

TBS 1X à pH 7,0 à 7,5

Contenu d'un sachet dans 1 L d'eau distillée puis titré pour ajuster le pH, pour chaque expérience 100 ml est requis

NaOH 0,07 mol/l

700 µl de NaOH à 5 N (Normalité)

50 ml d'eau distillée

50 ml de solution lavage à 1X (à dupliquer)

1 ml wash solution 50x (Agilent Dako, Canada)

49 ml diH₂O

50 ml de solution de rinçage à 1X

1 ml rinse solution 50X (Agilent Dako, Canada)

49 ml diH₂O

50 ml d'une série d'éthanol 100%, 95% et 70%

50 ml éthanol

47,5 ml éthanol pour 2,5 ml diH₂O

35 ml éthanol pour 15 ml diH₂O

7,5 µl de sonde 24XCyte MetaSystem

20 µl du contre colorant

DAPI mélangé avec le Vectachield (Agilent Dako Canada)

Prétraitement

Étape 1 : Mettre un Coplin jar contenant 0,05 X TBS et 1 X TBS dans un réfrigérateur à 4°C.

Étape 2 : Préchauffer un Coplin jar contenant 1 X TBS à 70°C (+/- 1 °C) dans un bain marie.

Étape 3 : Mettre la lame dans le TBS 1 X à 70° (+/- 1°C) et laisser dans le bain marie pour 30 min.

Étape 4 : Enlever le Coplin jar du bain marie et laisser refroidir pendant 20 min.

Étape 5 : Transférer la lame dans le 0,05 X TBS à la température ambiante pendant 1 min.

Étape 6 : Dénaturer les métaphases dans 0,07 N de NaOH à la température ambiante pour 1 min.

Étape 7 : Mettre la lame dans le 0,05 X TBS de 4°C pour 1 min.

Étape 8 : Puis dans le 1 X TBS de 4°C pour 1 min.

Étape 9 : Transférer dans une série d'éthanol 70%, 95% puis 100% pendant 1 min chacun.

Étape 10 : Laisser la lame séchée à l'air.

Dénaturation de sonde et hybridation

Note : commencer cette étape à la 26^{ème} minute de l'étape de prétraitement.

Étape 11 : Préparer 7,5 µl de la sonde dans un tube à PCR de 0,2 ml.

Étape 12 : Dénaturer la sonde avec une machine à PCR en utilisant le programme suivant : 75°C pour 5 minutes, 10°C pour 1 minute, 37°C pour 30 minutes, Hot Lip 90°C.

Au cas où il n'y a pas de machine à PCR dénaturer la sonde en incubant le tube à 75°C (+/- 1°C) pendant 5 minutes, puis mettre sur la glace brièvement, enfin incuber à 37°C (+/- 1°C) pendant 30 minutes.

Étape 13 : Centrifuger brièvement pour collecter les gouttelettes restées sur la paroi du tube.

Étape 14 : Ajouter 7µl de la sonde dénaturée sur la zone marquée de la lame.

Étape 15 : Couvrir la zone par une lamelle de 18 x 18 mm.

Étape 16 : Sceller les pourtours de la lamelle par une colle.

Étape 17 : Incuber dans une enceinte humide à 37°C (+/- 1°C) pendant 48 heures.

Lavage

Étape 18 : Soigneusement enlever la colle et la lamelle.

Étape 19 : Placer la lame dans la solution de rinçage rinse 1 X préchauffer à 72° C (+/- 1°C) pour 2 minutes.

Étape 20 : Ensuite transférer dans la solution de lavage wash 1 X à la température ambiante pendant 30s.

Contre coloration

Étape 21 : Laver brièvement dans l'eau distillée pour éviter la formation de cristaux et laissé sécher à l'air.

Étape 22 : Appliquer 20 μ l de DAPI sur la zone marquée et couvrir avec une lamelle de 24 x 60 mm.

Étape 23 : Procéder à l'observation microscopique ou garder la lame à une température de - 20°C.

9.6. ANNEXE 6

CONSENTEMENT



U.S.T.T-B



Consentement libre et éclairé de participation à une étude de recherche

IDENTIFICATION

Nom de l'étude: Étude des anomalies chromosomiques et des télomères individuels dans les formes atypiques de la leucémie myéloïde chronique

Étudiant-chercheur responsable de l'étude: Modibo K GOITA

Téléphone: 71847315/

Nom du participant: _____

Age : _____ Sexe: _____ Contacts: _____/_____

INTRODUCTION

Vous êtes invités à prendre part à la présente étude de recherche entrant dans le cadre d'une thèse de Doctorat en pharmacie de la faculté de pharmacie (FAPH) de l'Université des Sciences des Techniques et des Technologies de Bamako, Mali (USTTB).

Nous tenons à ce que vous ayez connaissance des points suivants:

- La participation à cette étude de recherche est entièrement volontaire;
- Vous pouvez choisir de ne pas y participer ou vous pouvez vous retirer de l'étude à tout moment; dans ce cas, les renseignements vous concernant seront détruits;
- Vous demeurez libre de ne pas répondre à une question que vous estimez embarrassante;
- Il se peut que votre participation ne vous procure aucun avantage financier.
- La recherche peut nous apporter des connaissances nous permettant de vous aider et d'aider d'autres personnes dans l'avenir.

BUT GÉNÉRAL DU PROJET:

Le but de cette présente étude est **d'étudier les anomalies chromosomiques et des télomères individuels dans les formes atypiques de la leucémie myéloïde chronique**. Cette étude est réalisée dans le cadre d'une thèse de Doctorat en pharmacie sous la direction du professeur **Mahamadou Traoré** et du **Docteur Oumar Samassékou** des facultés de médecine d'odontostomatologie et de la Pharmacie de l'USTTB.

PROCÉDURE(S) OU TÂCHES DEMANDÉES AU PARTICIPANT :

Un questionnaire vous sera soumis sur votre maladie et sur vos antécédents personnels et familiaux entre autres. Un prélèvement de 4ml de votre sang périphérique fera l'objet d'examens biologiques au laboratoire de neuroscience de la FMOS.

Des tests génétiques seront réalisés sur les cellules provenant de votre sang :

- Caryotypes
- L'Hybridation *in situ* par fluorescence FISH
- Quantitative-FISH
- Multiplex-FISH
- Mesure de la longueur des télomères

RISQUES ET AVANTAGES :

-Lors du remplissage du questionnaire vous pouvez vous sentir mal à l'aise en raison de la difficulté de partager des renseignements personnels sur vos antécédents.

-Lors de la prise du sang périphérique il se peut que vous sentiez un léger inconfort au moment de la pénétration de l'aiguille.

-Votre participation à cette étude peut ne pas vous procurer d'avantage direct, mais peut nous permettre d'acquérir des informations susceptibles de nous aider à avoir plus de connaissances sur les mécanismes de survenue de votre maladie.

ANONYMAT ET CONFIDENTIALITÉ

Une grande confidentialité sera appliquée sur toutes les informations vous concernant. Les résultats des examens effectués seront sous clé et de manière sécurisée sous la responsabilité du directeur de thèse, **Professeur Oumar SAMASSEKOU**.

Il est entendu que les renseignements recueillis lors de l'entrevue sont confidentiels et que seuls, le responsable du projet et ses directeurs de recherche le Professeur Mahamadou Traoré et le Professeur Oumar Samassekou auront accès aux données de l'étude.

COMPENSATION FINANCIÈRE

Votre participation à cette étude est offerte gratuitement. Un résumé des résultats de recherche vous sera transmis au moment opportun. Ce travail est effectué dans le cadre d'une thèse de doctorat en pharmacie.

DES QUESTIONS SUR LE PROJET OU SUR VOS DROITS

Vous pouvez contacter l'étudiant-chercheur responsable de l'étude au numéro **71847315** ou par E-mail modibokgoita@gmail.com pour des questions additionnelles sur l'étude. Vous pouvez également discuter avec le Professeur Mahamadou Traoré (66723208 ou par E-mail seybatraore@yahoo.fr) et le directeur de la thèse Professeur Oumar Samassékou (94229167 ou par E-mail oumar.samassekou@usherbrooke.ca) sur les conditions dans lesquelles se déroule votre participation et de vos droits en tant que participant de recherche.

Je reconnais avoir lu le présent formulaire de consentement libre et éclairé et consens volontairement à participer à ce projet de recherche. Je reconnais aussi que le responsable du projet a répondu à mes questions de manière satisfaisante et que j'ai disposé suffisamment de temps pour réfléchir à ma décision de participer. Je comprends que ma participation à cette recherche est totalement volontaire et que je peux y mettre fin en tout temps, sans pénalité d'aucune forme ni justification à donner. Il me suffit d'en informer le responsable du projet.

Signature du participant : _____ Date _____

Signature du Témoin : _____ Date _____

Je déclare avoir expliqué le but, la nature, les avantages, les risques de l'étude et avoir répondu au meilleur de ma connaissance aux questions posées.

Signature de l'étudiant-chercheur responsable de l'étude: _____ Date _____

FICHE SIGNALITIQUE

Nom : GOITA

Prénom : Modibo K.

E-mail : modibokgoita@gmail.com

Tel : (00223) 71 84 73 15

Titre de la thèse : Étude des anomalies chromosomiques et des télomères individuels dans les formes atypiques de la leucémie myéloïde chronique.

Année Universitaire : 2021-2022

Ville de soutenance : Bamako-Mali ; **Pays d'origine :** Mali

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la Faculté de Médecine et d'Odonto-stomatologie (FMOS), Faculté de la Pharmacie (FAPH)

Secteur d'intérêt : Cytogénétique, Hématologie, Oncologie, Oncogénétique, Biologie moléculaire, Génétique, Recherche scientifique

RÉSUMÉ :

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est caractérisée par la présence du chromosome Philadelphie soit la translocation $t(9;22)(q34.1;q11.2)$, issue de la fusion *BCR::ABL1* qui encode une protéine tyrosine kinase qui est constitutivement activée. La technique d'hybridation in situ par Fluorescence (FISH) permet d'identifier dans environ 10 à 15 % des cas de la LMC des variants de la translocation $t(9;22)(q34.1;q11.2)$ ou des fusions atypiques *BCR::ABL1*. Ces variants et fusions atypiques peuvent être associés à des anomalies chromosomiques supplémentaires et un mauvais pronostic des patients. En outre, le raccourcissement des télomères individuels pourrait aussi être un facteur de mauvais pronostic chez ces patients.

C'est ainsi que nous avons appliqué les techniques Multicouleur-FISH et Quantitative-FISH pour identifier les anomalies chromosomiques supplémentaires et déterminer la longueur des télomères individuels chez 5 patients diagnostiqués positifs au gène de fusion *BCR::ABL1* et présentant des signaux atypiques. Les résultats de cette étude nous ont permis d'identifier deux anomalies chromosomiques supplémentaires, une très rare et une unique, associées aux formes atypiques de la LMC. Le profil de la longueur des télomères individuels des dérivés des chromosomes 9 était significativement élevé ($p < 0,0001$) que celui des dérivés des chromosomes 22 (chromosome Philadelphie). Nous pouvons dire que les techniques Q-FISH et M-FISH sont des avancées technologiques significatives dans l'investigation des formes atypiques et la découverte d'anomalies chromosomiques supplémentaires dans la LMC.

Mots clés : Mali, LMC, Cancer, Q-FISH, M-FISH

Abstract:

Chronic myeloid leukemia (CML) is characterized by the presence of the Philadelphia chromosome translocation t(9;22)(q34.1;q11.2), resulting from the BCR::ABL1 fusion which encodes a protein tyrosine kinase that is constitutively activated. Fluorescence in situ hybridization (FISH) identifies variants of the t(9;22)(q34.1;q11.2) translocation or atypical BCR::ABL1 fusions in approximately 10-15% of CML cases. These variants and atypical fusions may be associated with additional chromosomal abnormalities and poor patient prognosis. In addition, shortening of individual telomeres could also be a bad prognostic factor in these patients.

Therefore, we applied Multicolor-FISH and Quantitative-FISH techniques to identify additional chromosomal abnormalities and determine individual telomere length in 5 patients diagnosed as BCR::ABL1 fusion gene positive and showing atypical signals. The results of this study lead to the identification of two additional chromosomal abnormalities, one very rare and another one unique, associated with atypical forms of CML. The individual telomere length profile of chromosome 9 derivatives was significantly higher ($p < 0.0001$) than that of chromosome 22 derivatives (Philadelphia chromosome). We can say that the Q-FISH and M-FISH techniques are significant technological advances in the investigation of atypical forms and the discovery of additional chromosomal abnormalities in CML.

Keywords: Mali, CML, cancer, Q-FISH, M-FISH

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des Pharmaciens, et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement,

D'exercer dans l'intérêt de la Santé Publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement,

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine,

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels,

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

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

Je le jure !