

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



UNIVERSITÉ DJILLALI LIABES DE SIDI BEL ABBES
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE

MEMOIRE

DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV **Filière :** Sciences Biologiques

Spécialité : Biologie Et Pathologie Cellulaire

Présenté par :

Melle KOURTICHE Hayet

&

Mr ZELLAL Omar

Thème :

Intérêt de la PCR dans le diagnostic et le suivi des patients atteints de leucémie myéloïde chronique

Soutenu Devant l'honorable jury composé de :

Président de jury : Mme SENOUCI Amel

MCB

UDL SBA

Examinatrice : Mme ZEMRI Khalida

MCA

UDL SBA

Promotrice : Mme MOULESHOUL.S

Professeur

UDL SBA

Co-promotrice : Mme LIAMANI Ouafia

Docteur

UDL SBA

Année universitaire : 2020-2021

Dédicaces

Avec un énorme plaisir, je dédie ce travail à :

Mes très chers parents qui m'ont entourés d'amour de tendresse et d'espoir tout au long de cette vie, pour leur soutien durant mes longues études, leur suivi et pour leur patience dans ma vie quotidienne

A mes chers frères « Mohamed » « Ali » « Sofiane », chère sœur « Nabila » que dieu vous protège et vous accorde un brillant avenir avec une vie pleine de joie, de bonheur et prospérité que vous méritiez.

A mes chers neveux « Mohamed Rayane » « Anes Siradj Eddine » et ma chère nièce « Ritedj »

A toutes les personnes connues ou inconnues qui feuilleront, un jour ce modeste travail.

Hayet



Remerciements

Nous remercions avant tout dieu le tout-puissant de nous avoir donné la volonté et la patience, la santé et la motivation d'entamer et de terminer notre mémoire de fin d'étude.

Un grand merci à toutes nos familles pour leur présence, leurs encouragements et leur suivi avec patience du déroulement de notre projet.

Nous tenons tous d'abord à remercier chaleureusement notre encadreur Dr LIAMANI d'avoir accepté d'être notre encadreur de mémoire ; pour avoir suivi et dirigé ce travail, pour son aide, ses conseils et sa gentillesse.

Nous remercions notre chef d'option Mme « mouleshoul » pour son suivi, Nous tenons à remercier Dr SI ALI, maîtres assistants en hématologie, de nous avoir bénéficié de leurs savoirs.

Tout notre respect et nos remerciements vont vers les membres du jury qui vont nous consacrer leurs temps et leur attention afin d'évaluer notre travail.

Enfin nous remercions, de tout cœur, tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Sommaire

Dedicaces	
Remerciements	
Sommaire	
Liste des abreviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Resumés	
Introduction.....	2
Prtie bibliographique	
Chapitre I : Rappel Sur La Leucémie Myéloïde Chronique.....	7
I- Définitions	7
I-1-Les cancers hématologiques	7
I-2-Leucémie	8
I-2-1-Epédimiologie des leucémies.....	8
I-2-2- Les différents types de leucémie	9
II-La leucémie myéloïde chronique	10
II-1-Définition	10
II-2-Historique.....	10
II-3-Épidémiologie	11
II-4-Facteurs étiologiques	11
II-5-Diagnostic.....	12
II-5-1- Circonstances de découverte et tableau clinique	12
II-5-2- Diagnostic biologique	12
II-6 -Les différentes formes de LMC	17
II-6-1- LMC à polynucléaires neutrophiles (LMC-PN)	17
II-6-2- LMC atypique (a-LMC)	17
II-6-3- LMC à prédominance thrombocytaire.....	18
II-6-4-Évolution et symptomatologie	18
II-7- Evaluation pronostique	22
II -7-1 Score de Sokal	22
II-7-2 Autres scores	23
1- Score européen de Hasford.....	23

2- Le score de Gratwohl	24
3-Score EUTOS (European Treatment and Outcome Study for CML).....	25
Chapitre II : Physiopathologie de LMC	
I- Gènes et protéines impliqués dans LMC	27
I-1-Gène ABL.....	27
I.1.2 La protéine ABL1	27
I-2-1- Structure	29
I-2-2- Fonctions.....	30
I.1.2.3 Régulation.....	30
I-3- Gène BCR	31
I-4- La protéine BCR	32
I-4-1- Structure	32
I-4-2- Fonctions	33
I-4-3- Régulation	33
I-5- Réarrangement BCR-ABL	33
I-5-1- Mécanismes d'action de la protéine de fusion	35
I-5-1-1- Altération des propriétés d'adhésion induites par la protéine BCR-ABL dérégulée	35
I-5-1-2-Activation des signaux mitotiques	35
I-5-1-3-Inhibition de l'apoptose	36
I-5-1-4-Dégradation de protéines par le protéasome	36
Chapitre III : Prise en charge de LMC.....	38
I- Traitement De La Leucémie Myéloïde Chronique.....	38
I-1- Evolution du traitement de la LMC au fil du temps.....	38
I-2-Objectifs thérapeutiques et définition des critères de réponse aux traitements	39
I-3-Avant la découverte des inhibiteurs de tyrosine kinase	40
I-4- Traitement de la LMC sous l'ère des inhibiteurs de la tyrosine kinase .	42
I-5-Stratégie de suivi	52
I-5-1-Le suivi clinique.....	52
I-5-2-Le Suivi biologique.....	52
I-5-3- Le suivi hématologique.....	52

I-5-4-Suivi cytogénétique.....	53
I-5-5-Le suivi moléculaire.....	54
I-5-6-Suivi thérapeutique pharmacologique (STP) de l'IM.....	57
Partie Expérimentale	
Chapitre VI : Patients Et Méthodes	
I- Patients	61
II- Méthodes	61
II-1 -Prélèvements sanguins.....	61
II-2- Examen biologique	62
II-2-1 Hémogramme et frottis sanguin	62
II-2-2- Myélogramme	66
II-2- 3- Examen moléculaire	67
II-2-4- Analyse Statistique.....	76
Resultats	78
1 -Résultats de l'étude moléculaire au diagnostique.....	78
2-Caractéristiques clinico-biologiques au moment du diagnostic.....	79
3-Type du transcrit BCR-ABL1 des patients diagnostiqués.....	80
4-Résultats de l'évaluation moléculaire.....	80
5-Résultats de la quantification et cinétique du transcrit BCR-ABL1.....	82
6-Les déterminants de la RMM.....	83
Discussion.....	86
Conclusion	98
References bibliographiques.....	101
Annexes.....	126

Liste des abréviations

- ❖ **ABL** : Abelson (gène : ABL ; protéine : ABL)
- ❖ **ADN** : Acide désoxyribonucléique.
- ❖ **ADNc** : Acide désoxyribonucléique complémentaire
- ❖ **AEG** : Altération de l'état général
- ❖ **ARN** : Acide ribonucléique
- ❖ **ARNm** : Acide ribonucléique messenger
- ❖ **BCR** : Breakpoint Cluster Region (gène : BCR ; protéine : BCR)
- ❖ **CHU** : Centre hospitalo-universitaire
- ❖ **Ct** : Cycle threshold
- ❖ **DNase** : Désoxyribonucléase
- ❖ **DNTPs** : Désoxy-adénine tri-phosphate
- ❖ **EAC** : East African Community
- ❖ **EDTA** : Acide Ethylène Diamine Tétracétique.
- ❖ **ELN** : European leukemia net
- ❖ **EUTOS** : European treatment and outcome study for CML
- ❖ **FISH** : Fluorescence in situ hybridation
- ❖ **INF- α** : Interféron Alpha
- ❖ **ITK** : Inhibiteurs de tyrosine kinase
- ❖ **LAL** : Leucémie aiguë lymphoblastique
- ❖ **LAM** : Leucémie aiguë myéloblastique
- ❖ **LMC** : Leucémie myéloïde chronique.
- ❖ **M-BCR** : major breakpoint cluster region
- ❖ **m-BCR** : minor BCR
- ❖ **MGG** : May-Grünwald Giemsa
- ❖ **NA** : Non applicable
- ❖ **NCCN** : National Comprehensive Cancer Network
- ❖ **NFS** : Numération formule sanguine.

- ❖ **OMS** : Organisation mondiale de la santé
- ❖ **PCR** : Polymerase chain reaction
- ❖ **Ph** : Chromosome philadelphie.
- ❖ **RCM** : Réponse cytogénétique majeure
- ❖ **RCyC** : Réponse cytogénétique complète
- ❖ **RCym** : Réponse cytogénétique minime ou mineure
- ❖ **RHC** : Réponse hématologique complète
- ❖ **RMC** : Réponse moléculaire complète
- ❖ **RMM** : Réponse moléculaire majeure
- ❖ **RMP** : Réponse moléculaire profonde
- ❖ **RQ-PCR** : Real time quantification polymerase chain reaction
- ❖ **RT-PCR** : Real time polymerase chain reaction
- ❖ **TK** : Tyrosine kinase

Listes des figures

Figure 1 : moelle osseuse observée au microscope.....	1
Figure 2: Formation du chromosome Philadelphie.....	10
Figure 3: Aspect du frottis sanguin.....	13
Figure 4: Aspect d'un myélogramme au microscope.....	13
Figure 5: Caryotype médullaire.....	15
Figure 6: Image de FISH sur noyaux interphasiques d'un patient présentant une LMC...	15
Figure 7: Détection des transcrit par RT PCR.....	16
Figure 8 : Aspect d'une LMC atypique.....	18
Figure 9: Schéma représentatif du rôle de l'instabilité génétique dans l'acquisition de lésions génomique additionnelles au cours de la transformation aigue, et de leurs principales conséquences.....	22
Figure 10: Gène ABL.....	27
Figure 11: Structure de la protéine ABL.....	30
Figure 12: DTK d'ABL et mécanisme d'activation	31
Figure 13 : Gène BCR et les différents points de cassure.....	32
Figure 14: Structure de la protéine BCR.....	33
Figure 15: Gène BCR/ABL et différentes fusions BCR-ABL	34
Figure 16 : Mécanismes et voies de signalisation cellulaire.....	36
Figure 17 : Les grandes étapes de l'évolution du traitement de la leucémie myéloïde chronique.....	39
Figure 18 : Mécanisme d'action de l'imatinib.....	43
Figure 19 : Représentation schématique des mécanismes de résistance à l'imatinib et des examens nécessaires pour les détecter	46
Figure 20 : Représentation schématique du domaine kinase d'ABL complexé à l'imatinib, avec les différents groupes de points chauds de mutation	46
Figure 21 : Synthèse d'oncoprotéines et mécanisme d'action De l'omacetaxine.....	51
Figure 22: Définition de la réponse moléculaire et corrélation entre la réponse au traitement et le nombre de cellules leucémiques résiduelles.....	57
Figure 23: Echantillons de sang	62
Figure 24: Automate de FNS.....	63
Figure 25 : Les étapes de réalisation d'un frotis sanguin.....	64
Figure 26 : Les systèmes d'instruments GeneXpert Dx.....	68

Figure 27 : les reactifs utilisés dans la rt-pcr.....	70
Figure 28 :L'appareil de RT-PCR.....	75
Figure 29 : résultats de typage par la RT-PCR qualitative multiplex.....	79
Figure 30 : Répartition des patients LMC selon la réponse Moléculaire Majeure.....	81
Figure 31 : Répartition des patients LMC selon la réponse Moléculaire Primordiale.....	81
Figure 32 : Répartition des patients LMC selon l'échec.....	82
Figure 33 : Cinétique de décroissance du transcrit BCR-ABL1 au cours du temps	83

Liste des tableaux

Tableau 1 : Critères provisoires de réponse aux ITK.....	20
Tableau 2: Critères OMS et ELN de définition de la phase accélérée de la LMC.....	20
Tableau 3: Critères de définition de la phase blastique de la LMC.....	21
Tableau 4: Indices pronostic de la LMC.....	21
Tableau 5 : Score pronostic de Sokal.....	23
Tableau 6 : Score de Hasford.....	24
Tableau 7 : Score de Gratwohl.....	25
Tableau 8 : Score de Hasford.....	25
Tableau 9: définition des réponses hématologique, cytogénétique et moléculaire.....	54
Tableau 10: Caractéristiques des patients et résultats de leur typage par la RT-PCR qualitative multiplex.....	78
Tableau 11: Caractéristiques épidémiologiques et cliniques des patients LMC.....	80
Tableau 12 : Ratio BCR-ABL1 au cours du suivi moléculaire.....	82
Tableau 13: Fréquences des différents variant du transcrit BCR-ABL1 retrouvées dans différentes études.....	90
Tableau 14: les taux de la RMM retrouvés dans les différentes études.....	93

Résumés

ملخص

في سرطان الدم النخاعي المزمن (LMC) ، أصبح RT-PCR أكثر التقنيات حساسية متاحة حالياً لتوصيف إعادة ترتيب BCR-ABL1. الهدف الرئيسي من هذا العمل هو إعداد تقنيات البحث (RT-PCR) وتطبيقها في سياق التشخيص والمراقبة الجزيئية للمرضى المصابين بسرطان الدم النخاعي المزمن الذين يعتنون بهم بمصلحة أمراض الدم في المستشفى الجامعي عبد القادر حساني سيدي بلعباس.

بالنسبة للمرضى المشمولين في دراستنا ، استفادوا من RT-PCR النوعي. هؤلاء هم 10 رجال (32.3%) و 21 امرأة (67.7%) بمتوسط عمر 49.71 [31-72]. من بين 32 عملية بحث عن نصوص BCR-ABL1 ، يمكن تحديد نسخة الاندماج وهي من النوع (b3a2) (Mb3a2) في جميع المرضى (100%). لوحظ وجود معامل سوكال عالية في 13 مريضاً (41.93%) ومتوسط في 16 مريضاً (51.61%) ومنخفض في مريضين (6.45%).

يعتبر الانخفاض في نسبة BCR-ABL1 / ABL1 مهماً للغاية ، حيث ينتقل من متوسط 46 IS عند التشخيص إلى متوسط 3.45 IS بعد 3 أشهر فقط من المتابعة ($p > 0.0001$) ، ثم إلى متوسط 0.067 هو بعد 12 شهرًا من العلاج ($p > 0.0001$) للوصول إلى معدل متوسط 0.01 لمدة 18 شهرًا ($p > 0.0001$). كانت معدلات معدل وفيات الأهميات أعلى بشكل ملحوظ على التوالي في المرضى الذين لديهم مستوى منخفض (10%) في 3 أشهر (83.33% مقابل 19%) ؛ $p > 0.0001$ أو في 6 أشهر (≥ 1) (68.96% مقابل 28%) من بين المرضى الذين لم يحصلوا على تخفيض بنسبة 1 لوغاريتم 10 في 3 أشهر (11/2) (16.67%) ، نجح 1 فقط (3.22%) في الحصول على معدل RMM في 18 شهرًا ($p > 0.0001$) ، وفشل مريض واحد من ناحية أخرى ، لم يتمكن أولئك الذين لديهم معدل < 10% في 6 أشهر من الحصول على RMM بعد الثمانية عشر شهرًا الأولى ، بينما من بين 20 مريضًا كان معدلهم بين 1-10% ، تمكن 9 من الحصول عليه. (31.04%) (> 0.0001).

أصبح RT-PCR ضروريًا للتشخيص من أجل التمكن من اكتشاف جميع عمليات إعادة الترتيب الجزيئي المعروفة ل-BCR-ABL1 ، من أجل تقديم مراقبة جزيئية مناسبة. يتيح لنا التعرف بأسرع ما يمكن على مجموعة فرعية من المرضى المعرضين لخطر كبير للفشل ، بالإضافة إلى العوامل المؤهبة ، فهم اندار بشكل أفضل واقتراح الخيارات العلاجية المثلى.

الكلمات الرئيسية: LMC ، BCR-ABL ، RT-PCR ، RMP ، RMM.

Résumé

Dans le cadre de la leucémie myéloïde chronique (LMC), la RT-PCR est devenue la technique la plus sensible et la plus standardisée actuellement disponible pour la caractérisation du réarrangement BCR-ABL1. L'objectif principal de ce travail est de mettre en place les techniques de recherche (RT-PCR) et de les appliquer dans le cadre du diagnostic et du suivi moléculaire des patients atteints de leucémie myéloïde chronique qui sont pris en charge par le service d'Hématologie du CHU HASSANI ABDELKADER de Sidi Bel Abbès.

Pour les patients inclus dans notre étude ont bénéficié d'une RT-PCR qualitative multiplex. Il s'agit de 10 hommes (32,3 %) et 21 femmes (67,7 %), d'âge moyen 49,71 [31-72]. Sur les 32 recherches de transcrits BCR-ABL1, le transcrit de fusion a pu être identifié et il est de type b3a2(Mb3a2) chez tous les patients (100 %). Un score de Sokal élevé a été noté chez 13 patients (41,93%), intermédiaire chez 16 (51,61%) et faible chez 2 patients (6,45 %).

La décroissance du ratio BCR-ABL1/ABL1 se fait de façon très significative, il passe d'une médiane de 46 IS au diagnostic à une médiane de 3,45 IS après seulement 3 mois de suivi ($p < 0.0001$), puis à une médiane de 0,067 IS après 12 mois de traitement ($p < 0.0001$) pour atteindre ensuite un taux médian de 0,01 pour 18 mois ($p < 0.0001$). Les RMM étaient significativement plus élevées respectivement chez les patients qui avaient un faible niveau ($\leq 10\%$) à 3 mois (83,33% VS 19 % ; $p < 0.0001$) ou à 6 mois ($\leq 1\%$) (68,96% VS 28 % ($p < 0.0001$)). Parmi les patients qui n'ont pas atteint une réduction de 1 log $_{10}$ à 3 mois (2/11) (16,67%), seul 1 (3,22%) a réussi à obtenir une RMM à 18 mois ($p < 0.0001$), et un patient a échoué. Par contre ceux qui avaient un taux $> 10\%$ à 6 mois n'ont pas pu obtenir une RMM au bout des 18 premiers mois, alors que parmi les 20 patients qui avaient un taux compris entre 1-10%, 9 ont pu l'obtenir (31,04 %) ($p < 0.0001$).

La RT-PCR est devenue essentiel au diagnostic pour pouvoir détecter tous les réarrangements moléculaires BCR-ABL1 connus, afin de proposer un suivi moléculaire adapté. Identifier au plus vite un sous-groupe de patient à risque élevé d'échec, ainsi que les facteurs de prédisposition nous permet de mieux appréhender le pronostic et de proposer des choix thérapeutiques optimaux.

Les mots clés : LMC, BCR-ABL, RT-PCR, RMP, RMM.

Abstract

In the context of chronic myelogenous leukemia (LMC), RT-PCR has become the most Sensitive and standardized technique currently available for the characterization of the BCR-ABL1 rearrangement. The main objective of this work is to set up research techniques (RT-PCR) and to apply them in the context of the diagnosis and molecular monitoring of patients with chronic myeloid leukemia who are taken care by the department of Hematology of HASSANI ABDELKADER CHU in Sidi Bel Abbès.

The patients included in our study benefited from a qualitative RT-PCR. These are 10 men (32.3%) and 21 women (67.7%), with an average age of 49.71 [31-72]. Out of the 32 searches for BCR-ABL1 transcripts, the fusion transcript could be identified and it is of type b3a2 (Mb3a2) in all patients (100%). A high Sokal score was noted in 13 patients (41.93%), intermediate in 16 (51.61%) and low in 2 patients (6.45%).

The decrease in the BCR-ABL1 / ABL1 ratio is very significant, it goes from a median of 46 IS at diagnosis to a median of 3.45 IS after only 3 months of follow-up ($p < 0.0001$), then to a median of 0.067 IS after 12 months of treatment ($p < 0.0001$) to then reach a median rate of 0.01 for 18 months ($p < 0.0001$). The RMM were significantly higher respectively in patients who had a low level ($\leq 10\%$) at 3 months (83.33% VS 19%; $p < 0.0001$) or at 6 months ($\leq 1\%$) (68.96% VS 28% ($p < 0.0001$)). Among the patients who did not achieve a 1 log₁₀ reduction at 3 months (2/11) (16.67%), only 1 (3.22%) succeeded in obtaining an RMM at 18 months ($p < 0.0001$), and one patient failed. On the other hand those who had a rate $> 10\%$ at 6 months were not able to obtain an RMM after the first 18 months, whereas among the 20 patients who had a rate between 1-10%, 9 were able to obtain it (31.04%) ($p < 0.0001$).

RT-PCR has become essential for diagnosis in order to be able to detect all the known BCR-ABL1 molecular rearrangements, in order to offer suitable molecular monitoring. Identifying as quickly as possible a subgroup of patients at high risk of failure, as well as the predisposing factors, allows us to better understand the prognosis and to propose optimal therapeutic choices.

Keywords: LMC, BCR-ABL, RT-PCR, RMP, RMM

Introduction

Introduction

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une hémopathie maligne, et plus précisément un syndrome myéloprolifératif chronique. Cela se traduit par la prolifération clonale de cellules anormales de la lignée granuleuse. On constate donc une augmentation de la population des polynucléaires neutrophiles, accompagnée d'un maintien de la différenciation. Elle représente environ 15 à 20% des leucémies de l'adulte et son incidence est de 1 à 1.5 cas pour 100 000 personnes. (Arber DA et al., 2016)

L'anomalie cytogénétique acquise définissant la LMC, nommée chromosome de Philadelphie (Ph), témoigne d'une translocation réciproque t (22q ; 9q) entre les bras longs des chromosomes 9 et 22. Elle est retrouvée dans plus de 95% de cas de LMC en cytogénétique conventionnelle. Cette translocation entraîne la production d'un gène de fusion BCR-ABL (Breakpoint Cluster Region-Abelson Murine Leukemia) qui est retrouvé dans 100% des cas.

La protéine chimérique, codée par le transcrite de fusion BCR-ABL issu de ce réarrangement, a une activité tyrosine kinase constitutivement dérégulée et est directement responsable de la transformation leucémique (SFH ; 2007).

La LMC est devenue un modèle pour les thérapies ciblées en hématologie avec le développement de l'imatinib mésylate (IM), chef de file des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK). Il est à présent démontré que l'inhibition de l'activité kinase de BCR-ABL1 par l'IM qui reste à ce jour recommandé par la société savante du European Leukemia Net (ELN) (Baccarani et al., 2013) comme traitement de première intention, notamment en phase chronique (PC), aboutit au contrôle de l'évolution de la LMC avec une amélioration considérable de la survie des patients (Hochhaus et al., 2017). Cependant, près d'un quart des patients n'obtient pas de réponse jugée suffisante par les experts de l'ELN. En s'appuyant sur les résultats remarquables de l'essai IRIS (*International randomized study of interferon and STI571*) (Druker et al., 2006), l'ELN et le National Comprehensive Network Cancer (NCCN) ont proposé des définitions de réponses aux ITK (Baccarani et al., 2013 ; O'Brien et al, 2013).

La prise en charge des patients atteints de LMC nécessite donc une évaluation pronostique précise permettant une stratégie thérapeutique adaptée, et reposant essentiellement sur des techniques de biologie moléculaire. De nouvelles propositions de prise en charge des patients sont apparues. Les tests biomoléculaires réalisés à partir du sang vont permettre la recherche qualitative et la mesure quantitative des transcrits BCRABL1.

La recherche par reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) qualitative multiplexe des différents réarrangements BCR-ABL1 possibles doit être pratiquée et affirmera le diagnostic (Cayuela et al., 2012).

Dans le cadre du suivi, la réalisation d'une RT-QPCR tous les trois mois est indiquée. À noter que ces intervalles peuvent être espacés à six mois si une réponse moléculaire majeure est obtenue de manière durable. À l'inverse, ces intervalles doivent être rapprochés à quatre à six semaines en cas d'arrêt de traitement.

Dans notre pays, la prévalence de la LMC est passée de 472 cas en 2004 à 1030 cas en 2014 avec également une incidence qui est passée de 0.40 à 0,53/100.000 habitants en 2014 (Djouadi et al., 2016). Sur le plan thérapeutique, ce n'est qu'à partir de l'année 2005 que les premiers patients ont été mis sous IM de façon non régulière puis généralisée ensuite à l'échelle nationale en 2010. Cependant, les moyens de confirmation diagnostic de la LMC et de suivi moléculaire restent à ce jour très insuffisant et se limitent à un nombre restreint de patients. Selon le groupe Algérien de travail sur la LMC (GAT-LMC), seulement 39% de patients ont bénéficié des tests de biologie moléculaire.

Ainsi, sans ces moyens de diagnostic et de suivi, la prise en charge des patients LMC en Algérie reste un problème majeur de santé public, particulièrement dans le cadre du suivi des patients qui sont sous IM et qui peuvent à tout moment développer des résistances au traitement, lesquelles, si elles ne sont pas détectées précocement, peuvent conduire à des progressions vers les phases avancées qui sont fatale

Connaitre le profil moléculaire des patients dès le diagnostic est également essentiel afin d'une part utiliser, pour le suivi, l'outil moléculaire le plus adapté et d'autre part étudier le profil phénotypique des patients en fonction de leur transcrits de fusion. Nous voulions donc apporter les outils biologiques décisifs pour une meilleure prise en charge des patients atteints de LMC admis au service d'Hématologie du CHU HASSANI ABDELKADER de Sidi Bel

Abbès et évaluer leurs réponse moléculaire globale et également en fonction du type de transcrit détecté.

L'objectif principal de ce travail est de mettre en place les techniques de recherche (RT-PCR) et de les appliquer dans le cadre du diagnostic et du suivi moléculaire des patients atteints de leucémie myéloïde chronique qui sont pris en charge par le service d'Hématologie du CHU HASSANI ABDELKADER de Sidi Bel Abbès.

Revue
Bibliographique

Chapitre I :
Rappel Sur La Leucémie
Myéloïde Chronique

I-Définitions :

I -1-Les cancers hématologiques :

Les cancers du sang ou « hématologiques » comprennent cinq grandes familles : les leucémies, les lymphomes, les syndromes myéloprolifératifs, le myélome multiple et les myélodysplasies.

Les leucémies sont caractérisées par une augmentation excessive des globules blancs dans le sang et dans la moelle osseuse, centre de production des cellules sanguines dont le développement normal est entravé.

Les lymphomes sont des cancers du système lymphatique impliqué dans la défense de l'organisme, notamment vis-à-vis des infections, et qui comprend, outre la moelle osseuse, les ganglions et différents organes comme la rate.

Les syndromes myéloprolifératifs (SMP) sont dus à une fabrication exagérée des cellules sanguines (globules rouges, globules blancs et plaquettes) au sein de la moelle osseuse.

- Le myélome consiste en la prolifération d'un type particulier de globules blancs, les plasmocytes.
- Enfin, les myélodysplasies (MDS) sont des états préleucémiques (Boyne , 2015).

Une moelle osseuse (Figure 1) normale est composée de plusieurs types de cellules pouvant se reproduire elles-mêmes et ainsi former de nouvelles cellules qui pourront à leur tour se développer en un type cellulaire bien spécifique. Une moelle normale balance la production de ces différents types de cellules qui sont présentes dans le sang en quantité convenable. Chez un patient atteint de leucémie, cette production est débalancée (Roy , 2006)

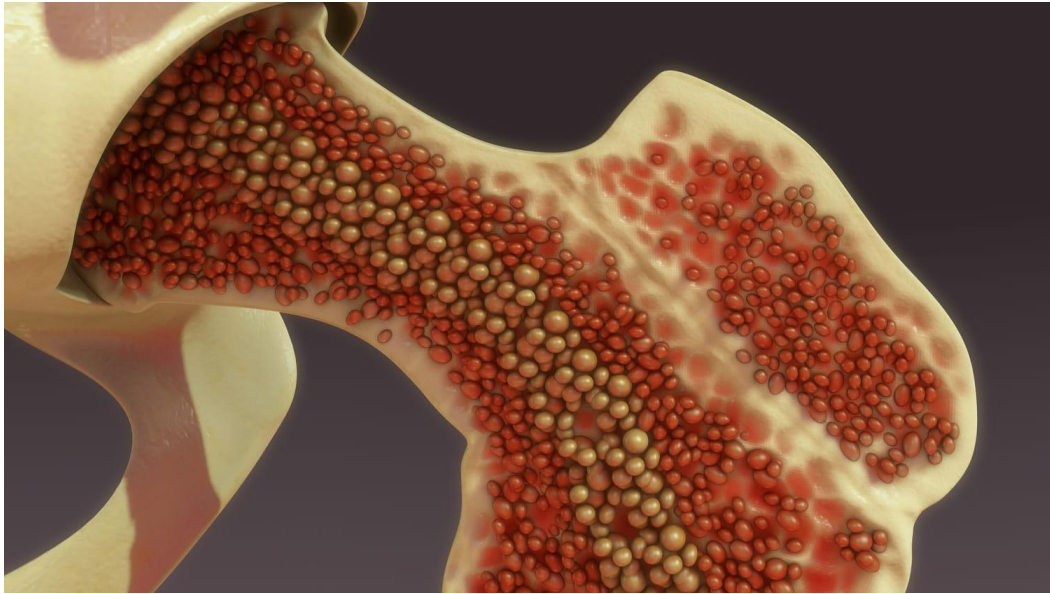


Figure 1 : moelle osseuse observée au microscope*

* <https://sante.journaldesfemmes.fr/fiches-anatomie-et-examens/2634193-moelle-osseuse-localisation-role-maladies-greffe/>

I -2-La Leucémie :

La leucémie est un cancer du sang qui a été découverte en 1847 par le pathologiste Rudolf Virchow, résultant de la lignée cellulaire hématopoïétique (Robien et Ulrich, 2003).

Des translocations, des inversions, ou des délétions génétiques dans les cellules hématopoïétiques perturbent la fonction normale des gènes dans ces emplacements, en modifiant le développement des cellules du sang normal (Hussain et al., 2012). En conséquence, les cellules leucémiques dysfonctionnelles ou non différenciées s'accumulent dans l'espace de la moelle osseuse et remplacent progressivement les cellules hématopoïétiques normales (Robien et Ulrich ., 2003).

I-2-1-Epidémiologie des leucémies:

La leucémie représente 3 % de l'ensemble de tous les cancers (Société canadienne des cancers. 2006). Elle représente environ 195 000 décès dans le monde chaque année. L'incidence de ce cancer est plus élevée aux États-Unis, au Canada, en Europe occidentale, en Australie et en Nouvelle-Zélande, alors que ces taux sont généralement plus de deux fois inférieures dans la plupart des pays d'Afrique et d'Asie (Tannock et al., 2005). On estime qu'en 2006 il y aura 4000 nouveaux cas au Canada (Société canadienne du cancer, 2006) et 32

810 aux États-Unis (Jemal et al, 2006) et que plus de la moitié vont en décéder. De plus, les hommes seraient plus fréquemment touchés que les femmes (Lackritz, 2001). Ce cancer est toutefois plus important chez les enfants puisqu'il représente 26 % des cas de cancer et est la deuxième cause de mortalité après les accidents. Cependant, une réduction importante de ce taux de mortalité, en particulier chez les enfants, est observée depuis les années 1960 grâce aux nombreux progrès pharmaceutiques.

I -2-2- Les différents types de leucémie :

Il y a deux classifications principales de leucémie:

- **La leucémie aiguë**, qui progresse rapidement; et la leucémie chronique, qui progresse lentement. La détermination de cette classe est basée sur le niveau de différenciation des cellules impliquées. Par la suite, chacune de ces classes est divisée selon le type de cellules hématopoïétiques qui est touché, c'est-à-dire les leucémies lymphoïdes et les leucémies myéloïdes. Un diagnostic précis permet la sélection du traitement le plus efficace pour un type particulier de leucémie (Robb., 2007).

La leucémie aiguë se développe soudainement. En l'absence de traitement, elle est fatale en moins de quelques semaines ou de quelques mois. Dans ce type de leucémie, la majorité des cellules sont peu différenciées, ce sont des cellules blastiques. La quantité de ces cellules augmente rapidement, prenant la place des cellules saines et aggravant ainsi la maladie (Robb., 2007). On a deux types de leucémie aiguë : Leucémie aiguë myéloïde et Leucémie aiguë lymphoïde.

- **La leucémie chronique** : La leucémie chronique évolue sur plusieurs mois à quelques années. Dans ce type de leucémie, les cellules sont davantage différenciées et peuvent ainsi effectuer certaines de leurs tâches sur une assez longue période. Le nombre de ces cellules augmente graduellement et c'est pourquoi elle est qualifiée de chronique. On a deux types de leucémie chronique : Leucémie myéloïde chronique et Leucémie lymphoïde chronique (Robb., 2007).

II-La leucémie myéloïde chronique

II-1-Définition

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une affection myélo-proliférative monoclonale caractérisée par l'expansion des cellules hématologiques porteuses de l'aberration chromosomique connue sous le nom de «chromosome de Philadelphie» (Nowell et Hungerford, 1960).

La formation du chromosome de Philadelphie (figure2) est due à une translocation réciproque entre les bras longs des chromosomes 9 et 22 ((t:9;22) (q34;q11)) qui conduit à la formation d'un nouveau gène de fusion, le BCR-ABL, encodant une tyrosine-kinase active. Cette protéine de fusion dérégule la tyrosine kinase constitutive et est responsable de la genèse de la leucémie (Roufosse et Beguin., 2010).

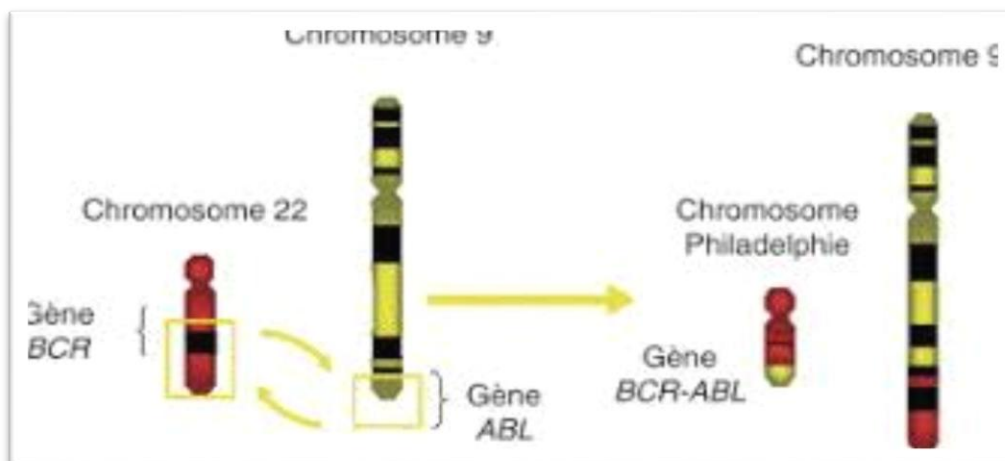


Figure 2: Formation du chromosome Philadelphie - Schéma proposé par Leguay et Mahon, 2005.

La LMC évolue en trois phases : la première est chronique, la deuxième est une phase d'accélération et la troisième est une phase blastique, où la maladie se transforme en leucémie aiguë (Benosman, 2010).

II-2-Historique

Les premières descriptions des manifestations cliniques de la LMC sont apparues en 1845 par Bennett et Virchow. En 1847, Virchow le premier, qui a utilisé le terme "leukämie" (leukemia) (le nom de leucémie est une combinaison des mots grecs "leukos" et "heima", qui signifie "sang blanc". Cela se réfère à l'abondance des globules blancs dans le corps. En 1852,

Bennett a préconisé le terme «leucocythaemia», ce qui signifie une augmentation des globules blancs, qui est mieux accepté (Xavier, 2013). Près de 100 ans plus tard, en 1960, la découverte par Nowell et Hungerford de chromosome Philadelphie (Ph), chromosome 22 tronqué, avec une perte apparente de matériel génétique de son bras long de spécimens de patients atteints de LMC (Nowell et Hungerford, 1960). En 1973, Rowley a démontré que le chromosome Ph a été formé par une translocation équilibrée entre les chromosomes 9 et 22 (Rowley, 1973) c'est-à-dire t (9, 22) (q34; q11.2). La base génétique de la LMC est devenue plus claire en 1983, les chercheurs ont démontré que les gènes essentiels impliqués dans la translocation étaient ABL1 (9q34) (Bartram et al. 1983), qui a été transporté dans un gène spécifique, BCR, sur le chromosome 22 (Groffen et al., 1984).

II-3-Épidémiologie

La LMC est un syndrome myéloprolifératif rare représentant 2 à 5 % des leucémies de l'enfant et 7 à 15 % des leucémies de l'adulte. Son incidence dans le monde varie en fonction des pays, la plus basse incidence est de 0.7 retrouvées en suède et en chine, et la plus haute est de 1.7 retrouvées en suisse et Etats unis. Cette affection touche préférentiellement les hommes (Leguay et Mahon., 2005).

En Algérie, l'incidence est de 0,53/100000 habitants avec une prévalence de 1030 en 2014. L'âge médian au diagnostic est de 48 ans. On décrit une atteinte préférentiellement masculine avec un sex-ratio de 1,2 (Djouadi et al., 2016).

II-4-Facteurs étiologiques

Actuellement, seules les radiations ionisantes sont reconnues comme seuls facteurs prédisposant de LMC. En effet, le rôle des radiations ionisantes dans l'apparition des leucémies a été le premier à être décrit, à partir de la cohorte des survivants de Hiroshima et Nagasaki, chez lesquels un excès de cas de leucémie a été retrouvé (Heyssel et al., 1960). Néanmoins, une méta-analyse portant sur 14 études publiées entre 1984 et 2004 a permis de confirmer une association possible entre une exposition aux pesticides (herbicides phénoxyacétiques) et le développement d'une LMC chez les agriculteurs ou fermiers (Van Maele-Fabry et al., 2008).

Des facteurs génétiques héréditaires ont été incriminés dans la survenue de la translocation. En effet, plusieurs SNP (single nucleotide polymorphisms) ont été identifiés

comme pouvant être associés à une prédisposition à développer une LMC (Bruzzone-Giovanelli et al., 2015).

II-5-Diagnostic

II-5-1- Circonstances de découverte et tableau clinique

Le mode lent de développement de la maladie fait qu'elle s'installe de façon insidieuse. Le plus souvent le diagnostic est porté de manière fortuite à l'occasion d'une numération formule sanguine (NFS) de « routine ». La maladie peut aussi se révéler par son symptôme cardinal, la splénomégalie (SPMG) retrouvée dans plus de 50% des cas de LMC-PC ou par d'autres signes généraux non spécifiques à la maladie. La maladie peut aussi se révéler au cours des complications liées à une thrombopénie tels que des saignements, liées à une thrombocytémie, notamment les complications thrombotiques, ou plus fréquemment, des complications à type de goutte du fait de taux élevés d'acide urique (Cayuela et Huguet., 2012).

II-5-2 Diagnostic biologique

➤ Anomalies hématologiques orientant le diagnostic :

La NFS et l'analyse du frottis sanguin sont, les premiers à être réalisés car ils permettent à eux seuls d'évoquer une NMP de type LMC et de déterminer la phase de la maladie (Arber et al., 2016, Baccarani et al., 2013, Pallera et al., 2016).

➤ Hémogramme et frottis sanguin

L'hémogramme met en évidence une hyperleucocytose d'importance variable, souvent supérieure à 25000/mm³, constituée de polynucléaires neutrophiles et d'une myélémie harmonieuse en phase chronique, c'est-à-dire essentiellement composée de métamyélocytes, myélocytes éventuellement de quelques promyélocytes et de rares blastes (figure3).

Une basophilie et une éosinophilie sont fréquentes et évocatrices. Une thrombocytose d'intensité variable est fréquente 30-50% des cas. L'existence d'une thrombocytopenie inférieure à 100000/mm³ en l'absence de tout traitement cytoréducteur signe une phase avancée de l'hémopathie.

L'hémoglobine est normale ou modérément abaissée (Rea et al., 2014).

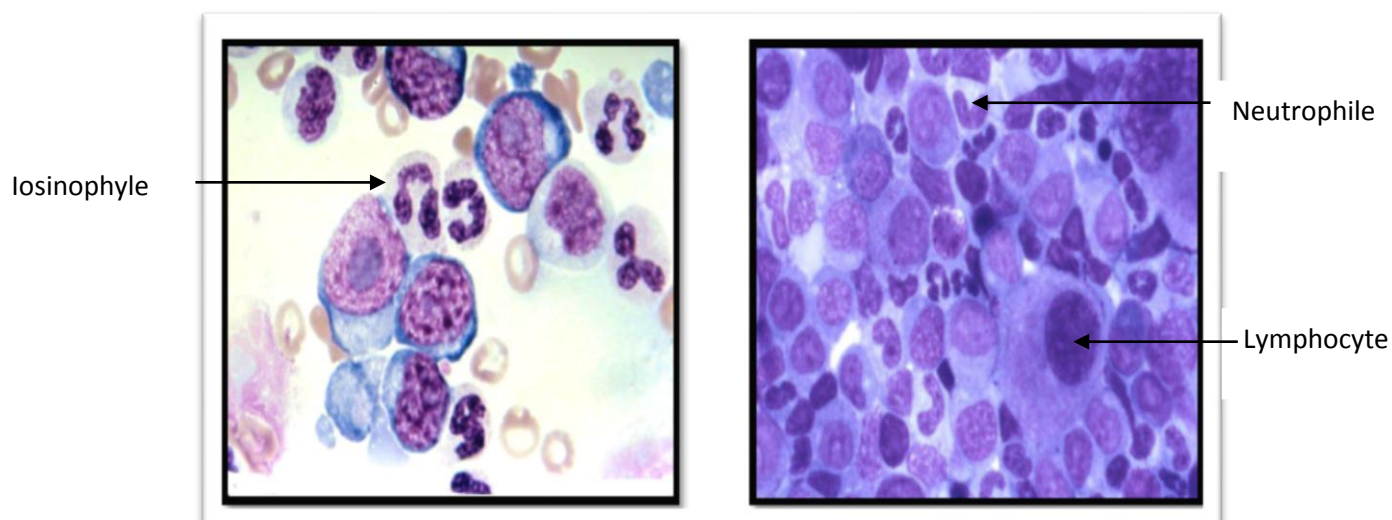


Figure 3: Aspect du frottis sanguin. (Rea ; 2014)

➤ Myélogramme

L'analyse du frottis médullaire montre une hyperplasie importante de la lignée myéloïde granuleuse dépassant 80% des éléments (figure4). Un excès de basophiles et d'éosinophiles peut être présent, parallèle à celui présent dans le sang. Le nombre de mégacaryocytes peut être augmenté ((Rea et al., 2014).

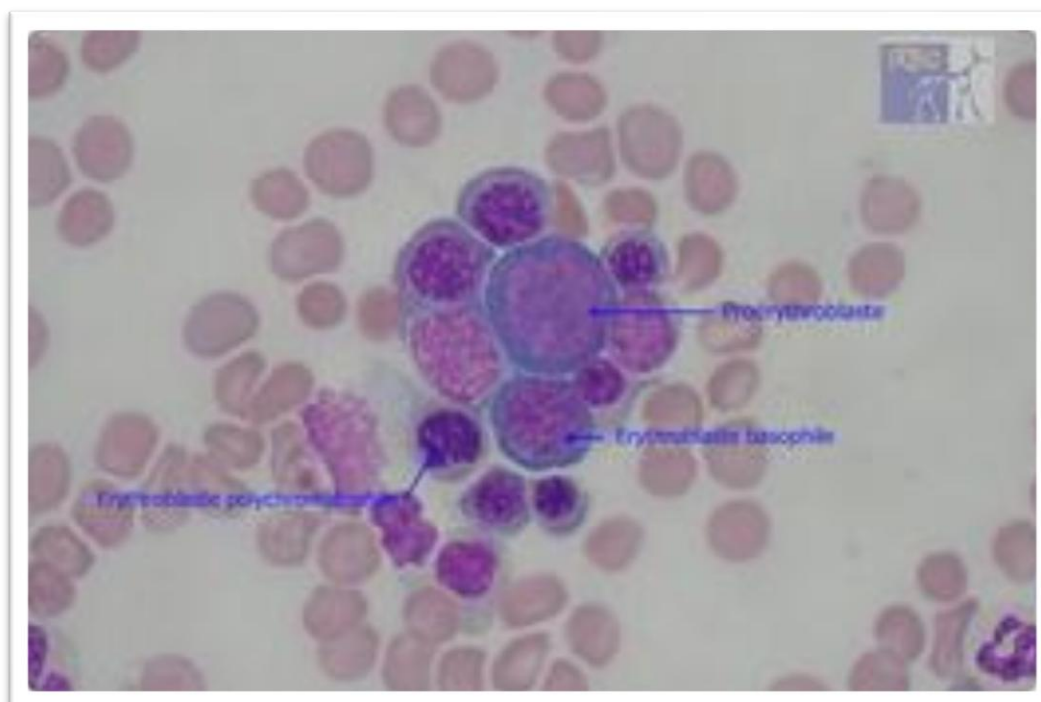


Figure 4: Aspect d'un myélogramme au microscope*

***<https://www.orbio.fr/canides-felides/analyses/cytologie/155-myelogramme.html>**

La proportion de blastes et de promyélocytes doit être inférieure à 10% de l'ensemble des cellules pour définir la phase chronique de la maladie (Cayuela et Huguet., 2012).

➤ **Examens nécessaires pour confirmation diagnostique**

La détection du Ch-Ph1 et la mise en évidence du gène de fusion BCR-ABL1, sont des critères diagnostics essentiels permettant de reconnaître la LMC parmi les NMP chroniques (Arber et al., 2016, Baccarani et al., 2012). Le Ch-Ph1 est mis en évidence en cytogénétique soit par caryotype conventionnel, soit par Hybridation In Situ Fluorescente (FISH), et son équivalent moléculaire : le transcrit de fusion BCR-ABL1 est détecté par biologie moléculaire (Cayuela et Huguet, 2012, Pallera et al., 2016, Baccarani et al., 2012).

➤ **Caryotype standard**

Cet examen réalisé sur au moins 20 métaphases, est essentiel car il permet non seulement de confirmer le diagnostic en montrant dans plus de 90 % des cas, la translocation classique réciproque $t(9;22)(q34.1;q11.2)$ (figure 5), mais également d'identifier dans moins de 10% des cas, les translocations variantes $t(9;22;v)$ impliquant plusieurs autres chromosomes partenaires, ou la présence d'éventuelle anomalies cytogénétiques additionnelles (ACA) (ACA Ph+)(Teffiri et al., 2008).

Il faut toutefois garder en mémoire que ce réarrangement chromosomique n'est pas visible dans environ 5 % des cas de LMC atypique (a-LMC) (LMC Ph1 négatif), dans ces cas, il faut savoir avoir recours à d'autres techniques, de type FISH ou RT-PCR (Baccarani et al., 2012, Goldman, 2009).

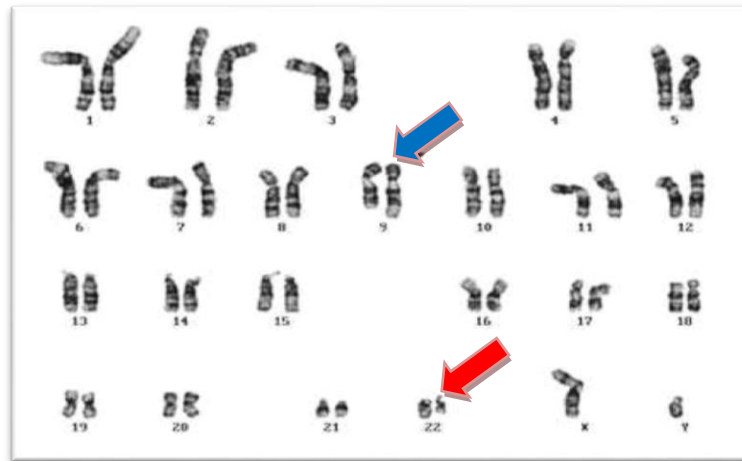


Figure 5: Caryotype médullaire (Tefferi A et al ; 2008)

- Flèche rouge : chromosome 22 raccourcis correspondant au chromosome Philadelphie.
- Flèche bleu : chromosome 9 plus long (der9).

➤ Les techniques FISH

Il s'agit d'une technique qui se réalise par hybridation de sondes génomiques fluorescentes complémentaires des gènes BCR (sonde rouge) et ABL1 (sonde verte). Elle permet de visualiser directement la fusion sur des métaphases ou des noyaux cellulaires en interphases. La fusion BCR-ABL1 est visualisée sous forme d'un signal ou spot jaune résultant de la fusion des deux couleurs (figure 6).

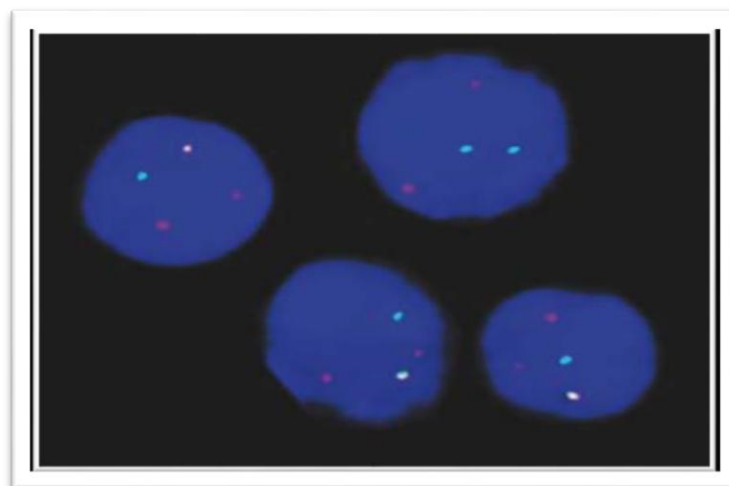


Figure 6: Image de FISH sur noyaux interphasiques d'un patient présentant une LMC (Cayuela et Huguet, 2012).

➤ **La biologie moléculaire**

L'étude par biologie moléculaire est parmi les techniques les plus sensibles actuellement disponibles pour l'identification de la fusion BCR et ABL1. Elle est actuellement considérée comme un outil indispensable au diagnostic de LMC.

La fusion des gènes BCR et ABL1 est mise en évidence sur un extrait d'ARN totaux (ARNt), par amplification génique par une technique de Polymerase Chain Reaction (PCR) qualitative après transcription inverse (TI) (figure 7). Elle confirme le diagnostic en mettant en évidence le transcrite de fusion BCR-ABL1 dans les cellules médullaires ou, plus facilement, à partir d'un prélèvement sanguin. Elle permet aussi de définir l'isoforme moléculaire produit en fonction du point de cassure sur le gène BCR.

L'identification claire du type de transcrite permet un suivi fiable par quantification du taux résiduel de ce transcrite au cours du temps « Monitoring de la maladie résiduelle (MRD)».

Cependant, la difficulté de ce diagnostic moléculaire réside dans le fait que certains patients expriment des transcrits variants, le recours donc à une amplification multiplexe capable d'amplifier la plupart de ces transcrits est fortement recommandé (Burmeister et al., 2008).

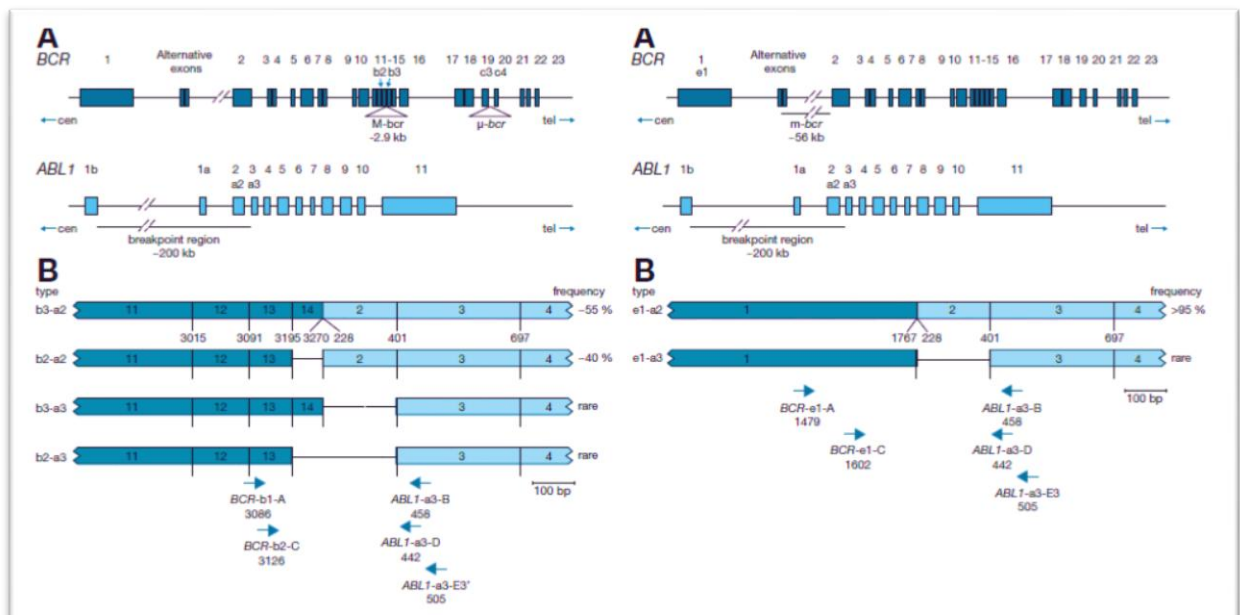


Figure 7: Détection des transcrit par RT PCR (Cayuela et Huguet., 2012).

➤ Détection de la protéine de fusion bcr-abl1

La protéine BCR-ABL1 peut être détectée par une analyse immunologique à partir d'un lysat cellulaire. Le principe de cette méthode repose sur l'analyse de la fluorescence par cytométrie en flux. On utilise des anticorps anti BCR couplés à des billes et des anticorps anti ABL1 conjugués à un fluorochrome. En l'absence de protéine de fusion BCR-ABL1, aucune fluorescence n'est détectée sur les billes (Cayuela et Huguet, 2012, Weerkamp et al., 2009).

II-6 -Les différentes formes de LMC

II-6-1- LMC à polynucléaires neutrophiles (LMC-PN)

Il s'agit d'une entité ayant un réarrangement moléculaire différent de type e19a2 (exon 19 de BCR « zone μ -BCR pour micro break point cluster region » uni à l'exon 2 de ABL), conduisant à la traduction d'une onco-protéine, la protéine **P230 BCR-ABL**, ayant un poids moléculaire plus important que dans la LMC habituelle (230 kDa au lieu de 210 kDa). A ce jour, environ 50 cas de LMC avec un transcrite e19a2 ont été rapportés (Gendron et al., 2014). C'est en 1990 que les deux premiers cas de c3a2 (e19a2) ont été détectés dans une étude portant sur 250 patients atteints de LMC (Saglio et al., 1990). Selon les premiers cas publiés à ce jour(44-46), il semble que la LMC-PN présente un phénotype plus indolent que la LMC (à part une polynucléose neutrophile prédominante), l'hyperleucocytose est modérée, la myélémie est absente ou minime et l'évolution est plus lente.

Ceci est dû probablement au niveau d'expression de l'ARNm BCR-ABL1 de type e19a2 et de la protéine p230 retrouvé chez la majorité des patients (Mayeur-Rousse et al., 2009). De plus, la protéine p230 possède in vitro une ATK augmentée par rapport à la protéine ABL1 native mais diminuée par rapport à p190 et p210 (Li et al., 1996).

II -6-2- LMC atypique (a-LMC)

Il s'agit d'un sous type totalement distinct, classé en SMP/SMD selon la nouvelle classification de l'Organisation mondiale de la santé (OMS) (Arber et al., 2016). Le patient présente un tableau clinique et cytologique évocateur d'une LMC mais l'analyse cytogénétique et moléculaire ne retrouvent pas le Ch-Ph1 et le transcrite de fusion BCR-ABL1. La a-LMC commence actuellement à être mieux caractérisée sur le plan moléculaire et est différenciée de la leucémie neutrophile chronique qui est caractérisée par la neutrophilie et par, le plus souvent, la présence de la mutation CSF3R (Récepteur tyrosine kinase), celle-ci

n'est retrouvée que dans moins 10% des cas de a-LMC (Arber et al., 2016, Wang et al., 2014), par contre les mutations SETBP1 et/ou ETNK1 sont retrouvées dans un tiers des cas (Meggen Dorfer et al., 2013 ; Gambacorti-Passerini et al ;2015).

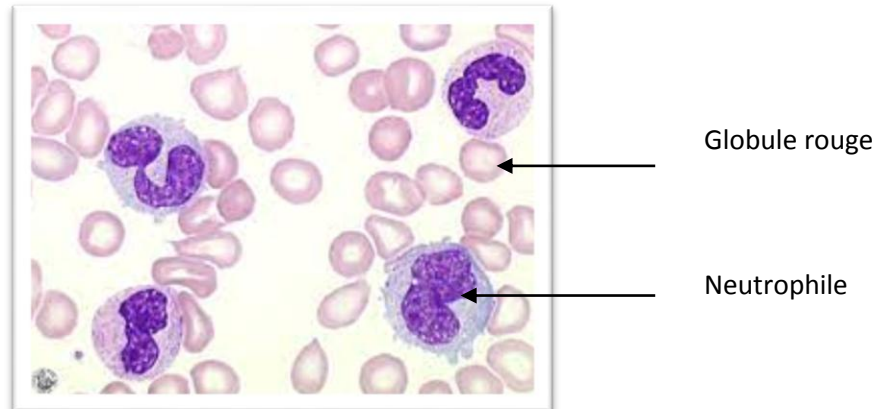


Figure 8 : Aspect d'une LMC atypique *

* <https://docplayer.fr/78105104-Association-de-biologie-praticienne.html>

II -6-3 LMC à prédominance thrombocytaire

Elle est exceptionnelle et peut poser un problème de diagnostic différentiel avec la TE, justifiant la recherche de BCR-ABL1 dans tous les cas de thrombocytose isolée non réactionnelle (Cayuela et Huguet, 2012, Gambacorti-Passerini et al., 2015).

II -6-4 Évolution et symptomatologie

L'histoire naturelle de la LMC comprend trois phases évolutives : une première phase dite «chronique», pauci symptomatique, suivie d'une deuxième phase, caractérisée par une accélération de la maladie, et enfin une troisième phase, appelée « transformation aiguë », prenant l'aspect d'une leucémie aiguë secondaire, résistante ou réfractaire au traitement, conduisant au décès du patient (Leguay et Mahon., 2005).

➤ Phase chronique :

Cette première phase est d'installation progressive ; elle dure en moyenne 4 à 5 ans. Les signes cliniques sont souvent insidieux et de nombreux patients sont asymptomatiques au moment du diagnostic, suspecté devant un hémogramme réalisé à titre systématique (40 % des cas). Cependant, trois grands syndromes peuvent se rencontrer :

- une altération de l'état général, liée à l'hypermétabolisme, associant asthénie, amaigrissement et, plus rarement, une fébricule et des sueurs ;
- un syndrome tumoral, largement caractérisé par une splénomégalie (50 %), parfois responsable d'une symptomatologie digestive ;
- des signes de leucostase, avec en particulier un priapisme, sont aujourd'hui assez exceptionnels (Leguay et Mahon., 2005).

➤ **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, cependant, être quasi inexistante, la phase blastique étant alors « explosive » (environ 20 % des cas) (Leguay et Mahon., 2005). Elle peut être insidieuse ou présente une aggravation de l'anémie, une splénomégalie et une infiltration d'organes. (Mohammedi., 2015).

➤ **Phase blastique :**

Elle survient avec un délai médian de 4 ans et se définit par la présence de plus de 20 % de blastes médullaires ou plus de 30 % de blastes et promyélocytes sanguins ou médullaires. 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 propre : fièvre, hépatomégalie, adénopathies et douleurs osseuses. Comme toute leucémie aiguë, elle est possiblement accompagnée d'un syndrome tumoral et de signes d'insuffisance médullaire. Des localisations blastiques extramédullaires peuvent également se voir, notamment une atteinte méningée ou des chloromes des tissus mous (Leguay et Mahon., 2005).

Les critères de définition de la phase d'accélération et de la phase blastique de la LMC sont, basés sur ceux de la classification révisée de l'OMS (Arber et al., 2014) et du ELN (Baccarani et al., 2009) (tableaux 1, 2, 3, 4).

Tableau 1 : Critères provisoires de réponse aux ITK (Baccarani et al., 2009)

<i>Critères OMS</i>	<i>Critères ELN.2009</i>
<p>Hyperleucocytose persistante > à 10x10⁹/l, ne répondant pas au traitement.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Persistance d'une splénomégalie ne répondant, pas au traitement. - Persistance malgré le traitement d'une thrombocytose > 1000 X 10⁹/l - Thrombopénie non lié au traitement <100 x10⁹/l - Basophilie ≥20% - Blastes sanguins ou médullaires entre 10-19% - Apparition d'anomalies génétiques clonales non présente au diagnostic telles que : Duplication du Chromosome Ph , trisomie 8 ou 19 les isochromosomes 17q et caryotype complexe 	<ul style="list-style-type: none"> - Blastes sanguins ou médullaires entre 15-29% ; ou blastes + promyélocytes sanguins ou médullaires >30% avec blastes <30% - Basophilie ≥20% - Thrombopénie non lié au traitement < 100 X 10⁹/l - Apparition d'anomalies chromosomiques clonales additionnelles (ACA)

Tableau 2: Critères OMS et ELN de définition de la phase accélérée de la LMC (Arber et al ; 2014) et du ELN (Baccarani et al ; 2009).

- Résistance hématologique aux ITK de première génération(ou absence de réponse hématologique complète (RHC)Aux ITK de première génération),
- Résistance hématologique, cytogénétique, ou moléculaire aux ITK de deuxième génération,
- Apparition de deux mutations ou plus dans le domaine d'ABL au cours du traitement par les ITK

Tableau 3: Critères de définition de la phase blastique de la LMC. (Arber et al., 2014) et du ELN (Baccarani et al ; 2009).

<i>Critères OMS</i>	<i>Critères ELN.2009</i>
Blastes sanguins ou médullaires $\geq 20\%$ Présence de blastes extramédullaire	Blastes sanguins ou médullaires $\geq 30\%$ Présence de blastes extramédullaire

Tableau 4: Indices pronostic de la LMC (Sokal JE et al ; 1984) et du (Hasford J et al ; 1998) et de (Hasford J et al ; 2011).

Etude Risque	Formule de calcul	
Sokal (Sokal JE et al ; 1984)	$0.0116 \times (\text{âge} - 43.4) + 0.0345$ $\times (\text{débord splénique en cm} - 7.51) + 0.188 \times$ $[(\text{plaquettes} / 700)^2 - 0.563] +$ $0.0887 \times (\text{blastés} - 2.10)$	Faible < 0.8 - Intermédiaire : 08-1.2 - Elevé > 1.2
Hasford (Euroscore) (Hasford J et al ; 1998)	0.666 quand âge > 50 ans + $(0.042 \times \text{débord splénique en cm}) + 1.0956$ quand plaquettes sont $> 1500 \times 10^9/l$ $+ (0.0584 \times \text{blastés}) +$ 0.20399 quand basophilie est $>$ $3\% + (0.0413 \times \text{éosinophilie})$ $\times 100$	- Faible ≤ 780 -Intermédiaire : 780-1480 - Elevé > 1480
Hasford (EUTOS) ((Hasford J et al ; 2011)	$\text{Rate} \times 4 \text{ Basophilie} \times 7$	- Faible ≤ 87 - Elevé > 87

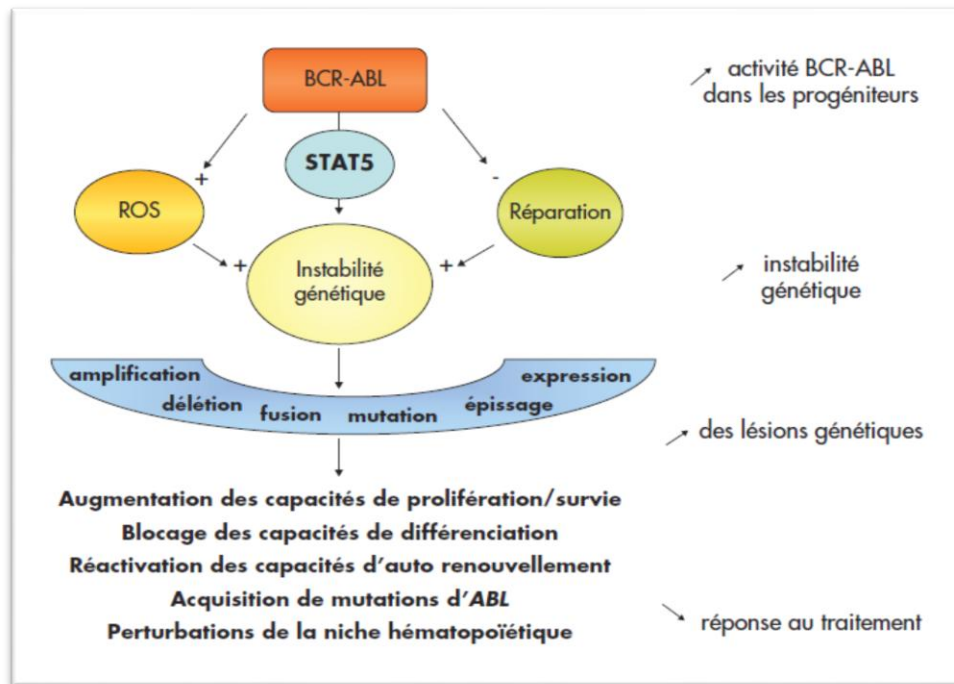


Figure 9: Schéma représentatif du rôle de l'instabilité génétique dans l'acquisition de lésions génomiques additionnelles au cours de la transformation aigue, et de leurs principales conséquences (Roche-Lestienne et al ; 2014).

II -7- Evaluation pronostique

L'évolution de la maladie est très différente d'un patient à l'autre, dont de nombreuses variations concernant la durée respective des différentes phases de la LMC sont observées. Les statistiques montrent que les patients atteints de LMC ont une moyenne de survie comprise entre 58 et 69 mois, soit environ 5 ans et même plus depuis l'avènement des inhibiteurs de la tyrosine kinase qui ont amélioré le pronostic de cette maladie.

L'étude des facteurs pronostiques a un rôle primordial pour déterminer l'issue de la LMC et pour prévoir les chances de guérison ou le risque de réapparition de la maladie. Pour une meilleure évaluation du pronostic vital et afin de choisir le traitement le mieux adapté au patient atteint de LMC, un certain nombre de scores d'évaluation ont été instaurés.

II -7-1 Score de Sokal

Ce score a été défini à partir des résultats cliniques obtenus par l'étude et le suivi dès la phase chronique d'une série de 813 patients sous traitement (hydroxyurée ou busulfan) en 1984 par Sokal.

Après avoir analysé de nombreux paramètres biologiques et cliniques, quatre paramètres majeurs sont ressortis :

- L'âge exprimé en année ;
- La taille de la rate en centimètres du rebord costal ;
- Le taux de plaquettes en Giga/l ;
- Le pourcentage de blastes circulants.

Un calcul logarithmique complexe à partir de ces facteurs pronostiques indépendants permet, pour chaque malade, d'avoir une valeur appelée indice de Sokal.

$$\text{Indice} = \exp \{0,0116 (\text{âge} - 43,4) + 0,0345 (\text{rate} - 7,51) + 0,188 [(\text{plaquettes}/700) \times 2 - 0,563] + 0,0887 (\text{blastés} - 2,1)\}$$

Le score de Sokal a subi par la suite une légère modification pour l'adapté aux patients de moins de 45 ans, cette modification prend en compte l'hématocrite et le sexe du patient 1 pour le sexe masculin et 2 pour le sexe féminin, mais ne dépend plus de l'âge.

$$\text{Indice} = \exp \{0,0255 (\text{rate} - 8,14) + 0,0324 (\text{blastés} - 2,22) + 0,1025 [(\text{plaquettes}/700) \times 2 - 0,627] - 0,0173 (\text{hématocrite} - 34,2) - 0,2682 (\text{sexe} - 1,40)\}$$

Ce score permet de séparer la population des malades en trois groupes (tableau 5) dont la médiane de survie est significativement différente :

Tableau 5 : Score pronostic de Sokal

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

Même si d'autres scores ont été proposés, le score de Sokal reste l'indice le plus utilisé à l'heure actuelle, par ce qu'il est le plus discriminant concernant l'indication des inhibiteurs de la tyrosine kinase.

II -7-2 - Autres scores

1-Score européen de Hasford

Hasford et al ont proposé un nouvel indice (Indice de Hasford ou Euroscore) permettant de discriminer mieux les patients traités par les (INF)- α en terme de survie c et indice est calculé à partir de :

- L'âge : en années
- La taille de la rate : en cm sous le rebord costal
- Le pourcentage de blastes circulants
- Le pourcentage d'éosinophiles circulants
- La basophilie : 0 si basophilie < 3 % et 1 dans les autres cas
- Le taux de plaquettes : 0 si taux de plaquettes < 1 500 Giga/l et dans les autres cas

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

Le score de Hasford permet de séparer, à nouveau, les malades en trois groupes (tableau6) statistiquement différents en ce qui concerne la survie globale (Zekkari., 2014) :

Tableau 6 : Score de Hasford.

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

2- Le score de Gratwohl

Le score de Gratwohl permet d'estimer la survie à 5 ans des patients qui sont candidats à une allogreffe de moelle osseuse. Il dépend de l'âge, du stade de la LMC, de l'intervalle entre la greffe et le diagnostic, du sexe du receveur, et du type de donneur. Sept cotes ont été ainsi établies de 0 à 6, sachant que 0 représente le pronostic le plus favorable.(tableau7)

Tableau 7 : Score de Gratwohl.

Score	0	1	2
Age	< 20 ans	20 à 40 ans	> 40 ans
Stade	Phase chronique	Phase d'accélération	Crise blastique
Délai diagnostic/greffe	< 1 an	> 1 an	
Sexe du receveur	Autre	Femme ou homme	
Type de donneur	Géno-identique	Non apparenté	

Les scores de Sokal, Hasford et Gratwohl sont les plus utilisés mais il en existe d'autres comme le score défini par Tura de l'Italian Cooperative Study of CML (comprenant de manière originale la taille du foie et la myélémie), ou Kantarjian qui intègre la race ou le modèle de COX, spécifique pour les patients de moins de 45 ans. Selon le type de traitement envisagé, on n'utilisera pas le même score mais ils sont complémentaires. Les scores de Sokal et Hasford seront utilisés pour les protocoles comprenant (INF)- α (interféron-alpha) associés à une chimiothérapie ou à l'imatinib par exemple (Bories et al, 2003).

3-Score EUTOS (European Treatment and Outcome Study for CML)

Ce score nouvellement établi à l'ère de la thérapie ciblée par les ITK sur une population d'adulte, a été publié en 2011 (Hasford et al, 2011). Il n'intègre que deux paramètres, la taille de la rate et le pourcentage de basophilie sanguine. Il permet de définir la probabilité du patient de ne pas être en RCyC à 18 mois de traitement. Un patient est considéré comme ayant un risque élevé quand son score EUTOS est supérieur à 87.

Le score de Hasford permet de séparer, à nouveau, les malades en trois groupes (tableau 8) statistiquement différents en ce qui concerne la survie globale (Zekkari, 2014)

Tableau 8 : Score de Hasford. (Zekkari, 2014)

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

Chapitre II:
Physiopathologie de
LMC

I- Gènes et protéines impliqués dans LMC :

I- 1-Gène ABL:

L'oncogène Abelson a été isolé par Abelson sous la forme v-ABL dans le génome du rétrovirus leucémogène murin, responsable de la leucémie chez la souris (De Klein et al., 1982).

Le gène ABL comporte 11 exons et comprend un site alternatif d'initiation de la transcription entre les exons 1A et 1B (Figure 10). ABL peut ainsi être transcrit en deux types d'ARNm donnant naissance à deux isoformes protéiques, la forme 1B pouvant être myristoylée contrairement à la forme 1A. Lors d'un réarrangement moléculaire, la cassure chromosomique a principalement lieu dans l'intron 1 (Chomel et al., 2009).

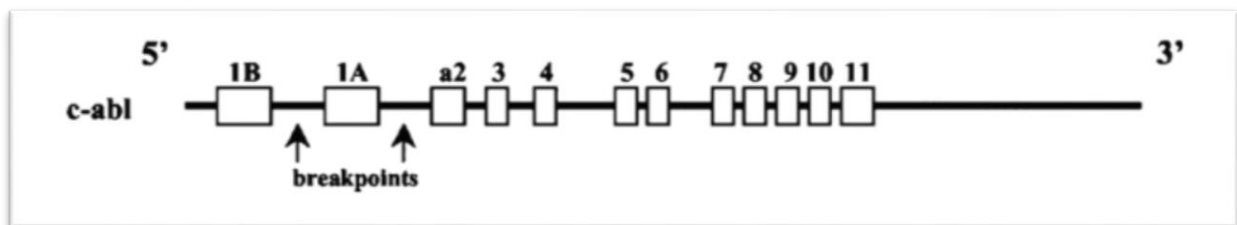


Figure 10: Gène ABL. L'emplacement des deux points de cassure (breakpoints) possibles : au niveau de l'intron séparant les exons 1A et 1B ou entre les exons 1A et a2 (Chomel J. C et al., 2009).

I- 2-La protéine ABL1

La protéine ABL tyrosine kinase de 145 kDa, est exprimée de façon ubiquitaire et est retrouvée tant dans le noyau que dans le cytoplasme. Les protéines TK sont des enzymes permettant la phosphorylation de protéines substrats sur des acides aminés particuliers (transfert d'un phosphate de l'adénosine triphosphate ou ATP à un résidu Tyrosine).

Dans les voies de transduction du signal, ces protéines qu'on les appelle protéines de signalisation, forment un véritable réseau pour relayer le signal extracellulaire jusqu'au noyau nucléaire où elles se lient à des facteurs de transcription et induisent l'expression de gènes cibles.

La protéine contenant l'exon 1B est myristoylée et de ce fait se trouve localisée au niveau membranaire. Ce phénomène de myristylation est dû à une interaction covalente de l'acide myristique qui est un acide gras saturé et la protéine 1b au niveau de l'azote d'un résidu glycine en position 2 dans la chaîne polypeptidique, ce qui entraîne sa fixation à

La membrane plasmique. Par contre la protéine contenant l'exon 1A (majoritaire), a une localisation nucléaire prédominante car non myristoylée (Leguay et al., 2005).

I- 2-1-Structure :

C'est une structure hautement conservée divisée en trois régions bien distinctes (Quintás-Cardama et Cortes, 2009) (*figure 11*) :

- la **région N-terminale ou (région cap)**: contient le site de myristoylation qui possède un double rôle, une régulation de l'activité kinase et un rôle de localisation membranaire (Panjarian et al., 2013). Les domaines d'homologie SH (*Src homology*) semblables à ceux de la protéine Src kinase :
- **Le domaine catalytique SH1 ou domaine tyrosine kinase (DTK)**

Présente l'ATK. Il comporte classiquement le site de fixation de l'ATP (c'est la boucle P qui permet la fixation du groupe phosphate de l'ATP), le site de fixation du substrat (c'est la boucle C ou site catalytique) ainsi qu'une boucle d'activation (boucle A) comprenant le site majeur d'autophosphorylation (*figure 11*).

- **Le domaine d'interaction SH2**

Permet l'interaction avec des protéines comportant des résidus tyrosines phosphorylés. C'est un régulateur positif du domaine SH1,

- **Le domaine d'interaction SH3**

C'est un domaine d'interaction avec des séquences riches en proline. C'est un régulateur négatif du domaine SH2 (Melo et Goldman, 2007).

- **La région centrale** riche en prolines (PxxP), permet des interactions avec d'autres protéines possédant des domaines SH3 comme la protéine CRKL, GRB2 (facteur de croissance lié au récepteur 2 ou « growth-factor-receptor-bound 2 ») et NCK (Quintás-Cardama et Cortes, 2009).
- **La région C-terminale** présente un domaine de liaison à l'ADN ou DNABD (DNA Binding Domain), trois signaux de localisation nucléaire (NLS: Nuclear Localisation Signal), des signaux d'exportation nucléaire (NES: Nuclear export signal) en réponse à un stimulus externes (environnement), et un site de liaison à l'actine (Actin Binding Domain) (Quintás-Cardama et Cortes, 2009)

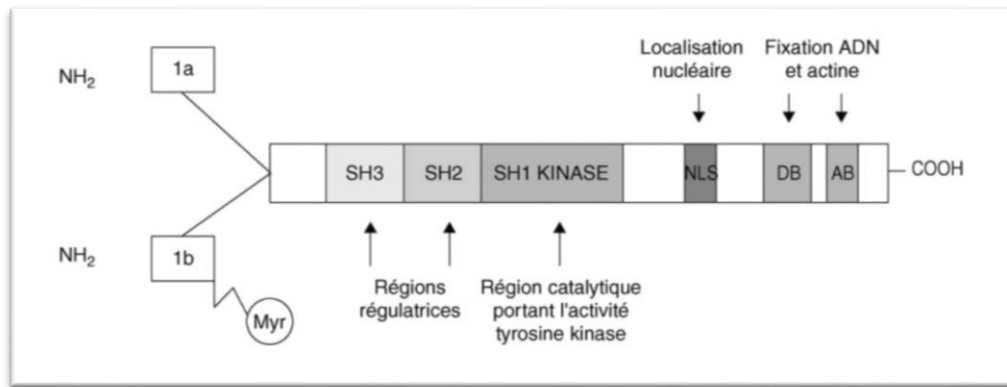


Figure 11: Structure de la protéine ABL (Leguay et Mahon., 2005)

I- 2-2-Fonctions

L'action de l'ABL dépend de sa localisation nucléaire ou cytoplasmique. Au niveau cytoplasmique, la protéine ABL joue un rôle important dans la croissance et la prolifération cellulaire, participant à la transduction du signal initiée par certains récepteurs aux facteurs de croissance. Alors qu'au niveau nucléaire, elle est surtout impliquée dans la régulation négative du cycle cellulaire (protéine pro-apoptotique) (Leguay et al., 2005).

La protéine ABL peut aussi induire l'apoptose en stabilisant la protéine p73 et/ou la protéine p53, et peut être aussi impliquée dans la réponse au stress génotoxique et la transmission de l'information passant par les intégrines (Wang, 2000). En interagissant avec des protéines impliquées dans les systèmes de réparation de l'ADN, la protéine ABL participerait également à la réponse cellulaire relative aux dommages causés sur l'ADN (Maiani et al., 2011).

I- 2-3-Régulation

La protéine ABL peut exister sous deux formes, une forme auto-inhibée inactive (état fermé où la boucle d'activation est repliée vers l'intérieur) et une forme active (état ouvert où la boucle d'activation est repliée vers l'extérieur) (Sorel et al., 2017, Quintás-Cardama et Cortes, 2009) (figure12). L'auto inhibition d'ABL est assurée principalement par l'action d'un groupe myristoyl, qui est rattaché au domaine N terminal de la kinase (le domaine SH3) (Sorel et al., 2017, Quintás-Cardama et Cortes, 2009, Panjarian et al., 2013). Ce myristate trouve également un point d'ancrage réversible, au niveau d'une poche hydrophobe du lobe C terminal du domaine kinase formant ainsi un verrou (Quintás-Cardama et Cortes, 2009). Ce

verrou a pour conséquence de fermer la kinase, en induisant un clamp entre les domaines SH2 et les deux lobes du domaine kinase, empêchant ainsi la phosphorylation de la Tyrosine 412 du segment d'activation par les kinases, et par conséquent, le domaine catalytique devient inaccessible au substrat d'ABL à l'ATP (Quintás-Cardama et Cortes, 2009).

L'activation se fait par déverrouillage du groupe myristoyl, déclampage des domaines SH2/3 et changement de conformation de la boucle d'activation permettant l'autophosphorylation sur la tyrosine en position 393 stabilisant la protéine sous sa forme active (Sorel et al., 2017) (figure 12).

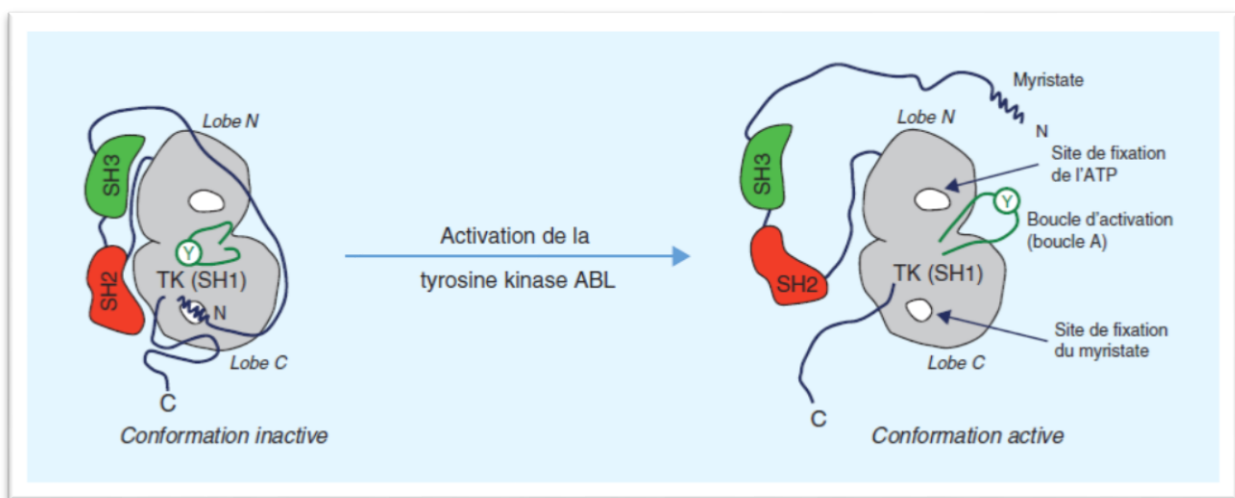


Figure 12: DTK d'ABL et mécanisme d'activation (Sorel et al ; 2017)

L'activation de la protéine ABL non transloquée nécessite le déverrouillage du groupe myristoyl, la dissociation des interactions des domaines SH2/3 avec le domaine tyrosine kinase et le changement de conformation de la boucle d'activation.

I- 3-Gène BCR :

Le gène Breakpoint Cluster Region (BCR) est situé sur le bras long du chromosome 22, a été découvert en clonant la région appelée major-breakpoint cluster region (M-BCR) où ont lieu la majorité des points de cassure dans la LMC. Il se compose de 25 exons dont deux alternatifs. Trois zones de cassures ont été identifiées au sein du gène BCR : M-BCR (Major BCR) dans la LMC, m-BCR (minorBCR) dans les leucémies aiguës lymphoblastiques à chromosome Philadelphie et μ -BCR (micro-BCR) dans les LMC à polynucléaires neutrophiles (Figure13). Dans la LMC, le dernier exon de BCR impliqué dans le réarrangement moléculaire est, le plus fréquemment, soit l'exon 13 (ou b2) soit l'exon 14 (ou

b3). Ainsi, dans la plupart des cas de LMC, le réarrangement BCR-ABL est soit de type e13(BCR)-a2(ABL), soit de type e14(BCR)-a2(ABL) (Chomel J. C et al, 2009).



Figure 13 : Gène BCR et les différents points de cassure. Chez la plupart des patients, ils sont localisés en M-BCR. (Leguay et Mahon ., 2005)

I- 4-La protéine BCR :

I- 4-1-Structure :

- **la partie N-terminale** possède deux domaines (figure 14):
- Le domaine 1B d'oligomérisation qui permet en cas de fusion BCR-ABL1, la dimérisation de la protéine de fusion, conduisant à l'ouverture de l'activité kinase responsable de l'activité transformante de la molécule.
- Le domaine 2B d'activité sérine-thréonine kinase, qui comprend deux sites de liaison aux domaines SH2.
- **La région centrale** présente un domaine composé de séquences DBL-like homologue à la pleckstrine qui jouent un rôle dans la stimulation de l'échange GTP-GDP par la protéine Rho-GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor).
- **La partie C-terminale,**
Absente dans la protéine de fusion BCR-ABL, présente des séquences homologues aux domaines catalytiques des protéines GAP (GTPases activating protein)

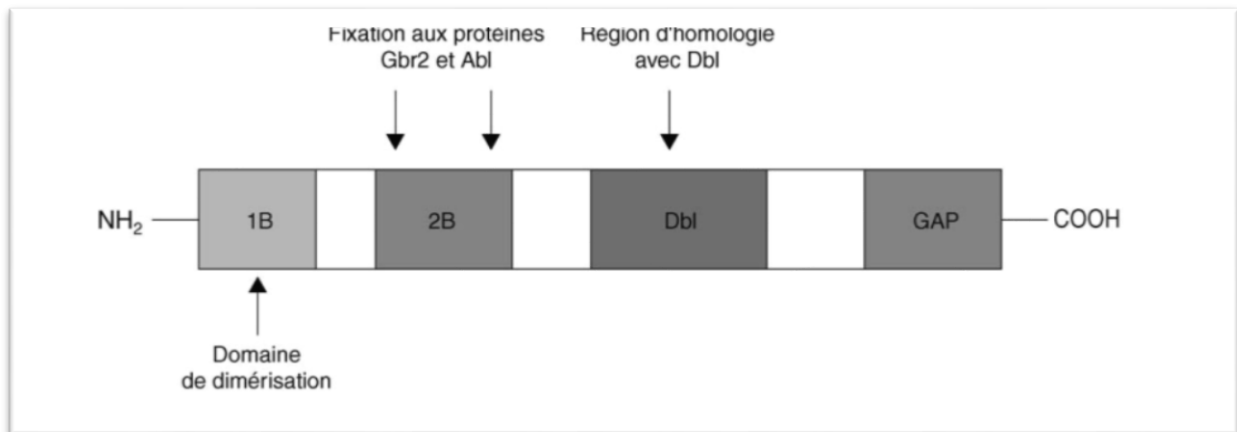


Figure 14: Structure de la protéine BCR (Leguay et Mahon ; 2005).

I- 4-2-Fonctions :

Les fonctions réelles de la protéine BCR sont, néanmoins, peu connues. Elle semble avoir un rôle important dans la transduction du signal *via* son activité GAP qui régule négativement l'activité GTPasique de p21rac2. Elle permet aussi une activation de la voie RAS suite à sa phosphorylation sur plusieurs résidus tyrosyl (Tyr) notamment, dans la région N-terminal, sur le résidu Tyr 177 qui lui permet d'interagir avec différentes protéines adaptatrices notamment Grb2, Grb10 et la protéine ABL1 via leur domaine SH2 (Quintás-Cardama et al ;2009).

La détection de la protéine au niveau nucléaire lors de la mitose, bien qu'elle, soit essentiellement cytoplasmique, a suggéré qu'elle joue un rôle dans le cycle cellulaire (Goldman et al ; 1985).

I- 4-3-Régulation :

L'activation de la protéine BCR se fait à travers la phosphorylation de résidus Tyr 177 (Y 177), par contre la phosphorylation de la Tyr 260 inhibe l'activité kinase.

I- 5-Réarrangement BCR-ABL

Les réarrangements les plus fréquemment retrouvés au cours de la LMC sont les produits de fusion du gène ABL rompu entre les exons 1 et 2 et du gène BCR rompu dans une région où les points de cassure sont variables, appelée M-BCR. Cette région, qui, correspond aux exons 12 à 16 du gène BCR, est subdivisée en cinq bandes, de b1 à b5, qui

correspond aux cinq exons impliqués (exons 12 = b1, exon 13 = b2..., exon 16 = b5). La coupure au sein de cette région se produit préférentiellement¹⁸ entre les exons b2 et b3 ou b3 et b4. Ainsi se forment, respectivement, les produits de fusion b2a2 et b3a2 (Figure 15) (Melo ; 1996).

Ainsi se forment, respectivement, les produits de fusion b2a2 et b3a2. Cependant, la protéine codée par le variant b3a2 est plus fréquente et comprend 25 acides aminés de plus que celle du variant b2a2 ; aucune étude n'a permis de démontrer une différence d'évolution clinique ou biologique entre ces deux variantes. Il existe d'autres variants de la translocation t(9;22), responsables, dans la majorité des cas, de phénotypes leucémiques différents. Il faut mentionner la fusion e1a2, issue d'une cassure dans la m-BCR, c'est-à-dire entre les exons 1 et 2 de BCR. Ce variant moléculaire est majoritairement retrouvé dans la leucémie aiguë lymphoblastique à chromosome Philadelphie. Un autre variant, qui comporte un gène BCR interrompu dans la μ -BCR, entre les exons 19 et 20, correspondrait à des hémopathies d'évolution lente, marquées par une hyperleucocytose modérée à polynucléaires neutrophiles, associées ou non à une thrombocytose (Pane et al ;1996).

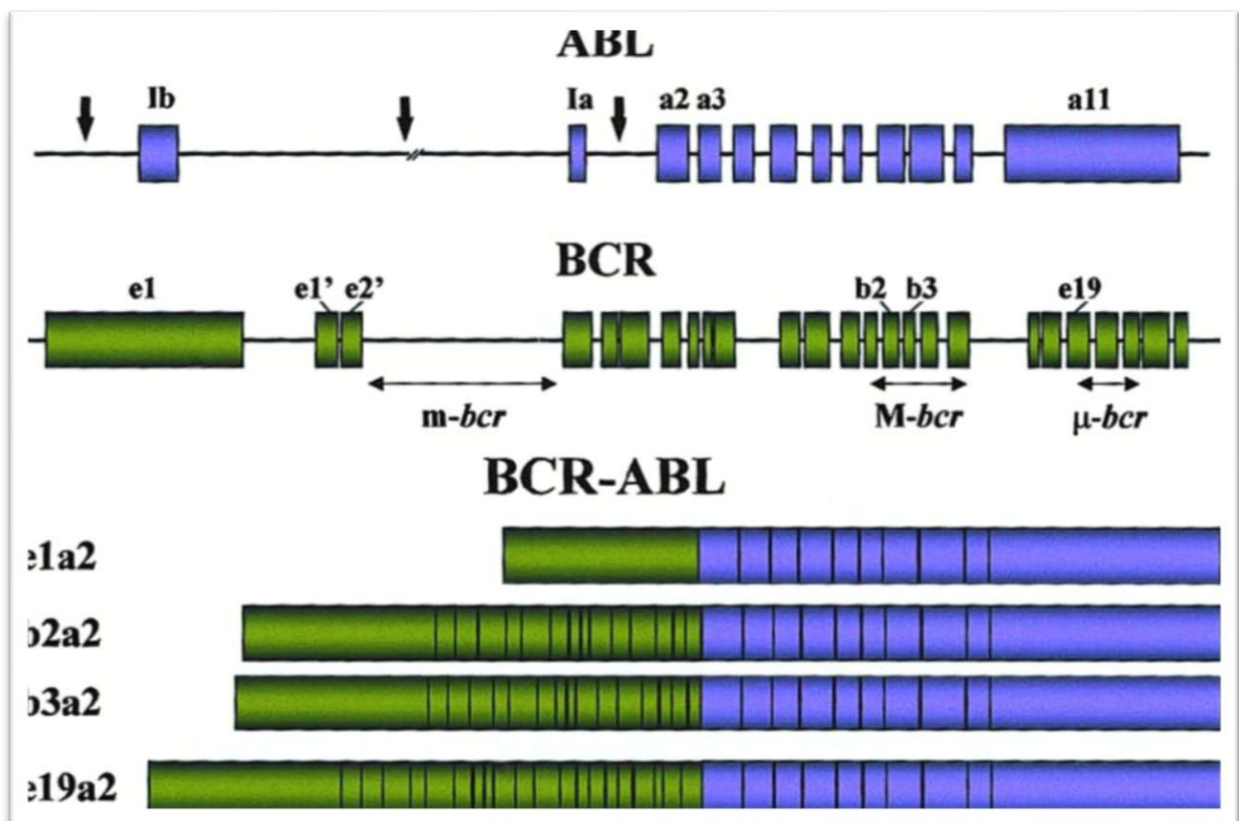


Figure 15: Gène BCR/ABL et différentes fusions BCR-ABL (Deininger et al ;2000)

Le produit du gène chimérique BCR-ABL, la protéine BCR-ABL, a une activité tyrosine kinase dérégulée et augmentée et est responsable de la transformation leucémique. La partie ABL est pratiquement toujours constante à la différence de la partie BCR, ce qui laisse penser que la partie ABL a une importance majeure dans la transformation leucémique, la partie BCR serait plutôt à l'origine des différents phénotypes de la maladie.

La présence de la protéine BCR-ABL dans les cellules leucémiques de pratiquement tous les patients atteints de LMC, confirme son rôle dans la pathogenèse. La protéine BCR-ABL a une importance majeure dans la prise en charge thérapeutique, puisqu'elle est la cible des traitements de la maladie dont la grande efficacité thérapeutique a profondément modifié la prise en charge et le pronostic de la LMC (Lemare et al ; 2016).

I- 5-1-Mécanismes d'action de la protéine de fusion

La phosphorylation d'un nombre très important de substrats est responsable des propriétés de la cellule leucémique, ce qui la distingue d'une cellule normale. En effet, l'auto activation et la perte de la régulation de l'activité tyrosine kinase entraînent l'activation, directe ou indirecte, et le recrutement de voies de signalisation impliquées dans les processus de prolifération, d'apoptose, de différenciation et d'adhésion cellulaire (Figure15) (Leguay., Mahon; 2005).

I-5-1-1-Altération des propriétés d'adhésion induites par la protéine BCR-ABL dérégulée

Les cellules tumorales immatures présentent une diminution de leur adhésion au stroma médullaire et à la matrice extracellulaire (Gordon et al ; 1987).

L'adhésion cellulaire est médiée par différentes familles de molécules comme les intégrines. L'expression de ces molécules d'adhésion n'est pas modifiée mais leur fonction et le signal qu'elles induisent sont dérégulés. Ainsi, la phosphorylation par BCR-ABL des protéines comme CRKL, la paxilline ou la talline, jouerait un rôle important dans cette dérégulation (Deininger et al ; 2000).

I-5-1-2-Activation des signaux mitotiques

L'autophosphorylation du résidu tyrosine 177 de la protéine BCR-ABL permet la fixation de la protéine GRB-2 qui, liée à SOS, stabilise la forme activée de RAS (Pendergast et al, 1991). Cependant, deux autres protéines, substrats de BCR-ABL, peuvent aussi activer RAS : SHC se liant à SH2 et CRKL se liant à SH3 (Oda et al ;1994, Pelicci et al ; 1995).

Une autre voie, celle de JAK kinase, joue aussi un rôle important. En effet, Bcr-Abl peut activer, via GRB-2, les protéines STAT sans passer par la phosphorylation des JAK kinases (De Groot al ; 1999).

De même, la voie des PI3 kinases peut, aussi, être activée via GRB-2, (Skorski et al ; 1997) induisant un signal prolifératif et anti-apoptotique via AKT (Del Peso et al ; 1997).

I-5-1-3-Inhibition de l'apoptose

BCR-ABL bloque le relargage du cytochrome C par la mitochondrie, ce qui induit l'inactivation de la voie des caspases (Amarante-Mendes et al ;1998).

Cet effet est dû en partie à la phosphorylation de la protéine pro-apoptotique Bad ou à l'hyperexpression de la protéine anti-apoptotique BCL-2 via des voies de signalisation RAS ou PI3 kinases dépendantes. D'autres partenaires moléculaires, telles les protéines STAT ou Encore la voie NFkB interviennent dans l'inhibition d'apoptose induite par BCR-ABL (Leguay., Mahon F.X ; 2005).

I-5-1-4-Dégradation de protéines par le protéasome

La protéine BCR-ABL, comme la protéine ABL, induit la dégradation via le protéasome des protéines Abl-1 et Abl-2, inhibiteurs physiologiques de l'activité kinased'ABL. Elle induit aussi la dégradation de protéines participant à la réparation de l'ADN, ce qui pourrait expliquer en partie l'instabilité génétique que présentent les cellules leucémiquesBCR-ABL positives (Leguay., Mahon; 2005). La protéine Bcr-Abl active différentes voies de signalisation (Faderl et al ; 1999)

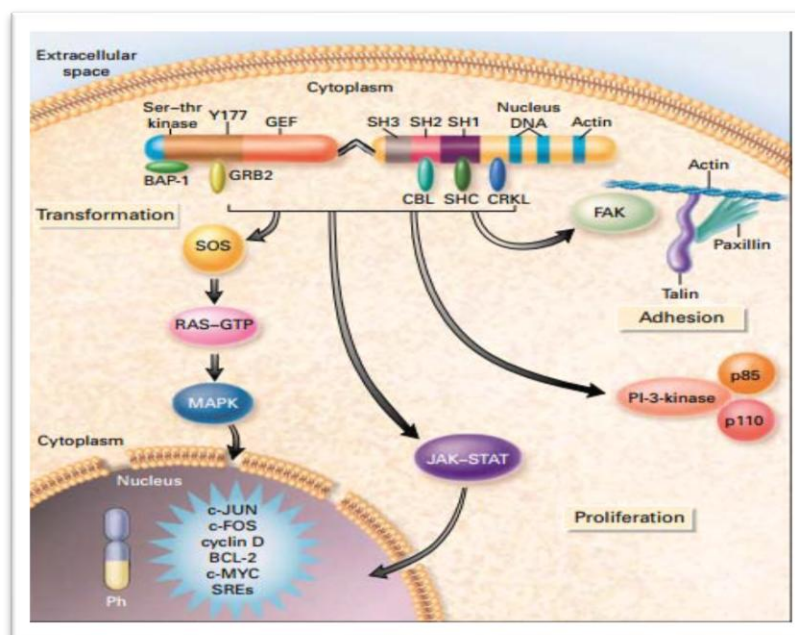


Figure 16 : Mécanismes et voies de signalisation cellulaire (Faderl et al ; 1999)

Chapitre III :
Prise en charge de
LMC

I-Traitement De La Leucémie Myéloïde Chronique

I-1-Evolution du traitement de la LMC au fil du temps :

En dehors de la greffe de moelle osseuse, dont l'indication reste limitée, la LMC a longtemps été une pathologie sans traitement curatif, la chimiothérapie n'étant qu'à visée symptomatique.

La splénectomie et l'arsenic ont constitué les tout premiers traitements.

Le busulfan en 1953 puis l'hydroxyurée (HYDREA®) dans les années 1970 ont fait leur apparition dans l'arsenal thérapeutique. Le traitement reposait alors sur une cytoréduction grâce à ces agents alkylants. La durée moyenne de la phase chronique était de l'ordre de 3 ans et la LMC était une affection constamment mortelle.

Ce n'est qu'en 1980 que l'interféron-alpha (IFN- α) a permis une amélioration de la survie globale des patients avec obtention de rémissions cytogénétiques complètes et durables (Turhan; 2005).

Au début des années 1980 également, il a été établi que la greffe de moelle allogénique était un traitement curatif permettant la disparition du chromosome Ph mais applicable chez une minorité de patients en raison de leur âge avancé ou de l'absence de donneur (McGlave et al ; 1994).

Par la suite, un effet synergique entre l'IFN- α et la cytarabine a été démontré, cette association a représenté le traitement standard hors greffe (Turhan; 2005) jusqu'à l'apparition de l'imatinib en 1998 qui a remplacé l'IFN- α et la greffe comme traitement de première intention pour les patients atteints de LMC en phase chronique.

La découverte des ITK, plus spécifique l'imatinib a réellement bouleversé la prise en charge des malades en modifiant leur médiane de survie mais également la surveillance du traitement.

Néanmoins certains patients sous imatinib présentent des résistances ou une absence de réponse thérapeutique en dépit de l'expression avérée de la molécule cible. Même si cette proportion reste faible, celles-ci font actuellement l'objet de recherches, ce qui a mené à la

Seconde génération d'ITK : dasatinib et nilotinib, et bien d'autres molécules encore à l'essai (Figure 17)

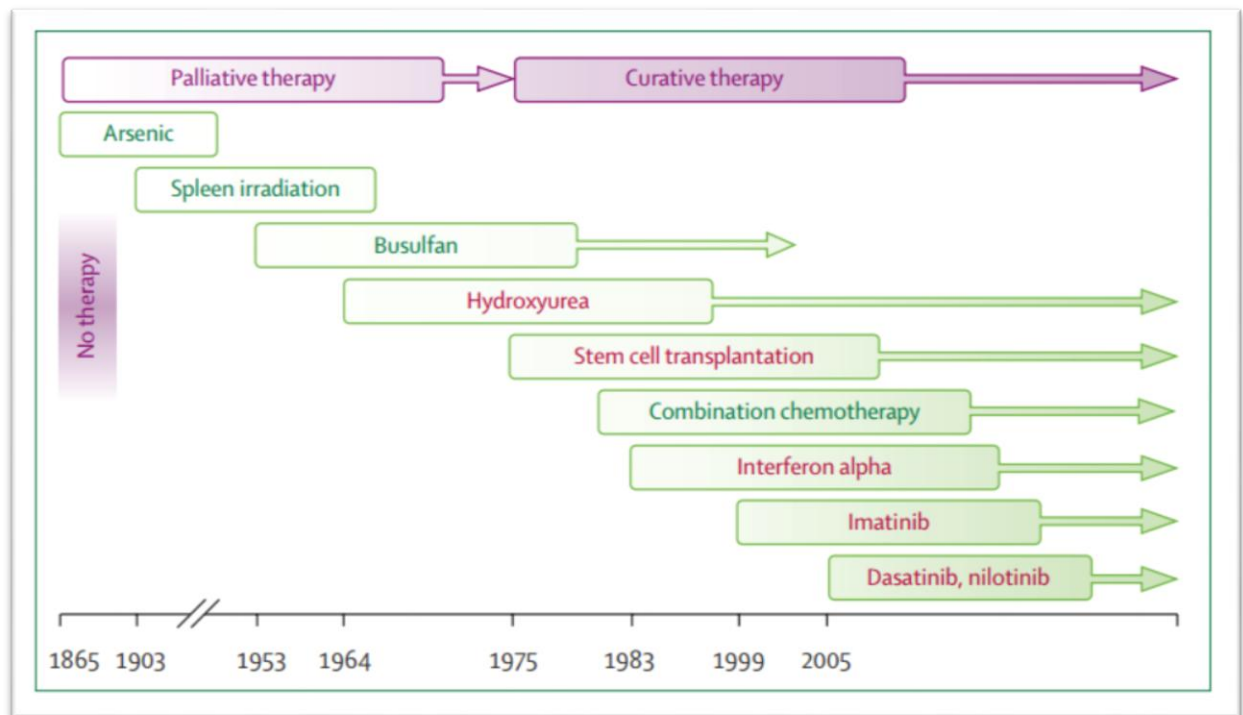


Figure 17 : Les grandes étapes de l'évolution du traitement de la leucémie myéloïde chronique (Hehlmann R et al ; 2007)

I-2-Objectifs thérapeutiques et définition des critères de réponse aux traitements :

Le traitement en phase chronique a pour objectif la rémission hématologique rapide et surtout l'éradication la plus complète possible des cellules porteuses du chromosome Ph.

Nous allons tout d'abord définir les critères de réponse hématologique (annexe1), cytogénétique et aussi moléculaire selon les recommandations de l'ELN 2009 (Baccarani et al ;2009, qui ont permis de comparer l'impact des traitements entre eux.

Ce sont les caractéristiques cliniques, biologiques et surtout le chromosome Philadelphie, marqueur de la maladie, et son équivalent moléculaire, qui ont permis de définir les différents critères de réponse au traitement.

I-3-Avant la découverte des inhibiteurs de tyrosine kinase

➤ Chimiothérapie

a. Busulfan

Le busulfan est un agent alkylant qui a permis l'obtention de réponses hématologiques complètes dans 23 à 54 % des cas, mais de très rares réponses cytogénétiques majeures ont pu être rapportées (1 à 2,5 %) (Hehlmann et al ; 1994, Ohnishi et al;1995).

Cette thérapeutique est connue par sa toxicité hématologique dose-dépendante retardée et durable, induisant dans les cas extrêmes une myélosuppression prolongée (Kang et al ; 2006). Le busulfan a été progressivement abandonné au profit de l'hydroxyurée (Annexe2) (Rousselot et al ; 2000).

b. Hydroxyurée

L'hydroxyurée (HU) est un composé organique simple utilisé comme agent chimiothérapeutique anticancéreux. Il agit spécifiquement sur la phase S du cycle cellulaire en inhibant l'enzyme ribonucléoside diphosphate réductase, empêchant ainsi la conversion Réductrice des ribonucléotides en désoxyribonucléotides et limitant ainsi la synthèse d'ADN (Madaan t al ; 2012).

La supériorité thérapeutique de l'hydroxyurée sur le busulfan a été confirmée par un essai randomisé (survie médiane comparée de 56 mois contre 44) (Hehlmann R et al ; 1993). L'intérêt de l'hydroxyurée tient aussi à son effet plus rapide et moins durable que celui du busulfan, ce qui rend le risque d'aplasie prolongée particulièrement faible (Rousselot et al ; 2000) (Annexe2).

L'hydroxyurée peut être utilisée pour contenir une quantité élevée de globules blancs ou une numération plaquettaire élevée, lorsque l'on attend un diagnostic plus précis, mais elle n'est pas plus rapide ou plus pratique que l'ITK.

L'effet de ces 2 molécules n'est que palliatif, vu qu'elles n'entraînent qu'une rémission incomplète avec persistance du chromosome Ph, et ne modifient en rien l'évolution naturelle de la maladie.

Un traitement prophylactique de l'hyperuricémie, à base d'allopurinol et une hyperhydratation, s'impose pour prévenir le syndrome de lyse tumorale.

c. Interféron alpha (IFN- α)

De tous les agents biologiques, les interférons ont été les premiers à être étudiés et incorporés dans le traitement du cancer. Les interférons, dont l'IFN- α est la plus grande sous-classe, possèdent des propriétés immunomodulatrices, antivirales et antiprolifératives, ce qui en fait des perspectives très intéressantes pour la thérapie anti-cancéreuse.

Dans les années 1980, l'IFN- α est devenu le traitement de première intention des patients atteints de LMC en phase chronique, non admissibles à la greffe de cellules souches allogéniques (Kujawski., Talpaz ; 2007).

L'IFN- α permet d'obtenir des réponses hématologiques et cytogénétiques bien plus élevées que celles obtenues par chimiothérapie conventionnelle. La survie des patients traités par l'interféron est supérieure aux résultats obtenus par une chimiothérapie standard. IFN- α peut être administré en monothérapie ou en association à la chimiothérapie (Rousselot et al ; 2000).

➤ **Allogreffe :**

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques a longtemps représenté la seule thérapeutique curatrice de la leucémie myéloïde chronique (LMC), malgré des comorbidités et un taux de mortalité importants. Elle reste néanmoins à ce jour un outil toujours en vigueur dans l'arsenal thérapeutique de la LMC (Paul., Mukhopadhyay; 2004).

L'allogreffe est dite géno-identique si les cellules greffées proviennent d'un membre de la famille ou phéno-identique si elles proviennent d'un donneur non apparenté. Elle consiste en une chimiothérapie myélo-ablative chez le malade pour conduire à une aplasie puis en une réinjection de cellules de moelle osseuse du donneur compatible.

Deux types de greffes sont possibles. La greffe syngénique (à partir d'un jumeau vrai) qui donne de très bons résultats immédiats mais avec un taux de rechute élevé si la greffe est faite en phase aiguë (80 %). La greffe allogénique avec donneur ou greffe géno-identique (à partir d'un frère ou d'une soeur HLA compatible) donne aussi de meilleurs résultats quand elle est faite en phase chronique (55 % de survie à six ans) qu'en phase aiguë (15 % de survie à six ans). Lorsque l'allogreffe est faite à la phase d'accélération, les résultats sont à peine meilleurs.

Généralement, les facteurs qui influencent le résultat d'une greffe sont surtout l'âge, à un moindre degré la durée et le traitement de la phase chronique avant la greffe et aussi la manipulation du greffon in vitro. La survie à long terme est de 70 % pour les patients âgés de moins de 20 ans ; elle n'est que de 40 % pour les patients plus âgés (plus de 40 ans).

On estime que 30 à 40 % des patients ont un donneur familial HLA compatible. En fait, sur 100 nouveaux cas de leucémie myéloïde chronique, 50 à 60 auront l'âge pour être proposés pour une greffe, 15 à 25 pourront être greffés et 8 à 15 seront probablement guéris par la greffe. Les possibilités de greffes géno-identiques étant par conséquent rares, on a recours de plus en plus fréquemment aux greffes à partir de donneurs volontaires. Comme pour la greffe géno-identique, les résultats sont meilleurs chez les sujets jeunes, greffés en phase chronique dans l'année du diagnostic (Guilhot ; 1995).

I-4-Traitement de la LMC sous l'ère des inhibiteurs de la tyrosine kinase

➤ Les protéines kinases (TK) :

Les tyrosines kinases sont des médiateurs importants de la cascade de signalisation, déterminant les rôles clés dans divers processus biologiques comme la croissance, la différenciation, le métabolisme et l'apoptose cellulaire en réponse à des stimuli externes et internes (Paul, Mukhopadhyay, 2004).

La Src, une protéine-tyrosine kinase non réceptrice, a fait l'objet d'intenses recherches pendant des décennies. Ces études sont issues du travail sur le virus du sarcome de Rous, un virus de la tumeur du poulet découvert en 1911 par Peyton Rous. La v-Src (une protéine virale) est codée par l'oncogène du virus du sarcome de Rous, et Src (l'homologue cellulaire normal) est codé par un gène physiologique, le premier des proto-oncogènes à être décrit et caractérisé.

Src est exprimé de façon omniprésente; Cependant, le cerveau, les ostéoclastes et les plaquettes expriment 5 à 200 fois plus de niveaux de cette protéine que la plupart des autres cellules (Roskoski R.J ; 2015).

➤ Les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) :

Les inhibiteurs de tyrosine-kinase ont inauguré une nouvelle classe pharmacologique en cancérologie. Indiqués initialement dans les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST), ils ont bouleversé, favorablement, la prise en charge de la LMC. Ils agissent directement sur

la protéine BCR-ABL par inhibition compétitive de son activité tyrosine kinase (Bardina et al, 2007).

- ITK de première génération: imatinib (GLIVEC®)

- Mécanismes d'action :

L'imatinib est un inhibiteur de la 2-phénylaminopyrimidine tyrosine kinase avec une activité spécifique pour l'ABL, récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes et récepteur c-kit (Delbaldo, 2007). Il repose sur la neutralisation de l'activité tyrosine kinase de la protéine BCR-ABL par inhibition compétitive de l'ATP au niveau du site catalytique de celle-ci. Ce processus aboutit finalement à l'inhibition de l'autophosphorylation, de la prolifération et induction de l'apoptose (Clark, 2004) (Figure 18).

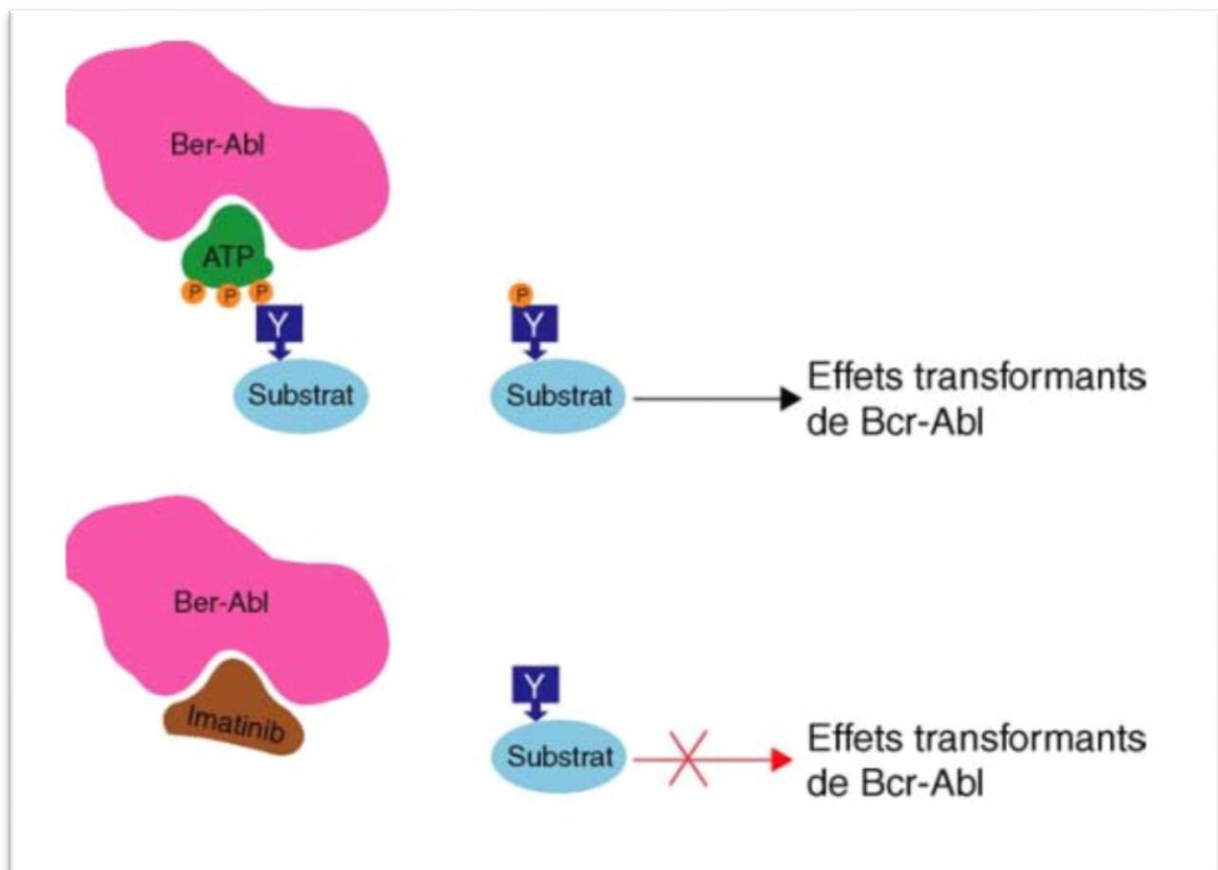


Figure 18 : Mécanisme d'action de l'imatinib (Leguay, Mahon ; 2005).

➤ **Pharmacocinétique :**

L'imatinib est rapidement absorbé après administration orale avec une concentration maximale (C_{max}) atteinte 2 à 4 heures après la prise, et avec une biodisponibilité de 98 %. Sa demi-vie d'élimination est approximativement de 18 h, indiquant qu'une prise journalière est suffisante.

La PK de l'imatinib est caractérisée par un modèle à un compartiment, avec une absorption d'ordre zéro, et une élimination de premier ordre.

Dans la circulation générale, l'imatinib est majoritairement retrouvé sous forme liée aux protéines. Les deux protéines principalement responsables de la liaison sont l'albumine et l'acide α 1 glycoprotéine (AAG).

L'imatinib a un métabolisme principalement hépatique, il est extensivement métabolisé par le système enzymatique du cytochrome P450 ; le cytochrome CYP3A4 du foie est l'enzyme principalement responsable de son métabolisme.

Son élimination se fait principalement par la voie des selles. Des études sur des dosages d'imatinib marqué au ¹⁴C ont montré un taux d'élimination de 81 % en 7 jours dont 68 % de la dose dans les selles et 13 % dans les urines (Delbaldo, 2007).

La fonction rénale a donc très peu d'influence sur la pharmacocinétique de l'imatinib. Un dysfonctionnement hépatique peut conduire à une plus grande variabilité des concentrations plasmatiques d'Imatinib et une augmentation modérée de l'aire sous la courbe. L'âge, le sexe et le poids ne modifient pas de manière significative la pharmacocinétique de l'imatinib (Peng et al, 2005).

➤ **Résistance à l'imatinib :**

Certains patients recevant l'imatinib ont une résistance primaire (intrinsèque) ou secondaire (acquise) :

- Résistance primaire : Selon les directives du National Comprehensive Cancer Network (NCCN), est définie comme absence de la rémission hématologique dans les 3 à 6 mois suivant le début du traitement, tout niveau de réponse cytogénétique à 6 mois, absence de RCyM à 12 mois ou RCyC à 18 mois.

• Résistance secondaire : est progression de la maladie et/ou la perte des réponses acquises par la thérapie, l'acquisition d'anomalies additionnelles au caryotype dans les clones cellulaires Ph+ qui reste la plus fréquente (Jabbour et al, 2010).

Dans environ 70 % des cas de résistance à l'imatinib un ou plusieurs mécanisme(s) est (sont) identifié(s) et dans 30 % des cas aucun mécanisme connu n'est retrouvé. Schématiquement, on distingue 2 types de résistances selon qu'elles sont gouvernées par BCR-ABL ou non (Figure 19) :

• Résistances BCR-ABL dépendantes dues à :

□ Une amplification du gène BCR-ABL mis en évidence par FISH, mais qui reste bien rarement identifiée en clinique (< 10 % des patients résistants). Principalement par l'apparition de mutations de la partie kinasique ABL. Plus de 50 mutations BCR-ABL ont été détectées chez des patients résistants à ce jour, dont les plus fréquentes et les plus graves sont les mutations T315I et celles affectant la boucle de phosphorylation de BCRABL (P-loop : acides aminés 248 à 255), car elles ont un impact direct sur la survie en augmentant le risque de progression vers une phase avancée (Figure 20),

□ Parfois, une diminution de la concentration intracellulaire d'imatinib pour une concentration protéique intracellulaire BCR-ABL qui demeure identique, et peut être incriminée dans la genèse de la résistance.

• Résistances BCR-ABL indépendantes :

□ Elles sont induites le plus souvent par une évolution clonale de la maladie qui met en jeu d'autres oncogènes que BCR-ABL responsables de la progression de la maladie,

□ L'activation d'autres voies kinasiques (SRC, Ras).

Tous ces mécanismes peuvent être intriqués entre eux et ils sont certainement mis en jeu à des niveaux divers dans les différents compartiments cellulaires hématopoïétiques (Nicolini F-E et al ; 2007)

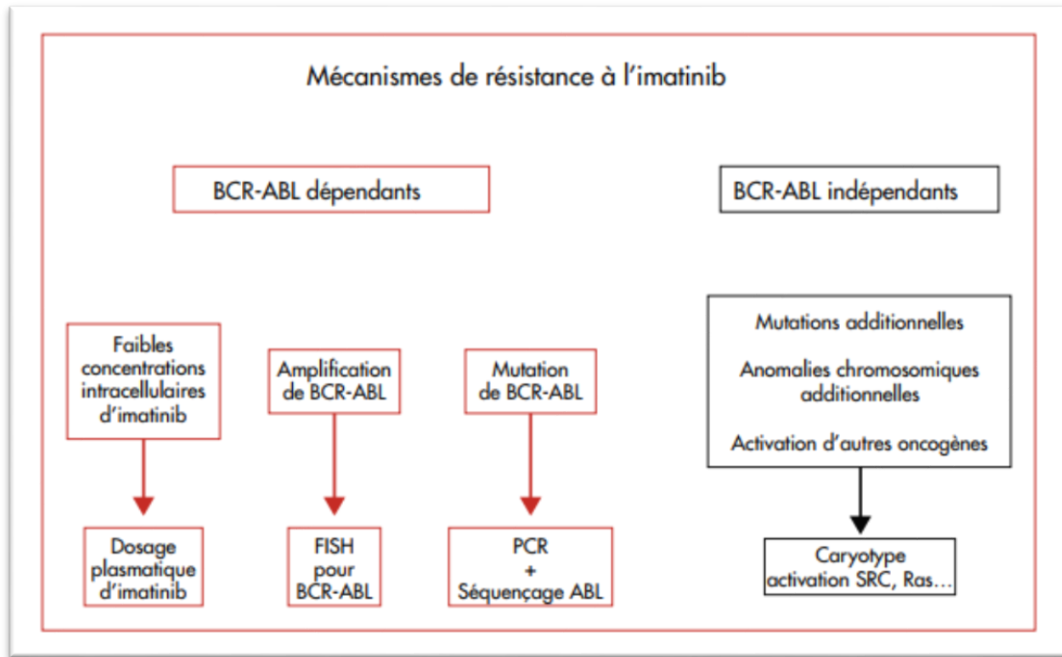


Figure 19 : Représentation schématique des méchanismes de résistance à l'imatinib et des examens nécessaires pour les détecter (Nicolini et al, 2007).

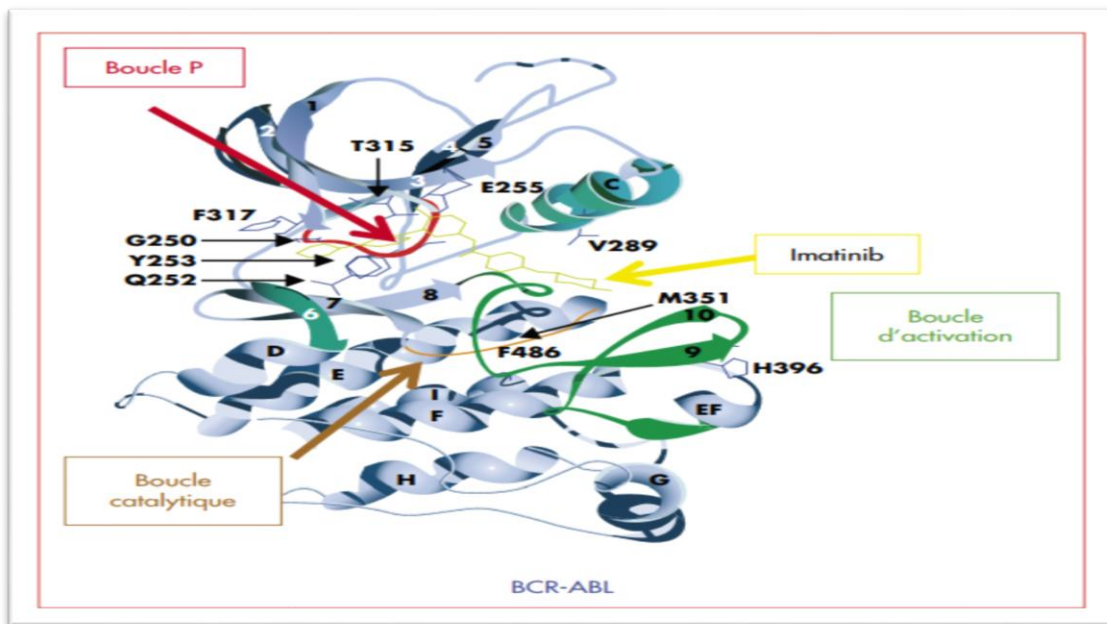


Figure 20 : Représentation schématique du domaine kinase d'ABL complexé à l'imatinib, avec les différents groupes de points chauds de mutation (Nicolini et al ; 2007).

➤ **Surmonter les résistances :**

La découverte des mécanismes de résistance à l'imatinib a permis de développer de nouvelles thérapies afin de surmonter cette résistance et éradiquer la maladie résiduelle. Les mutations de Bcr-Abl apparaissent comme le mécanisme le plus important pour la résistance acquise.

Certaines de ces mutations déterminent un phénotype hautement résistant in vitro alors que d'autres peuvent être neutralisées par l'augmentation des doses d'imatinib. Par conséquent, l'augmentation de la dose de l'imatinib seul ne permet pas de résoudre tous les problèmes de la résistance.

Dans la lutte contre la résistance, d'autres inhibiteurs de l'activité TK de c-ABL ont été identifiés. Parmi eux, le dasatinib et le nilotinib qui sont actifs in vitro sur la plupart des mutations, à l'exception de la mutation 315 qui reste un véritable défi thérapeutique (Roche-Lestienne, Preudhomme, 2007).

➤ **ITK de deuxième génération : dasatinib (SPRYCEL®), nilotinib (TASIGNA®), bosutinib (BOSULIF®)**

À partir de 2005, une nouvelle génération d'inhibiteurs de tyrosine kinase (dits de deuxième génération, ITK 2) a représenté une nouvelle alternative thérapeutique pour des patients intolérants ou résistants à l'imatinib, au-delà de la première ligne et a nécessité une nouvelle révision des algorithmes thérapeutiques (Pavey et al, 2012).

➤ **nilotinib (TASIGNA®) :**

Depuis 2007, l'EMA a approuvé le nilotinib pour le traitement des adultes atteints de LMC en phase chronique et accélérée présentant une résistance ou une intolérance au traitement antérieur, y compris l'imatinib. Le nilotinib n'a pas été approuvé pour utilisation en Colombie-Britannique. En septembre 2010, l'EMA a prolongé la licence pour son utilisation en tant que traitement de première ligne pour les adultes nouvellement diagnostiqués en phase chronique. Le nilotinib a également reçu l'approbation de cette indication par la FDA (juin 2010) (Pavey et al, 2012).

□ Mécanisme d'action :

C'est un nouveau dérivé biodisponible de l'imatinib par voie orale, est un inhibiteur de la tyrosine kinase avec une spécificité de cible améliorée. Sur la base d'une compréhension du mécanisme moléculaire de l'activité de l'imatinib, des modifications structurelles ont conduit au développement du nilotinib avec une efficacité 30 fois plus élevée. Comme l'imatinib, il inhibe Bcr-Abl en se liant à une conformation inactive du domaine ABL kinase (Kantarjian et al, 2007).

La plupart des mutants étant environ 20 fois plus sensibles au nilotinib qu'à l'imatinib. Une exception à cela est la mutation T315I, qui en est complètement insensible (O'Hare et al ; 2005).

➤ dasatinib (SPRYCEL®) :

Depuis 2006, l'European Medicines Agency EMA a approuvé le dasatinib pour le traitement des adultes atteints de LMC en phase accélérée ou blastique présentant une résistance ou une intolérance au traitement antérieur, y compris l'imatinib. En décembre 2010, l'EMA a prolongé la licence pour son utilisation en tant que traitement de première ligne pour les adultes nouvellement diagnostiqués en phase chronique. Dasatinib a également reçu l'approbation de cette indication par la Food and Drug Administration FDA (octobre 2010) (Pavey et al, 2012).

□ Mécanisme d'action :

Le dasatinib est environ 300 fois plus puissant in vitro que l'imatinib (Lindauer M ; 2010), il agit sur les kinases de la famille SRC et sur les formes actives et inactives de l'oncoprotéine BCR-ABL, il conserve son activité contre la plupart des mutations de BCR-ABL sauf T315I (Bardina et al, 2007).

➤ bosutinib (BOSULIF®)

Le bosutinib (SKI-606) est un double inhibiteur de la tyrosine kinase SRC et ABL actif par voie orale, ayant une activité inhibitrice minimale contre c-KIT ou le récepteur du facteur De croissance dérivé des plaquettes (Khoury et al, 2012) avec une activité intrinsèque 45-50 fois plus puissante que l'imatinib (Lemare et al, 2016).

Il a été approuvé par la FDA en 2012 pour le traitement de la LMC en phase chronique, accélérée et blastique chez les patients intolérants ou résistants à un traitement antérieur (Doan et al, 2015).

□ **Mécanisme d'action :**

Le bosutinib est un composé 7-alcoxy-3 quinoléinecarbonitrile qui inhibe spécifiquement l'activité de la BCR-ABL kinase responsable de la pathogenèse de la LMC Ph+. Il présente également une activité contre les kinases Src, impliquées dans la transformation des cellules malignes, la progression tumorale et métastases.

Le bosutinib est plus puissant que l'imatinib et est actif contre la plupart des mutations qui en sont résistantes, ce qui en fait une alternative thérapeutique prospective. Cependant, il n'a pas montré d'activité contre les mutations T315I et V299L.

➤ **ITK de troisième génération : ponatinib (ICLUSIG®)**

Approuvé par la FDA en décembre 2012 pour le traitement des patients atteints de LMC ou de leucémie aiguë lymphoblastique Ph+ résistante ou intolérante à un traitement antérieur par ITK (Gainor, Chabner, 2015).

Le ponatinib est considéré comme un ITK de troisième génération dans le sens où c'est la seule molécule disponible ayant montré une activité dans la LMC en présence d'une mutation T315I. C'est un pan-inhibiteur BCR-ABL avec une activité BCR-ABL 500 fois plus puissante que l'imatinib (O'Hare et al, 2009). Mais il a été objet d'un avertissement de la FDA et l'EMA en 2013 après la survenue d'événements thrombotiques cardiovasculaires graves (Massaro et al. ,2017).

En janvier 2014, la FDA a autorisé la réintroduction du ponatinib sur le marché, mais uniquement pour les patients pour lesquels aucun autre ITK n'est indiqué (Gainor, Chabner ,2015).

□ **Mécanisme d'action :**

Le ponatinib est un pan-inhibiteur de BCR-ABL conçu pour se fixer sur la kinase en présence de la mutation BCR-ABL T315I. Il bloque l'autophosphorylation de BCR-ABL native ou mutée par inhibition compétitive de la fixation de l'ATP sur la protéine en

conformation inactive (Gainor J. F., Chabner B. A ; 2015). Il bloque aussi l'activité d'autres kinases telles les SRC, FLT3, VEGF-R, FGF-R, c-KIT et PDGF-R (Miller et al, 2014).

➤ **Autres thérapies :**

a. Omacétaxine mepesuccinate :

L'omacétaxine mepesuccinate (omacétaxine), connu comme l'homoharringtonine (HHT), est une céphalotaxine de première classe avec un mode d'action unique qui a montré une activité prometteuse dans la LMC (Cortes et al ,2013). Octobre 2012, la FDA a accordé une approbation accélérée à l'omacétaxine pour le traitement des patients adultes atteints de LMC en phase chronique ou accélérée présentant une résistance et / ou une intolérance à deux ou plusieurs ITK (Alvandi et al, 2014), y compris les patients porteurs de la mutation T315I (Khoury et al ,2015).

➤ **Mécanisme d'action :**

L'activité de l'omacétaxine est indépendante du ciblage de l'oncogène BCR-ABL.

L'omacétaxine est un inhibiteur réversible de la traduction des protéines dont l'activité contre

La LMC, a d'abord été notée dans les essais précliniques menés dans les années 1990. Des études subséquentes ont permis d'élucider plusieurs mécanismes potentiels clés de l'effet anti-LMC de l'omacétaxine (Figure 21) :

- La régulation négative des protéines à courte durée de vie, comme la protéine leucémie myéloïde à cellules leucémiques (Mcl-1), qui régule la prolifération et la croissance cellulaire
- Une réduction de l'expression de BCR-ABL considérée comme due en partie aux effets sur Hsp90

Les effets apoptotiques sur les cellules souches leucémiques (Kurtin, Matta L , 2013)

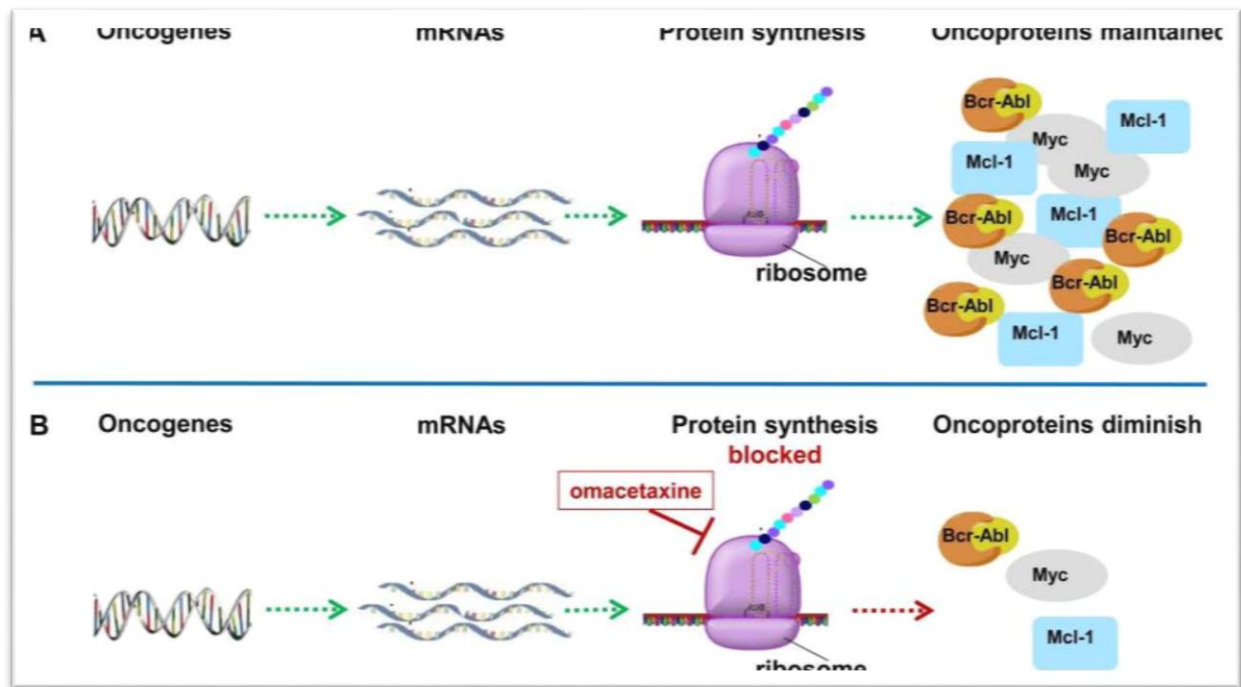


Figure 21 : Synthèse d'oncoprotéines et mécanisme d'action De l'omacetaxine

A : Les oncogènes sont transcrits en ARNm, puis synthétisés sur des ribosomes pour produire des oncoprotéines telles que BCR-ABL, Mcl-1, Myc. B : Les oncogènes sont transcrits mais la synthèse des protéines sur les ribosomes est bloquée par l'action de l'omacétaxine. Ceci entraîne une inhibition globale de la synthèse des protéines. Les protéines avec de courtes demi-vies telles que BCR-ABL, Mcl-1 et Myc diminuent (Gandhi, 2014).

➤ **radotinib (SUPECT®):**

Le radotinib (IY5511HCL) a été récemment introduit localement en Corée du Sud. Il peut être utilisé dans le traitement de deuxième intention de la LMC en phase chronique, et il n'est approuvé que par la FDA coréenne dans un cadre initial en 2012 (Eskazan, Keskin, 2017).

Le radotinib est un inhibiteur oral de la BCR-ABL de haute affinité, et qui présente une forte ressemblance structurale avec l'imatinib et en particulier avec le nilotinib (Eskazan, Keskin, 2017).

De plus, des études précliniques ont démontré la supériorité du radotinib sur l'imatinib dans les lignées de LMC de type sauvage et mutante BCR-ABL (Kim S-H et al , 2014), à l'exception de T315I.

Cependant l'expérience avec le radotinib acquise à ce jour est relativement limitée par rapport aux autres ITK de deuxième génération, et il y a encore un besoin d'essais internationaux multicentriques recrutant plus de patients de différents groupes raciaux et ethniques avec un suivi plus long en termes d'efficacité et de sécurité (Eskazan, Keskin, 2017).

I-5-Stratégie de suivi :

I-5-1-Le suivi clinique :

A l'exception de la splénomégalie, les critères cliniques ne sont pas pris en compte dans l'évaluation de la réponse au traitement (Baccarani et al, 2013, Baccarani et al, 2009).

I-5-2-Le Suivi biologique

Le seul moyen d'évaluer correctement la réponse à l'IM est de faire un suivi biologique régulier réalisé à des moments prédéterminés après le début du traitement.

Depuis 2006, des recommandations de prise en charge de la LMC sont régulièrement proposées et publiées l'égide du ELN (Baccarani et al, 2013, Baccarani et al;2009, Baccarani et al ; 2006).

La version 2009 reposait principalement sur le suivi cytogénétique effectué au cours des 18 premiers mois de traitement par IM, et permettait de définir trois situations: celle d'une réponse optimale, sub-optimale et celle d'un échec au traitement. Celle de 2013 accorde une attention particulière au suivi moléculaire (Baccarani et al, 2013, Baccarani et al ,2015) (Tableau 9). La notion de réponse « suboptimale » qui a été employée est à présent délaissée au profit de la notion d'alerte, qui doit entraîner une surveillance rapprochée. Les définitions des réponses hématologiques, cytogénétiques et moléculaires sont résumées dans le tableau 9 (Sorel et al, 2017, Kantarjian et al, 2002, Cross et al, 2015).

I-5-3- Le suivi hématologique:

La réponse hématologique doit être évaluée par une NFS tous les 15 jours jusqu'à l'obtention d'une RHC et constante dans le temps, puis tous les trois mois et, en cas de suspicion de perte de réponse. La réponse optimale au traitement suppose l'obtention sur le plan hématologique d'une RHC dès le troisième mois, qui correspond à la normalisation de la NFS avec un nombre de leucocytes inférieur à $10 \times 10^9/l$, une basophilie inférieur à 5% , une

absence de myélémie, un taux de plaquettes inférieur à $450 \times 10^9/l$ et une disparition de la splénomégalie. L'absence de la RHC à 3 mois ou sa perte au cours du traitement sont considérées comme un échec au traitement.

I-5-4-Suivi cytogénétique:

La réponse cytogénétique mesurée au caryotype doit être évaluée à 3 et 6 mois puis tous les six mois jusqu'à l'obtention d'une RCyC et constante dans le temps. Il est aussi recommandé de réaliser systématiquement une analyse cytogénétique en cas de survenue d'une anémie, d'une leucopénie ou d'une thrombopénie, en situation de réponse suboptimale ou d'échec de traitement.

□ **La réponse optimale** est définie par une réponse cytogénétique partielle (RCyP: persistance de 1 à 35 % de métaphases positives) à 3mois, et une RCyC (l'absence de chromosome de Philadelphie sur toutes les métaphases observées) à partir de 6 mois de traitement.

□ **La réponse sub-optimale** est définie si la réponse cytogénétique est seulement mineure (RCym) à 3 mois (persistance de 36 à 65 % de métaphases positives) ou partielle à 6 mois.

□ **Les situations d'échec** se définissent par une absence de réponse cytogénétique à 3 mois (Ch-Ph1+ > 95%), d'une réponse inférieure à une RCyP à 6mois et inférieure à une RCyC à 12 mois.

Tableau 9: Définitions des réponses hématologique, cytogénétique et moléculaire. (Baccarani et al 2015).

Réponse hématologique	RHC	Réponse hématologique complète	Leucocytes < 9 G/L, formule normale, taux de plaquettes < 450 G/L Disparition des symptômes et signes cliniques de la maladie (notamment la splénomégalie)	
Réponses cytogénétiques	RCyC	Réponse cytogénétique complète	Ph1 0 %	
	RCyP	Réponse cytogénétique partielle	Ph1 [1 %-35 %]	
	RCyM	Réponse cytogénétique majeure	RCyC + RCyP, Ph1 < 35 %	
	RCym	Réponse cytogénétique mineure	Ph1 [36 %-65 %]	
		Réponse cytogénétique minime	Ph1 [66 %-95 %]	
		Pas de réponse cytogénétique	Ph1 > 95 %	
Réponses moléculaires	RMM	Réponse moléculaire majeure	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} \leq 0,1 \%$	
	RM ⁴	Réponse moléculaire profonde	RQ-PCR positive	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} \leq 0,01 \%$ avec copies $ABL1 > 10\ 000$
			RQ-PCR négative	Copies $ABL1 [10\ 000-31\ 999]$
	RM ^{4.5}	Réponse moléculaire profonde	RQ-PCR positive	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} \leq 0,0032 \%$ avec copies $ABL1 > 32\ 000$
			RQ-PCR négative	Copies $ABL1 [32\ 000-99\ 999]$
	RM ⁵	Réponse moléculaire profonde	RQ-PCR positive	$BCR-ABL1/ABL1^{IS} \leq 0,001 \%$ avec copies $ABL1 > 100\ 000$
			RQ-PCR négative	Copies $ABL1 > 100\ 000$

I-5-5-Le suivi moléculaire :

L'impact pronostic de la réponse moléculaire précoce (RMPr) récemment rapporté (Marin et al, 2012, Hanfstein et al, 2012), a conduit à l'intégration de son évaluation dans la nouvelle version 2013 de l'ELN.

Le transcrite de fusion BCR-ABL1 représente un marqueur moléculaire spécifique des cellules leucémiques, sa quantité est proportionnelle à la maladie leucémique résiduelle.

Au diagnostic, la masse tumorale est estimée entre 10¹² et 10¹³ cellules totales (figure 22).

La réponse moléculaire s'évalue au moyen d'une méthode sensible, la RT-PCR quantitative en temps réel ou RQ-PCR qui consiste à amplifier et quantifier le transcrite ARNm

De BCR-ABL1 à partir d'un prélèvement de sang périphérique du patient, permettant ainsi de situer sa maladie résiduelle, de vérifier l'efficacité du traitement et d'initier un changement d'ITK en cas de non réponse. L'appréciation de la maladie résiduelle minimale grâce à l'emploi de la RQ-PCR permet de détecter quantitativement une cellule leucémique sur un million de cellules analysées. Le suivi moléculaire a été aussi proposé comme moyen de maîtrise de l'observance thérapeutique (Cayuela, 2015, Branford et al, 2012).

L'ELN recommande un suivi moléculaire tous les trois mois jusqu'à obtention de la RMM stable, puis tous les trois à six mois (Baccarani M et al;2013). Un protocole européen

de standardisation, EAC (*Europe against cancer program*) de la PCR en temps réel (**Gabert et al ; 2003**), a été établi en 2003 pour la quantification des réarrangements *BCR-ABL1*, fréquemment rencontrés dans la LMC à savoir le b2a2 et b3a2. Les transcrits rares sont quantifiés de la même façon mais avec des amorces spécifiques. Afin de garantir la qualité des résultats, des mesures de standardisation et des recommandations ont été établies et publiées concernant dans un premier temps l'ensemble du processus technique (de l'extraction à la quantification) (Cross ,2009).

Les résultats de quantification des transcrits *BCR-ABL1* doivent être exprimés en nombre de copies rapportées à 100 copies de transcrits d'un gène de référence (Ratio en pourcentage). Ceci va permettre de compenser les variations d'expressions liées au processus de dégradation qui survient inévitablement dès le prélèvement, d'identifier les échantillons d'ARN qui sont d'une qualité inadéquate pour être analysés et de vérifier l'efficacité de la rétro transcription (RT) et de la PCR. Actuellement, 3 gènes de référence sont recommandés au niveau international : *ABL*, *GUS* et *BCR*. Le gène de référence *ABL1* est fortement recommandé en raison de son niveau d'expression au niveau des différents types de cellules et de sa stabilité. Il est le plus utilisé par la majorité des laboratoires (Cross et al, 2015, Cross, 2009- Hughes et al, 2006).

Afin de limiter les variations entre les différents laboratoires et rendre possible la reproduction des niveaux d'expression dont dépendent les décisions cliniques, une standardisation des résultats a été proposée par les différents experts du ELN et NCCN.

Il a été choisi d'exprimer les résultats par l'utilisation d'un facteur de correction (ou facteur de conversion) selon un score international (IS pour International Scale) en log, réduction par rapport à une ligne de base théorique établie à 100 % au diagnostic (Cross, 2009, Cross et al ,2012- Branford et al, 2008) (figure 22).

Par rapport à cette ligne de base, des valeurs seuils ont été utilisées pour définir les limites entre une réponse optimale et une alerte, et entre une alerte et un échec thérapeutique. Un ratio de 1 % IS c'est à dire une réduction de 2 log correspond à l'obtention d'une RCyC, et un ratio de 0,1 % IS qui correspond à une décroissance de 3 Log, définit la valeur maximale de la RMM.

La puissance de l'outil (RQ-PCR) a permis de proposer de nouvelles limites entre RMM et RMC. Trois niveaux de RMP sont ainsi définis correspondant à des réductions de 4,

4,5 et 5 Log au-dessous de de la ligne de base de l'IS (Cross et al 2012) (figure 22). Cette RMP est considérée comme le principal critère d'éligibilité à plus long terme pour un arrêt de traitement.

L'objectif principal du suivi moléculaire est de participer à la définition de la réponse au traitement par les inhibiteurs *d'ABLI*, jugée optimale lorsque le taux du transcrite BCRABL1 est $\leq 10\%$ à 3 mois (1 log) définissant ainsi la RMP, $\leq 1\%$ à 6 mois (2 log), et $\leq 0.1\%$ à 12 mois (3 log). Ultérieurement, la réponse optimale est définie comme une RMM persistante dans le temps. Ces niveaux de réponses obtenus sont associés avec une meilleure SSP et SG à long terme comparable à celle de la population générale, et indiquent qu'aucun changement de stratégie thérapeutique n'est nécessaire.

Une réponse sub-optimale (situation d'alerte) est définie par un taux du transcrite BCRABL1 $> 10\%$ à 3 mois, compris entre 1 et 10 % à 6 mois, entre 0.1 et 1 % à 12 mois, puis $> 0.1\%$ à n'importe quel moment en cas de traitement deuxième ligne. Ces patients doivent bénéficier d'un suivi moléculaire rapproché pour permettre un changement de traitement rapide en cas d'échec (Baccarani et al, 2013).

L'échec du traitement est défini lorsque le taux du transcrite BCR-ABL1 est $> 10\%$ à 6 mois, $> 1\%$ à 12 mois, ou bien lorsque le patient perd sa RMM à n'importe quel moment.

Le contrôle de l'évolution du ratio BCR-ABL1/ABL1 (exprimé en valeur internationale sur une échelle logarithmique) en fonction du temps (cinétique des transcrits BCR/ABL1) permet d'apprécier mieux l'évolution moléculaire même en cas de RCyC et donne au clinicien la possibilité de pouvoir réagir le plus rapidement possible à une évolution défavorable (rechute moléculaire).

La réponse thérapeutique peut être même évaluée en utilisant uniquement la RQ-PCR dès le début de la thérapie car elle est considérée plus sensible et ne nécessite pas de prélèvement médullaire (Baccarani et al, 2015).

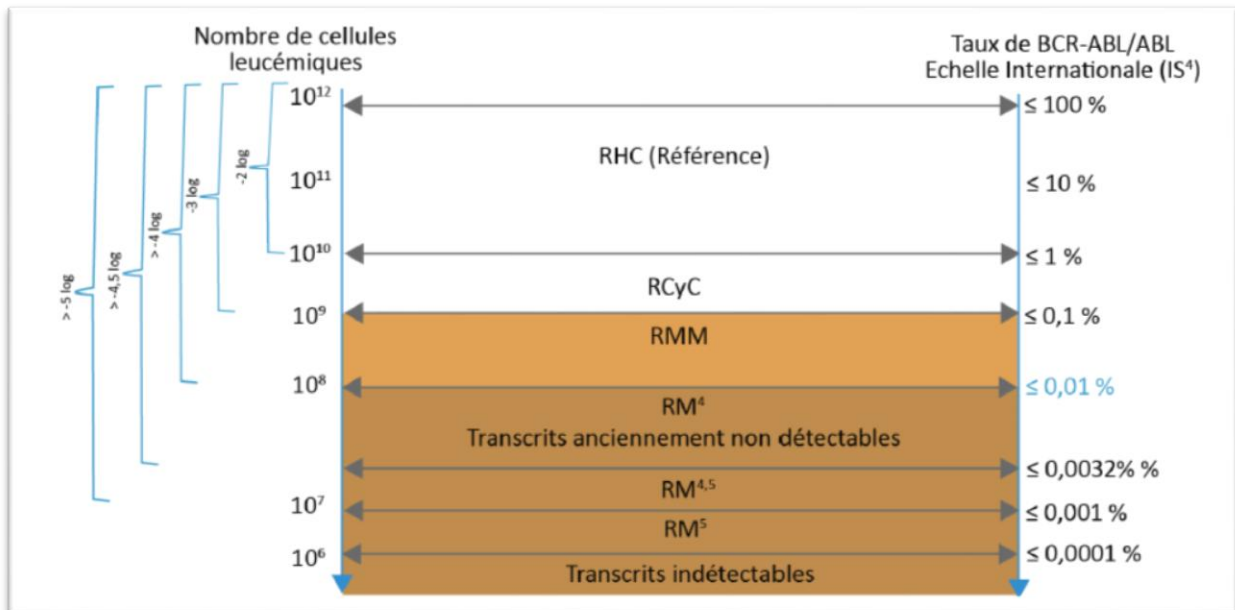


Figure 22: Définition de la réponse moléculaire et corrélation entre la réponse au traitement et le nombre de cellules leucémiques résiduelles (Cross et al, 2012).

L'échelle internationale de mesure des transcrits BCR-ABL1 par RT-PCR quantitative est exprimée en pourcentage et raccordée à deux valeurs de référence : 100% qui correspond à la ligne de base standardisée de l'essai IRIS et 0,1% qui correspond à la limite haute de la RMM. MR4.0 correspond à un BCR-ABL1IS \leq 0,01%, MR4.5 correspond à un BCR-ABL1IS \leq 0,0032%, MR5.0 correspond à un BCR-ABL1IS \leq 0,001%. Les réductions Logarithmiques sont calculées par rapport à la ligne de base de l'essai IRIS et pas par rapport au niveau d'expression avant traitement de chaque patient.

I-5-6-Suivi thérapeutique pharmacologique (STP) de l'IM

Le STP, ou monitoring thérapeutique des médicaments (therapeutic drug monitoring, TDM) vise à mesurer les concentrations sanguines par des méthodes analytiques performantes, fiables et abordables tels que la méthode de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) avec détection par absorption ultraviolette (Widmer et al, 2004), ou bien par une méthode utilisant la spectrométrie de masse en tandem (LCMS/MS), qui permet de doser en multiples tous les ITK (Haouala et al, 2009). Dans la LMC, l'importante variabilité pharmacocinétique inter-individu qui existe, impose un monitoring des concentrations de l'IM ou des autres ITK, d'autant plus que les patients ne sont pas égaux dans leur capacité d'absorber, de distribuer, de métaboliser et d'éliminer ces ITK, et qu'une posologie standard est associée à une dispersion importante des expositions circulantes individuelles (Buclin et

al ,2015). L'objectif donc de ce monitoring est d'une part, connaître la concentration plasmatique résiduelle des patients (la concentration résiduelle cible la plus appropriée pour assurer une bonne efficacité et un risque acceptable de toxicité est de 1000 µg/L), et d'autre part, individualiser en fonction de la concentration trouvée, les posologies, afin d'optimiser l'effet thérapeutique de l'ITK circulant tout en ayant le moins effets toxiques. En effet des relations concentration-effets thérapeutiques ou effets indésirables de l'IM ont été observées in vitro (Weisberg et al ,2007), puis confirmées sur plusieurs études cliniques (Larson et al, 2008, Gott et al , 2013, Gotta al,2014).

Partie Expérimentale

Chapitre IV :
Patients Et Méthodes

I-Patients :

Un total de 31 patients des deux sexes ont été recrutés jusqu'au 23 octobre 2017. Suivis au niveau de service d'hématologie CHU AEK HASSANI sidi bel abbés ou on a effectué notre stage de mémoire, adressés à notre niveau pour une évaluation moléculaire à différents points de leur suivi Moléculaire. Le recrutement des patients atteints de LMC a concerné principalement la région de l'Ouest Algérien.

II- Méthodes :

Une RT-PCR de type Multiplexe est effectuée pour chaque nouveau cas suspect afin de confirmer le diagnostic de LMC et de déterminer l'isotype du transcrite de fusion BCR-ABL1.

Tous les nouveaux patients diagnostiqués ont été régulièrement évalués selon les recommandations du ELN : Tous les trois mois la première année puis tous les 3-6 mois.

L'analyse moléculaire a été réalisée par dosage du transcrite de fusion BCR-ABL1 à partir de prélèvements sanguins par RT-PCR au niveau du service de d'hématologie du CHU de Sidi Bel Abbes.

II--1 Prélèvements sanguins

Le sang utilisés pour effectuer FNS est prélevé sur tube EDTA (Éthylène Diamine Tétracétique). La recherche qualitative des transcrits de fusions BCR-ABL1 sont effectuées sur des prélèvements sanguin (2x5ml) prélevés sur tubes EDTA

- Au diagnostic :

Le premier tube sert à réaliser une FNS pour rechercher la présence d'éventuelles anomalies hématologiques et pour avoir une notion sur le nombre total de globules blancs. La FNS est réalisée au niveau du service d'hématologie sur un compteur automatique de type Coulter "sysmex XT-2000i».

* Le deuxième tube sert à réaliser RT-PCR

- Au suivi :

- * Une NFS est réalisée afin d'évaluer la réponse hématologique.
- * Une extraction pour la réalisation d'une RT-PCR.

II-2- Examen biologique :**II-2-1 Hémogramme et frottis sanguin :**

Une centrifugation d'un échantillon du sang est effectuée, on note la formation d'une couche leucocytaire épaisse qui traduit une augmentation considérable de la fraction des globules blancs dans le sang du sujet atteint de la LMC par rapport au sang d'un sujet normal

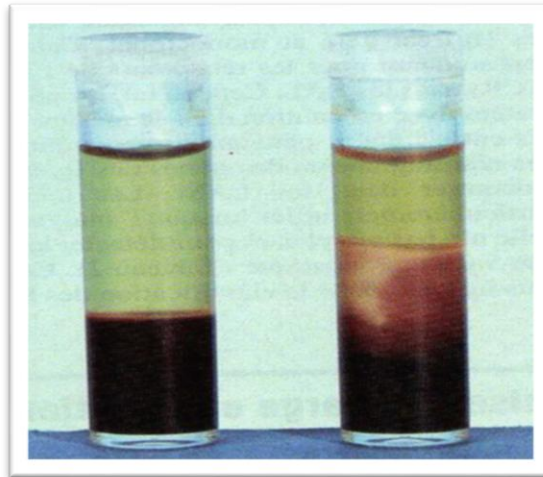


Figure 23: Echantillons de sang : à gauche : sujet normal. A droite : sujet atteint de LMC

L'hémogramme est l'examen clé, car il permet à lui seul d'évoquer le diagnostic de la LMC. Il se fait sur un échantillon de sang prélevé par ponction veineuse et recueilli dans un tube EDTA. Il est réalisé par un automate d'hémogramme (sysmr XT-2000i)(figure24) et complété par un frottis sanguin coloré au May-Grünwald-Giemsa (MGG).



Figure 24: Automate de FNS (sysmes -XT-2000i)

-Frottis sanguin « FSP » :

Un frottis sanguin est du sang étalé sur une lame de microscope, dans le but d'observer ses cellules et aussi les dénombrer. Le frottis doit subir une coloration pour révéler certaines cellules qui sans cela seraient transparentes, donc non visibles. Il permet également de repérer un éventuel parasite dans le sang comme l'agent du paludisme, le *Plasmodium falciparum* .

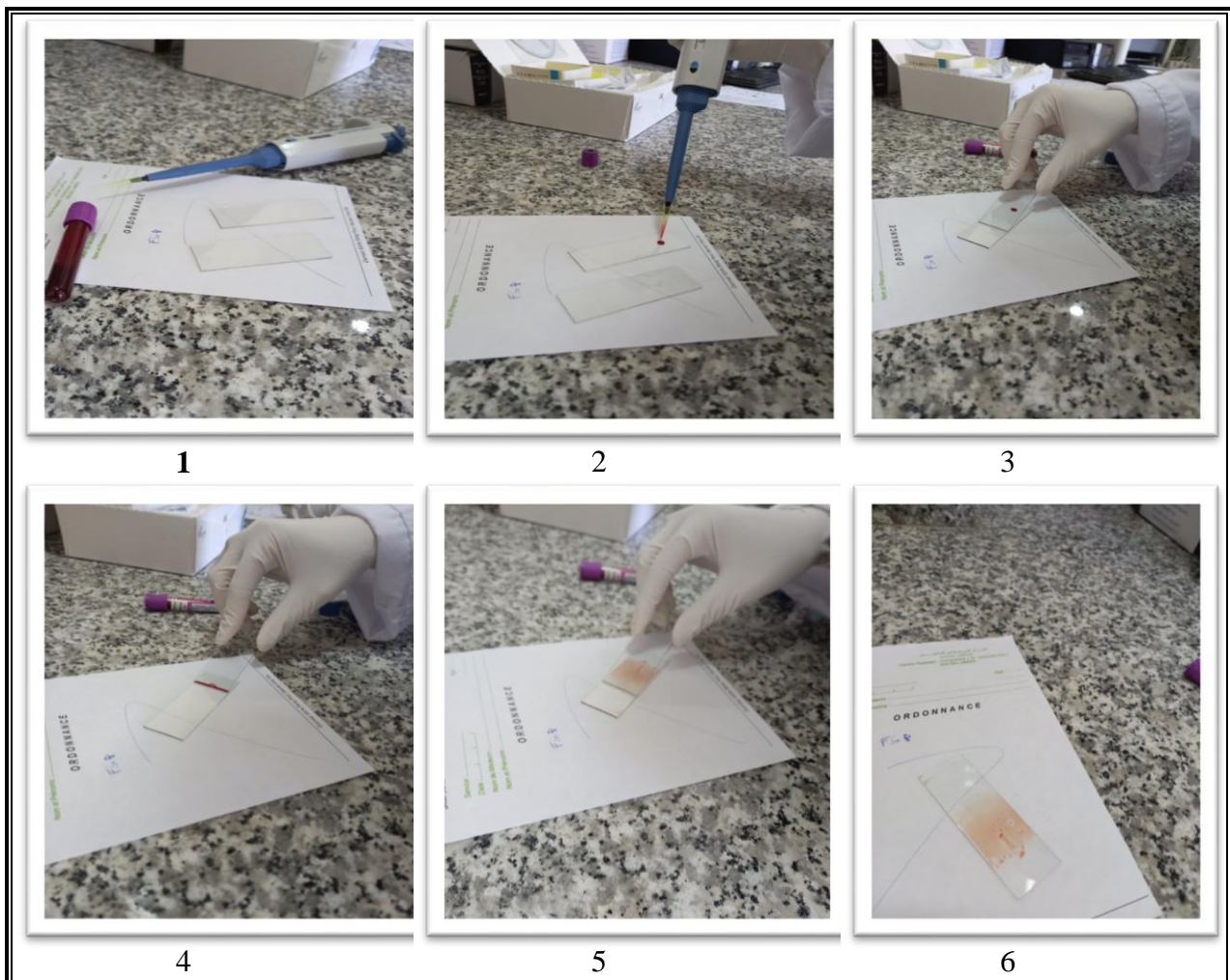
Étaler une goutte de sang uniformément sur une lame de verre, de manière à obtenir une seule couche de cellules. Après coloration et fixation, on pourra effectuer l'étude morphologique des éléments figurés du sang, et déterminer s'il y a anomalies de présence, d'aspect ou de nombre de cellules.

-Matériels utilisés :

- Lames hématologique propre.
- Lamelle pour étaler.

-Technique :

- Marquer la lame de verre (environ 2×5 cm)
- Déposer une petite goutte de sang à 1 cm du bord de la lame, à l'aide d'un tube capillaire
- Placer le bord de l'étalement en contact avec la lame, puis entrer en contact avec la goutte de sang (incliner l'étalement à 45°)
- Laisser le sang s'étaler le long de l'arête de l'étalement
- Pousser l'étalement rapidement, régulièrement, et sans trop appuyer, tout en gardant la même inclinaison
- Soulever progressivement l'étalement, en fin d'étalement. Le frottis doit s'arrêter à environ 1 ou 2 cm de l'autre extrémité de la lame.
- Sécher immédiatement le frottis, par agitation à l'air.

**Figure 25 :** Les étapes de réalisation d'un frottis sanguin

➤ **Coloration « MGG » :**

Il repose sur l'action combinée de deux colorants neutres :

- Le May-Grunwald, contenant un colorant acide, l'éosine, et un colorant basique, le bleu de méthylène.
- Le Giemsa, contenant lui aussi de l'éosine, et un colorant basique, l'azur de méthylène

Ces deux colorants sont en solution dans l'alcool méthylique sous forme inactive. Lors de l'addition d'eau, les sels précipitent (éosinate de méthylène et azur de méthylène) et se fixent sélectivement sur les constituants cellulaires.

- Les constituants cellulaires acides, fixeront électivement les colorants basiques. Ces éléments sont qualifiés de basophiles (ADN, cytoplasme des lymphocytes riche en ARN).
- Les constituants cellulaires basiques, fixeront électivement les colorants acides. Ces éléments sont qualifiés d'acidophiles ou d'éosinophiles (cas de l'hémoglobine, protéine basique contenue dans les hématies et des granulations des granulocytes éosinophiles).
- Les constituants fixant les deux types de colorants sont dits neutrophiles.

➤ **Technique de coloration :**

Le mode opératoire ci-dessous est donné à titre indicatif. Il doit être adapté selon les spécifications du fabricant.

➤ **Fixation**

Il faut d'abord fixer les cellules sanguines présentes sur le frottis. Pour cela placer le frottis horizontalement dans une boîte de coloration et verser 15 à 20 gouttes de colorant May-Grünwald de façon à recouvrir totalement la lame. Attendre 2 à 3 minutes pour que le méthanol fixe les cellules.

➤ **Coloration May-Grunwald**

Ajouter autant d'eau neutre qu'il y a eu de colorant, laisser agir deux minutes et rincer la lame à l'eau neutre.

➤ **Coloration au Giemsa**

Diluer le Giemsa immédiatement avant l'utilisation en mettant 20 ml d'eau neutre avec 30 gouttes de colorant dans une éprouvette. Verser le Contenu dans une boîte de Laveran dès que la lame est prête et mélanger en agitant doucement (le pouvoir du colorant est maximal au moment du mélange). Poser la lame, face frottis vers le fond de la boîte de Laveran. Laisser agir 20 min. et rincer à l'eau neutre.

➤ **Séchage**

Laisser la lame sécher à l'air. Attendre le séchage complet avant observation au microscope.

➤ **Résultat :**

- Les noyaux sont de bleu à violet-noir
- Les hématies sont beige-rosé,
- les granulations des granulocytes éosinophiles sont orangées.
- Les granulations des granulocytes neutrophiles sont violet-lilas.
- Les granulations des granulocytes basophiles sont bleu-noir
- Les granulations des grands lymphocytes sont pourpres.

I-2-2- Myélogramme :

➤ **Prélèvement :**

La ponction de moelle osseuse est effectuée au niveau du manubrium sternal ou des épines iliaques si le sternum est contre indiqué. Le prélèvement est étalé sur lames (frottis médullaire), coloré au May-Grünwald Giemsa puis observé au microscopique (Société Française d'Hématologie ; 2003)

➤ **Résultat**

Le syndrome myéloprolifératif est affirmé par une moelle très dense à cause de sa richesse en cellules qui prennent la forme d'une nappe cellulaire.

La LMC est confirmée par une moelle qui comporte plus de 80 % des cellules appartenant à la lignée granuleuse, sans hiatus de maturation avec une prédominance de cellules à noyaux non segmentés: promyélocytes, myéloblastes, éosinophiles immatures et micromégacaryocytes.

Les éosinophiles et les basophiles mûrs sont souvent augmentés en nombre. La lignée rouge est souvent relativement éparsée, l'érythroblastopénie est généralement inférieure à 10 %. Les mégacaryocytes sont augmentés et dystrophiques parfois sous la forme de microcaryocytes avec seulement un à deux noyaux à peine plus grands que ceux des promyélocytes ; leur cytoplasme renferme des granulations nuageuses typiques comme au cours de leur maturation normale. Dans 30 % des cas, Les histiocytes peuvent stocker des glucocébroside, rappelant l'aspect de cellules de surcharge, ou des lipides sous forme de précipitation bleu de mer d'où l'appellation histiocytes bleu-mer ou pseudo-Gaucher. La blastose médullaire est inférieure à 10 % dans la phase chronique. (Leguay, 2005, Harald, 2006).

Dans la phase blastique à transformation myéloïde, la blastose médullaire est supérieure à 20 %. Une myélofibrose peut s'installer, ce qui rend difficile l'aspiration de la moelle osseuse lors de la réalisation du myélogramme. Aussi, une dysgranulopoïèse est possible, notamment une hyposégmentation du noyau des granulocytes : anomalie « pseudo Pelger-Huët » liée à la présence d'un isochromosome 17q qui est une anomalie chromosomique additionnelle de la LMC.

Dans le cas de la transformation lymphoblastique, la blastose médullaire est souvent massive (supérieure à 80 %), l'excès de granulocytes basophiles n'est pas toujours retrouvé et la dysgranulopoïèse est absente (La Faculté de Médecine de Angers).

I-2-3- Examen moléculaire

Analyse de RT-PCR ou BCR-ABL

La recherche de l'anomalie BCR-ABL permet de détecter le chromosome Philadelphie (Ph) et la séquence du gène bcr-abl. Elle est utilisée pour aider à diagnostiquer la leucémie

myéloïde chronique (LMC) et un type de leucémie aigüe lymphoblastique (LAL) dans lesquels on retrouve la séquence du gène bcr-abl (BCR-ABL positive), mais aussi pour évaluer la réponse au traitement, ou détecter des mutations conférant une résistance au traitement, et pour surveiller une réapparition de la maladie.

La recherche BCR-ABL qualitative peut aussi aider à déterminer les variantes de l'anomalie BCR-ABL produits. La taille et le poids de la protéine BCR-ABL produite dépend de l'endroit où la cassure s'est produite sur le chromosome 22.

Dans la cadre du suivie moléculaire, système d'instruments Gene Xpert® de Cepheid qui contient les réactifs de la RT ont été utilisé (figure 27)



Figure 26 : Les systèmes d'instruments GeneXpert Dx

- Matériels et réactifs (figure 28)

✓ **Matériels**

- Gants à usage unique.
- 2 tubes secs (Flacon de 50)
- Pipette (100µl, 500µl, 1000µl).

- Appareil Gene Xpert (Cepheid), ordinateur personnel, lecteur de code-barres, vortex mixer SA3, et un logiciel préinstallé pour effectuer des tests sur des échantillons prélevés avec affichage des résultats.

✓ **Réactifs**

- PK (Protéinase K).
- La lyse (lysisRgt).
- Ethanol.
- Tampon de lavage (WashRgt).

➤ **Procédure de protocole**

Le protocole adopté dans l'application de ce test, s'opère en les étapes suivantes :

- 100 microlitres de protéinase K ont été mis dans un flacon de 50 ml.
- Ajout de 4 ml de sang total après avoir inversé le tube de sang à EDTA dix fois.
- Une agitation (Vortex) de l'ensemble a été appliquée suivie par une incubation d'une minute à température ambiante.
- l'addition de 2.5 ml de réactif de lyse a été accompagnée par deux agitations successives de 10 secondes avec un temps d'incubation de 5 min chacune.
- 1ml du lysat a été transféré dans un nouveau flacon de 50 ml et additionné de 1,5 ml de tampon de lyse.
- Après 10 min d'incubation à température ambiante, une agitation de 10 secondes a été réalisée suivie d'une autre de 19 secondes.
- l'ajout de 2 ml d'éthanol.
- Un tampon de lavage ainsi que la totalité du lysat ont été ajoutés respectivement dans les ouvertures 1 et S.
- la cartouche a été mise en place dans l'appareil après avoir scanné son code barre.



Cartouche.



PK (Protéinase K).



La lyse



Ethanol



Tampon de Lavage.

Figure27 : les reactifs utilisés dans la RT-PCR

➤ **Technique :**

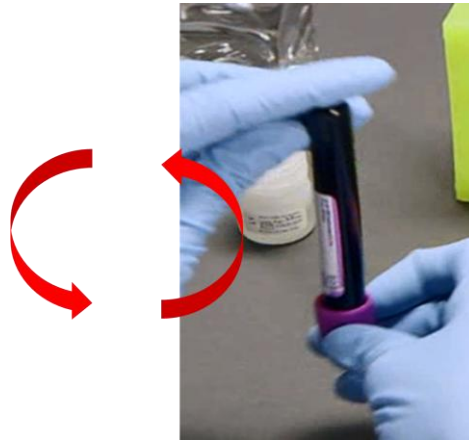
Étape 1:

Ajouter 100 μ L de proteinase K dans le falcon de 50 ml.



Etape 2:

Inverser le tube de sang EDTA 10 x



Etape 3:

- Ajouter 4ml de sang total au flacon



Étape 4:

- vortexer 10 sec Incuber 1min à RT



Étape 5:

- Ajouter 2.5 mL réactif de lyse
- Vortexer 10 sec; incuber 5min
- 2nd vortex10 sec; incuber 5min



Etape 6:

- Transférer 1 mL du lysat dans un nouveau falcon de 50 ml



Etape 7:

- Ajouter 1.5ml de tampon de lyse
 - Vortexer 10 s
 - Incuber 10 min à RT



Etape 8:

- Ajouter 2ml d'éthanol
- Vortexer 10 sec



Etape 9:

- Ajouter le tampon de lavage dans l'ouverture 1



Etape 10:

- Ajouter la totalité du lysat dans l'ouverture S



Etape 11:

- Scanner le code-barres de la cartouc



Etape 12:

- Placer la cartouche dans le GX et fermer la porte

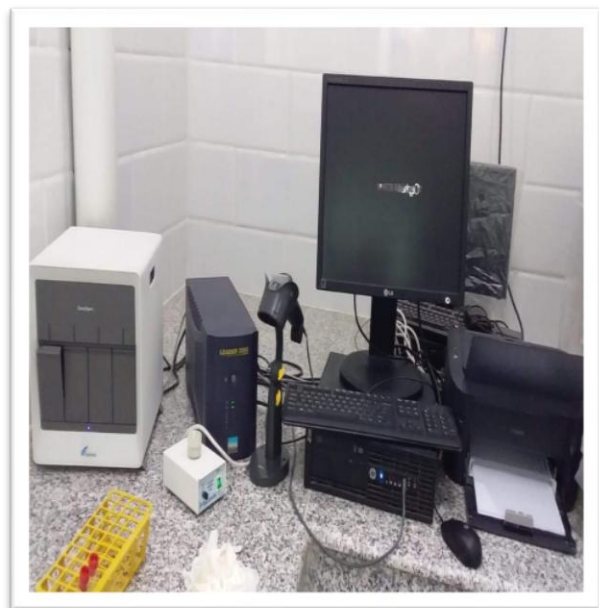


Figure 28:L'appareil de RT-PCR

I-2-4-Analyses Statistique

✓ **Traitement des données:**

Les données seront saisies sur un support informatique utilisant le logiciel SPSS, après un codage préalable des variables. Les différents tests statistiques sont effectués par le logiciel SPSS. Les représentations graphiques de la RMM à 12 et 18 Mois en fonction des réponses précoces à 3 et 6 mois sont réalisées par le logiciel Origin.

✓ **Tests statistiques utilisés**

L'étude descriptive des données a concerné les variables suivantes :

- Variable qualitative: Le sexe, le type de transcrit, les scores pronostics Sokal, la réponse optimale, la RMM, la RMP, l'échec,
- Variable quantitative : détermination de la moyenne, médiane, écart type et des extrêmes de l'âge, des paramètres hématologiques (nombre de GB, nombre de plaquettes et l'Hb), de la taille de la rate en cm, et des ratios BCR-ABL1 à 3,6, 9,12 ,18mois et plus.
- Une Analyse bi-variée est effectuée à la recherche d'association possible entre la RMM ou l'échec (variable dépendante à expliquer) et d'autres variables indépendantes explicatives tels que : le sexe, le type de transcrit, les scores pronostic et les réponses moléculaires précoces 3 et 6 mois.
- Les tests d'indépendance entre variables qualitatives ont été réalisés à l'aide du test exact de Fisher ou du test du χ^2 .
- Le test de *STUDENT* pour deux échantillons indépendants est utilisé pour la comparaison de deux moyennes (variables quantitatives continues).
- Le test de corrélation de PEARSON r est utilisé pour estimer la relation entre deux variables quantitatives. Une relation est considérée comme significative pour un seuil $p < 0,05$.

RESULTATS

Résultats :

31 patients sont adressés pour confirmation diagnostique de LMC et suivis au niveau de service d'hématologie CHU Hassani Abd El Kader de Sidi Bel Abbès, adressés pour une évaluation moléculaire à différents points de leur suivi moléculaire. Le recrutement des patients atteints de LMC a concerné principalement la région de l'Ouest Algérien.

1 -Résultats de l'étude moléculaire au diagnostique

Tous les patients inclus dans notre étude ont bénéficié d'une RT-PCR qualitative multiplex. Il s'agit de 10 hommes (32,3 %) et 21 femmes (67,7 %), d'âge moyen 49,71 [31-72]. 28 patients étaient en phase chronique (90,3%), 3 en phase d'accélération (9,7%) (figure 30)

Sur les 32 recherches de transcrits BCR-ABL1, le transcrit de fusion a pu être identifié.

Il s'agit de:

Transcrit majeur de type b3a2(Mb3a2) identifié chez tous les patients (100 %),

Les caractéristiques et les résultats de l'application de la RT-PCR qualitative multiplexe chez ces patients sont résumés dans le tableau10 :

Tableau10: Caractéristiques des patients et résultats de leur typage par la RT-PCR qualitative multiplex

	Variables	Patients LMC
Effectif patients	N	31
Sexe	F/M	21/10
	Sexe ratio (h/f)	0,5
Age (ans)	Médiane	51
	[Intervalle]	[31-72]
LMC-PC	n(%)	28 (90,3%)
LMC-PA	n(%)	3 (9,7%)
LMC-PB	n(%)	0 (0%)
Transcrit non détectable	n(%)	0%
Transcrit détectable	n(%)	100%

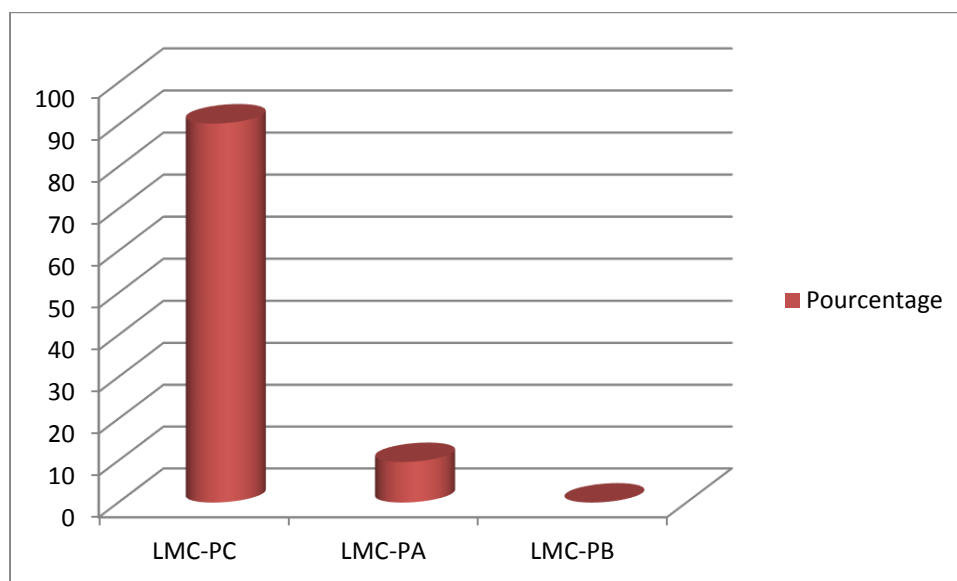


Figure 29 : résultats de typage par la RT-PCR qualitative multiplex

2- Caractéristiques clinico-biologiques au moment du diagnostic

Les 31 patients ont été diagnostiqués pour une LMC typique, d'âge moyen $49,71 \pm 11,62$. Il s'agit de 10 hommes (32,3%) et 21 femmes (67,7%) avec un sexe ratio (H/F) de 0,5. L'âge médian au moment du diagnostic est de 51 ans [31-72]. 28 patients étaient en phase chronique (90,3%), trois en phase d'accélération (9,7%) et aucun patient en phase blastique.

L'hémogramme réalisé au moment du diagnostic montre des résultats pathologiques dans 100 %.(tableau11)

Le nombre de leucocytes est le paramètre qui est le plus souvent perturbé : L'hyperleucocytose (augmentation des GB) est observée chez 31 patients (100 %), avec un intervalle allant de $23600-790000 \text{ mm}^3$.

Le nombre des plaquettes est perturbé chez 21/31 (67,7%) patients avec une thrombocytose retrouvée dans 90,47 % des cas allant jusqu'à $1255 \cdot 10^9/\text{L}$ et une thrombopénie dans 9,59% des cas.

L'anémie est observée dans 80,64 % des cas avec un intervalle du taux d'Hb allant de 6,9-14g/dl.

La myélémie est retrouvée chez tous les patients (100 %) des patients avec des extrêmes allant de 13 à 70 %. La SPMG qui est un signe clinique fréquent et qui fait partie de l'évaluation hématologique, est retrouvé chez 17 patients (54,83%) avec un débord splénique allant de 0-20 cm.

Un score de Sokal élevé a été noté chez 13 patients (41,93%), intermédiaire chez 16

(51,61%) et faible chez 2 patients (6,45 %).

L'ensemble de ces résultats sont rapportés dans le tableau.

Tableau11: Caractéristiques épidémiologiques et cliniques des patients LMC

	Variables	Patients LMC
Effectif patients	N	31
Leucocytes (mm ³)	Médiane [Intervalle]	147600 [23600-790000]
Hémoglobine (g/dl)	Médiane [Intervalle]	10 [6,9-14]
Plaquettes (10 ^{9/L})	Médiane [Intervalle]	519000 [37000-1255000]
myélocémie	Nombre %	31 100
DS (cm)	Présente (n/%) [Intervalle]	54,83 [0-20]
Score sokal	Faible (n/%) Intermédiaire (n/%) Elevé (n/%)	41,93 51,61 6,45

3-Type du transcrite BCR-ABL1 des patients diagnostiqués :

Le type de transcrits détectés chez les 31 patients sont représentés dans le tableau.

Au total, l'étude moléculaire par RT-PCR multiplex a montré les résultats suivants :

□ Tout les patients le transcrite de fusion BCR-ABL a pu être détecté, et ils ont présenté le transcrite majeur dont le type b3a2 à 100% (tableau10).

4-Résultats de l'évaluation moléculaire

Une évaluation moléculaire a été effectuée chez 31 patients à différents points de leur suivi moléculaire.

En réponse optimale au traitement (n=10)(41.9%) , défini par une diminution du taux de BCRABL1 \leq 10% à trois mois, \leq 1% à six mois, et \leq 0.1 % à douze mois,(figure31)

En réponse sub optimale (n=9) (54.8%), défini par un taux de BCR-ABL1 \geq 10% à trois mois, entre 1-10 % à six mois, et 0.1-1 % à douze mois, (figure32)

En échec thérapeutique (n=9)(29%), défini par un taux de BCR-ABL1 $>$ 10% à six mois, $>$ 1% à douze mois puis par perte de la réponse moléculaire à tout moment,(figure33)

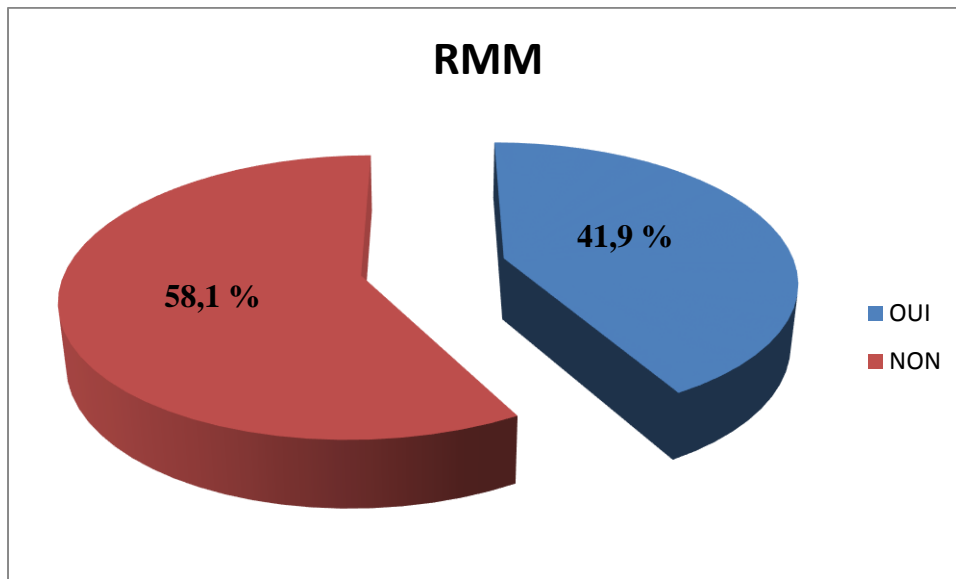


Figure 30 : Répartition des patients LMC selon la réponse Moléculaire Majeure

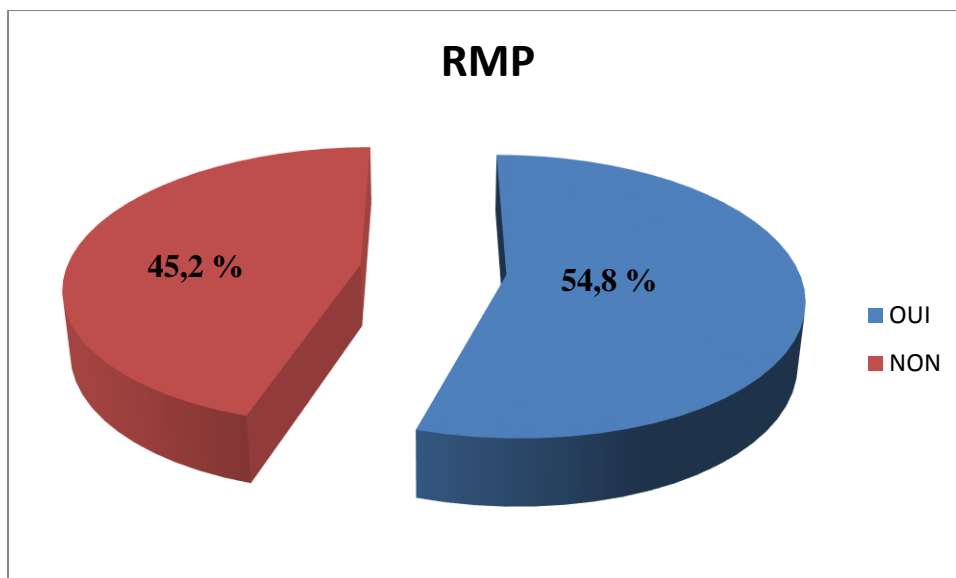


Figure 31 : Répartition des patients LMC selon la réponse Moléculaire Primordial

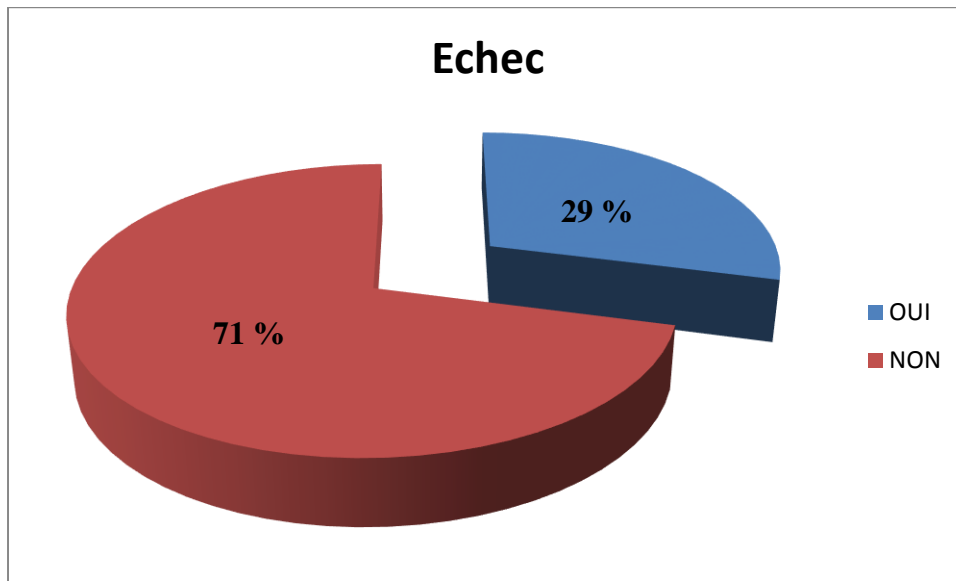


Figure 32 : Répartition des patients LMC selon l'échec

5-Résultats de la quantification et cinétique du transcrit BCR-ABL1

Le résultat du dosage est exprimé en pourcentage sur l'échelle internationale.

➤ **Au diagnostic**

Le rapport médian BCR-ABL1/ABL1 était de 46% [12-100].

➤ **Au cours du suivi moléculaire**

La décroissance du ratio BCR-ABL1/ABL1 se fait de façon très significative, il passe d'une médiane de 46 IS au diagnostic à une médiane de 3,45 IS après seulement 3 mois de suivi ($p < 0.0001$), puis à une médiane de 0,067 IS après 12 mois de traitement ($p < 0.0001$) pour atteindre ensuite un taux médian de 0,01 pour 18 mois ($p < 0.0001$)(tableau12)(figure34).

Tableau 12 : Ratio BCR-ABL1 au cours du suivi moléculaire

	RatioDg	Ratio3M	Ratio6M	Ratio9M	Ratio12M	Ratio18M
Effectif	31	12	29	6	28	14
Moyenne	47,16	5,93	2,34	10,91	1,59	0,96
Médiane	46	3,45	0,37	0,66	0,067	0,01
Ecart-Type	24,41	5,47	5,35	17,75	4,32	3,19
[Intervalle]	12-100	0,66-19	0,00028-23	0,077-43	0,0002-18	0,00021-12

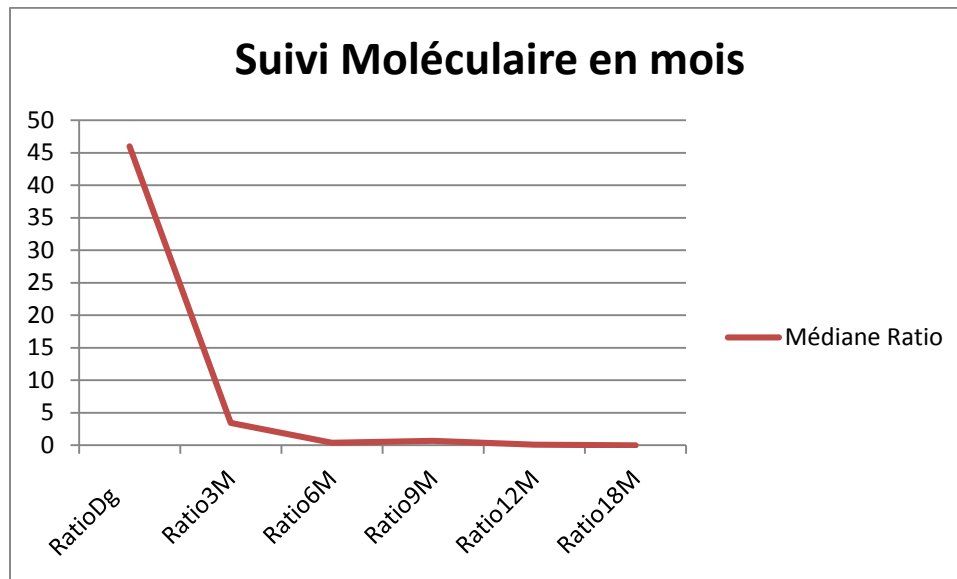


Figure 33 : Cinétique de décroissance du transcrite BCR-ABL1 au cours du temps

6-Les déterminants de la RMM

➤ Le sexe

Concernant le taux de RMM, un léger avantage est donné au sexe féminin mais la différence n'est pas statistiquement significative ($P= 0,55$).

➤ L'âge

L'âge ne semble avoir d'influence significative ni sur le taux de RMM ($P= 0,98$).

➤ Type de transcrite majeur

Le transcrite b3a2 semble avoir des meilleurs réponses moléculaires.

➤ Score pronostic Sokal

Un score de Sokal faible semble avoir une influence négative sur la RMM ($p=0.74$).

Les patients qui ont un score élevé, ont 5 fois plus de risque de ne pas obtenir une RMM

➤ Les réponses moléculaires précoces à 3 et 6 mois

Les RMM étaient significativement plus élevées respectivement chez les patients qui avaient un faible niveau ($\leq 10\%$) à 3 mois (83,33% VS 19 % ; $p<0.0001$) ou à 6 mois ($\leq 1\%$) (68,96% VS 28 % ($p<0.0001$)).

Parmi les patients qui n'ont pas atteint une réduction de 1 log $_{10}$ à 3 mois (2/11) (16,67%), seul 1 (3,22%) a réussi à obtenir une RMM à 18 mois ($p<0.0001$), et un patient a échoué

Par contre ceux qui avaient un taux $> 10\%$ à 6 mois n'ont pas pu obtenir une RMM au bout des 18 premiers mois, alors que parmi les 20 patients qui avaient un taux compris entre 1-10%, 9 ont pu l'obtenir (31,04 %) ($p < 0.0001$).

Analyse multi variée de la RMM

Dans l'analyse multi variée, nous avons inclus tous les facteurs statistiquement significatifs ou ayant un seuil de signification de 20 % lors de l'analyse uni-variée.

Au total quatre variables ont été étudiées pour identifier les facteurs prédictifs essentiels de la RMM: le sexe ($p=0.30$), le score pronostic de sokal ($p=0.87$), et les niveaux du taux de transcrit BCR-ABL à 3 et 6 mois ($p < 10^{-3}$).

Dans le modèle de régression logistique seul le niveau d'expression du transcrit BCR-ABL à 3 mois est significativement associé à la RMM ($p=0.005$)

Discussion

Discussion

Les méthodes actuelles de diagnostic de la LMC et d'évaluation de la réponse moléculaire au traitement sont basées sur la recherche qualitative de transcrite de fusion BCR-ABL1 par la RT-PCR qualitative notamment de type multiplex.

Cette technique a été implantée au niveau du service d'Hématologie du CHU de SBA et a permis de :

- ✓ Confirmer le diagnostic moléculaire de la LMC,
- ✓ Identifier les différents transcrits de fusion BCR-ABL1 chez les nouveaux cas diagnostiqués et chez les deux tiers des anciens patients,
- ✓ Effectuer une évaluation moléculaire de ces patients,
- ✓ Détecter les résistances primaires à l'IM et les pertes de réponses moléculaires,
- ✓ Réévaluer les patients après un changement thérapeutique.

La recherche du transcrite par la RT-PCR qualitative multiplexe a concerné 31 patients dans le cadre de leur suivi.

La RT-PCR est l'une des techniques les plus sensibles pour détecter les transcrits BCR-ABL1 associés à la LMC. Une RT-PCR conventionnelle peut être utilisée, cependant elle peut rendre un résultat faussement négatif lorsqu'il s'agit d'un transcrite atypique, ou ne pas détecter les co-expressions complexes, car son protocole n'utilise que trois réactions distinctes : une pour b3a2 et b2a2, une seconde pour e1a2 et une troisième pour c3a2 (ou e19a2). En revanche, la RT-PCR multiplexe qui est une méthode plus rapide et plus précise pour identifier grâce à l'utilisation dans une même réaction, de plusieurs couples d'amorces spécifiques, les différents variants de BCR-ABL1. En effet, plusieurs études ont démontré l'intérêt de son utilisation dans la détermination des iso-formes moléculaires.

Une étude coréenne (Goh et al., 2006) réalisée sur 548 patients et qui a comparé les résultats de son application et ceux de la RT-PCR Multiplexe, avait trouvé les mêmes types de transcrits dans les deux techniques sauf pour un patient où la RT-PCR conventionnelle a rendu un résultat négatif car aucun transcrite n'a été détecté alors que la RT-PCR multiplexe a pu le détecter comme étant un transcrite atypique de type e1a3. Plusieurs études portant sur des groupes ethniques différents ont pu détecter en utilisant la RT-PCR multiplexe des transcrits BCR-ABL1 atypiques impliquant différentes parties d'exons de BCR et ABL1 tels que e1a3,

e2a1, e6a2, e8a2, e13a3 (ou b2a3) et e14a3 (ou b3a3) (Jinawath et al., 2009, Cayuela et al., 2005)

Une RT-PCR multiplexe a d'abord été pratiquée chez ces patients afin de vérifier l'informativité du type de transcrit. Cet examen, a montré tout son intérêt dans le typage moléculaire chez ces patients traités dont le diagnostic n'a été posé que sur des arguments cliniques et hématologiques. En effet, dans cette série de patients, l'iso type moléculaire a pu être identifié chez tous les patients (100%) un transcrit majeur de type b3a2.

L'identification des transcrits BCR-ABL1 n'a pas montré une concordance de résultats positifs.

Cependant des points de discordance ont été notés pour lesquels la RT-PCR multiplexe qualitative a donné des résultats faux négatifs. Chez ces patients sous traitement, il est envisageable que la durée de leur traitement ait induit une réponse suffisante pour abaisser le niveau d'expression des transcrits BCR-ABL1 en dessous du seuil de détection de la méthode. En effet, leur quantification par le kit (ipsogen BCR-ABL1 Mbc IS-MMR) a montré que leur transcrit majeur a bien été détecté.

Dans cette série, le diagnostic a été confirmé chez tous les patients ayant présenté une LMC typique de Novo. Des études effectuées ont montré que la LMC touche préférentiellement l'homme, avec un sexe ratio de 1,3 (Bennett JH).

Dans notre étude, une légère prédominance féminine a été notée, nous avons 67,7 % (n=21) des cas de sexe féminin, contre 32,3% (n=10) des cas de sexe masculin, soit un sex-ratio (H/F) de 0,5, ce qui n'est pas similaire à celui retrouvé dans l'étude nationale qui a concerné 1007 cas de LMC (de 2007-2013) (Huet et al, 2015). L'âge médian au moment du diagnostic est de 51 ans (Druker et al., 2001 ; Hasford et al., 1998) ce qui rejoint la littérature (Castagnetti et al., 2015).

Le transcrit de fusion BCR-ABL1 détecté chez ces patients est de type : b3a2 chez tous les patients (100%).

Très peu de données sont disponibles sur la réponse aux ITK. Seule une quinzaine de cas rapportés décrivent des évolutions variables sous IM, avec chez certains patients l'émergence de mutations du domaine kinase de BCRABL1 répondant pour la majorité aux ITK2 (Gendron, 2014).

L'incidence des différents transcrits varie d'une région à une autre. Nos résultats ont été comparés à ceux de la littérature où plusieurs groupes d'études ont rapporté, des Fréquences variables des transcrits b3a2, b2a2, e19a2, de co-expression complexes et aussi d'autres transcrits atypiques (tableau 13).

Tableau 13: Fréquences des différents variant du transcrit BCR-ABL1 retrouvées dans différentes études.

Population	Auteurs/Année	n	b3a2	b2a2	e19a2	e1a2	B3a2/ b2a2	Autres transcrits
Corée	Goh et al (163); 200	548	67.6	32.34	0.72	0.18	0.36	b2a3 et e1a3 (0.2%)
Algérie (Centre)	Harieche F (168);2008	87	54	44.60	-	-	1.20	-
Tunisie	Menif et al (169)2005	70	50	47	-	-	3	-
Tunisie	Bennour et al (170);2013	44	63.6	36.36	-	-	-	-
Iran	Ghavamzad et al (171);2008	75	63	20	4	1	-	b3a3/b2a3 b3a3/b2a2
Syrian	Walid Al-Achkar et al, (172); 2016	45	51.1	46.7	-	-	-	B2a3
Inde	Deb et al (173);2014	80	56.2	41.25	2.5	-	-	-
Germany	Hanfstein et al (174) ; 2014	1105	45	41	0.0054	0.0027	14	B2a3 et b3a3
Italy	Castagnetti et al (175); 2017	559	52	36	0.0071	0.0017	11	-
Syrian	Farhat-Maghribi et al (176);2016	21	14.3	57.1	-	-	-	B3a3; e1a3 b3a2/b3a3, b2a2/e1a3
Mexique	Arana-Trejo et al	250	35	48	2	-	7	e19a2/b3a2, e1a2/b3a2/b2a2, e1a2/b2a2/e19a2
Soudan	Osman et al (178); 2010	43	41.9	53.5	-	-	2.3	b2a2/b3a2/e19a2
Equator	Paz-y-Miño et al (179); 2002	40	5.4	94.6	-	-	-	-

OuestAlgérien	Notre étude; 2017	89	58	39	2	-	-	-
---------------	----------------------	----	----	----	---	---	---	---

L'étude de Harieche (Travail de thèse de DESM-2008), qui a concerné 87 patients algériens (7enfants et 80 adultes) atteints de LMC, a retrouvé des taux de 54, 44.60 et 1.20% respectivement pour les transcrits b3a2, b2a2 et de co-expression b3a2/b2a2 (Harieche ,2008). Deux études tunisiennes ont rapporté deux résultats contradictoires. Dans une étude réalisée sur 70 patients tunisiens atteints de LMC, Ménif et al (Menif , 2005), ont trouvé des taux de 50, 47 et 3 % respectivement pour b3a2, b2a2 et de co-expression b3a2/b2a2, alors que l'étude de Bennour et al(Bennour et al ;2013) , réalisée sur 44 patients a trouvé un taux de b3a2 (63,63%) deux fois plus élevé que celui de b2a2 (36,36%).

Dans les pays d'Extrême-Orient, les fréquences retrouvés sont presque similaires avec la aussi, une incidence des transcrits b3a2 plus élevée que celle des transcrits b2a2 (Goh al.,2006 ;Ghavamzadeh et al .,2008 ;Deb et al ., 2014). Des chiffres relativement proches ont été aussi retrouvés dans des études portant sur des populations européennes (Hanfstein et al ., 2014 ; Castagnetti et al ., 2017). Paradoxalement, dans certaines populations, l'incidence des transcrits b2a2 s'est avérée plus élevée que b3a2 avec des fréquences variables: Syrienne (57,1 vs 14,3%) [Farhat et al; 2016(Farhat et al, 2016)], Mexicaine (48 vs 35 %) [Arana et al; 2002(Arana et al, 2002)], Soudanaise (53.5 vs 41.9%) [Osman et al; 2010(Osman et al, 2010)] et équatorienne avec une différence très significative (95 VS 5 %) (p= 0.01) [Paz-y-Miño et al; 2002(Paz-y-Miño et al, 2002)].

Les différences de fréquence des réarrangements b3a2 et b2a2 observées dans ces différentes études, pourraient avoir une raison de différences géographiques et ethniques.

Les facteurs environnementaux de chaque population peuvent aussi être incriminés. La supériorité du transcrit b2a2 observé pourrait être due probablement à un profil génétique différent chez ces populations par rapport aux autres.

Trente-un (31) patients diagnostiqués à notre niveau et mis sous ITK comme traitement de première intention, ont bénéficié d'un suivi moléculaire régulier tous les trois mois durant la première année puis tous les 3 à 6 mois. Afin d'assurer une meilleure sensibilité, toutes les mesures ont été réalisées en double pour le gène ABL1, comme recommandé par les sociétés savantes (Cross, 2015 ; Flandrin-Gresta et al ., 2015). Ce suivi moléculaire nous a permis de stratifier ces patients en fonction des définitions de réponse au

traitement de l'ELN (Baccarani et al ., 2013) (Annexe5) et de déceler les patients résistants au traitement initial.

Les dosages en série effectués au cours du suivi moléculaire, démontrent des réductions très significatives du niveau d'expression du transcrite BCR-ABL1 dans le temps ($p < 0.0001$). La décroissance du ratio BCR-ABL1/ABL1 se fait de façon très significative, il passe d'une médiane de 46 IS au diagnostic à une médiane de 3,45 IS après seulement 3 mois de suivi ($p < 0.0001$), puis à une médiane de 0,067 IS après 12 mois de traitement ($p < 0.0001$) pour atteindre ensuite un taux médian de 0,01 pour 18 mois ($p < 0.0001$). Ceci rejoint les résultats de l'essai thérapeutique German CML IV, où on observe également que la médiane est atteinte à 12 mois (Hehlmann et al ., 2014).

Cette réduction rapide et considérable de la charge leucémique est le reflet direct de l'effet anti-tumoral de l'ITK particulièrement chez les patients qui répondent bien.

Une évaluation qualitative de la réponse moléculaire a pu être effectuée pour chaque patient. Le critère de jugement pris en compte dans notre étude était l'obtention d'une RMM. Celle ci a été définie au terme de l'étude IRIS par une réduction de plus de $3 \log_{10}$ du niveau d'expression de BCR-ABL1 par rapport à la valeur théorique de 100% attribuée au diagnostic (Hughes et al ,2006). La RMM à 12 ou 18 mois est utilisée dans les directives de traitement actuelles pour évaluer le pronostic et reste un facteur important pour la prédiction du résultat à long terme du traitement par ITK selon les dernières directives (Baccarani et al .,2013 ; O'Brien et al .,2013 ;Canitrot et al., 2003).

Dans notre étude, l'estimation globale de RMM a concerné tous les patients ayant un taux $\leq 0.1\%$ quelque soit le degré de réduction du transcrite BCR-ABL1.

La fréquence des patients ayant obtenu une réduction d'au moins $3 \log_{10}$ ($\leq 10^{-1}$) définissant ainsi la RMM, a augmenté atteignant des taux de 32,14 et 57,14 %, respectivement à 12, 18. Nous avons comparé nos résultats à ceux de la littérature (Djouadi et al ., 2016 ;Branford et al ; 2003 ;Castagnetti et al ., 2015) (Tableau 14).

Tableau 14: les taux de la RMM retrouvés dans les différentes études.

Etude	n	RMM 12 mois	RMM 18 mois	RMM 24mois
Notre étude	55	52 %	67 %	75 %
Branford et al (IRIS) ;2003	53	50%	64%	72%
Djouadi et al, GATLMC ; 2016	327	55.4%	-	-
Hossam et al; 2008	95	50%	65%	-
Hehlmann et al; LMC IV (2011)	306	44%	-	-
Kantarjian et al; Dasision (2012)	260	28%	38%	46%
Kantarjian et al ; ENESTEnd, (2011)	283	27%	38%	44%
Corte et al 2010, TOPS	157	40%	66%	-
Etienne et al ;2016	705	68 %	78.5%	-
Castagnetti et al ; 2015	559	66 %	-	-

Nos résultats sont particulièrement similaires à ceux retrouvés par Branford et ses collaborateurs avec 50, 64 et 72% de RMM respectivement à 12, 18 et 24 mois (Branford Set al ;2003), et ceux retrouvés dans une autre étude portant sur 95 nouveaux patients Egyptiens avec 50 et 65 % de RMM respectivement à 12 mois et 18 mois et un temps médian d'obtention de la RMM de 12 mois [6-18] (Mahmoud et al .,2009).

Nos résultats sont également comparables à ceux retrouvés dans l'étude réalisée par le GAT-LMC qui a évalué le traitement par IM chez 1007 patients atteints de LMC sur une

période de 07 ans (2007 à 2013). Sur les 327 patients évalués à 12 mois, 181 (55.4%) ont obtenu une RMM (Djouadi et al ., 2016).

L'observation attentive des cinétiques de décroissance chez les patients qui ont obtenu une RMM, a montré comme indiqué dans la littérature (Tang et al .,2012), l'existence de trois pentes de décroissance différentes du transcrite BCR-ABL1 au cours du temps : 1) Une cinétique rapide témoignant d'une évolution optimale avec deux phases, celle de la destruction des cellules leucémiques matures (en moyenne 12 mois) et l'autre à partir de la RM4 qui correspond à la destruction des progéniteurs leucémiques. 2) Une cinétique avec également deux phases mais plus lente.

Due à une destruction lente (généralement au bout de 18 mois) retrouvée chez certains patients qui répondent très lentement. 3) Une cinétique témoignant de l'épuisement à long terme des cellules souches leucémiques.

Cependant, les cinétiques de décroissance des transcrits BCR-ABL1 varient d'un patient à l'autre en fonction de sa réponse au traitement, traduisant ainsi l'hétérogénéité de la maladie. Effectivement, l'étude IRIS avait montré que tous les patients ne répondaient pas de la même façon à l'ITK avec environ 45% de la cohorte initiale (249 sur 553 patients), ont interrompu de manière définitive le traitement pour des raisons d'inefficacité (résistance 16%) ou d'intolérance (6%) (Deininger et al ., 2009). La réponse au traitement n'est donc pas uniforme, ce qui suggère que d'autres facteurs intrinsèques au patient peuvent jouer un rôle dans la réponse à l'ITK.

C'est ainsi que 54,8% de patients avaient une réponse insuffisante ou réponse sub optimale à 12 mois et 29 % avaient échoué à ITK avec un délai médian de 6 mois. L'ELN a classé ces patients qui n'arrivent pas à obtenir une RMM et qui ne sont pas en situation d'échec, dans une catégorie dite d'alerte et qui nécessite une vigilance particulière car souvent sujette à des échecs (Baccarani et al ., 2013).

Notre étude a confirmé les données de la littérature concernant les facteurs prédictifs de l'échec. Ainsi, le degré de réduction du taux des transcrits BCR-ABL1 à 3 mois semble mieux caractériser les patients à risque élevé d'échec ou de rechute. En effet, aucun échec n'a été observé chez les patients ayant réduit leur taux de transcrite de plus de 2 log₁₀ à 3 mois. Un lien statistique a été trouvé entre les scores pronostics et la survenue d'un échec.

Les déterminants de la RMM

Bien que la prise en charge et la survie des patients atteints de LMC ont été considérablement améliorées avec l'arrivée des ITK, une prédiction précoce du pronostic est fortement souhaitable pour envisager un changement thérapeutique et assurer une survie favorable.

Dans notre travail, nous avons examiné l'association possible entre les facteurs suivant : le sexe, l'âge, le type de transcrite majeur, les scores pronostics Sokal, les niveaux d'expression du transcrite BCR-ABL1 à 3 et 6 mois, et la RMM.

D'après l'analyse statistique uni variée, il ressort que la RMM, a été significativement associé aux facteurs suivant : sexe féminin ($p=0.018$), les scores faibles de Sokal ($p=0,016$) et les niveaux d'expression à 3 mois ($\leq 10\%$) et à 6 mois ($\leq 1\%$) ($p < 10^{-3}$). Le type de transcrite était à la limite de significativité ($p=0.068$).

Le Sexe

L'une des principales constatations de notre étude est que les femmes ont non seulement un taux de RMM significativement plus élevé que les hommes, mais ont également un taux d'échec plus faible que celui des hommes (31 vs 41%). De plus, la courbe d'incidence, cumulée de la RMM stratifiée en fonction du sexe montre bien qu'à 18 mois de traitement, les hommes accusent un retard considérable par rapport aux femmes (45 vs 80%) ($p=0.018$) et (53% vs 82%; $p=0.042$) pour le groupe 2. Ces données suggèrent donc que le sexe féminin est plus favorable à une meilleure réponse moléculaire que le sexe masculin. Cette constatation a été retrouvée dans des études récentes (Branford et al., 2013 ;Lin HX .,2015).

Branford et al (Branford et al ., 2013), rapportent sur une série de 423 patients nouvellement traités par l'IM que le sexe féminin était l'un des facteurs associés à la RMM. Dans une étude rétrospective ayant concerné 166 patients traités avec l'IM pendant 10 ans, Lin et al (Lin, 2015), ont également retrouvé que les hommes avaient un taux de RMM significativement plus faible que les femmes (63,3% vs 81,6%; $P = 0,006$) et également un temps de rechute plus court (médiane 354 contre 675 jours, $P = 0,049$).

Il semble que cette différence pourrait être liée à une moindre observance du traitement par les hommes comparée à celle des femmes ainsi qu'à une mauvaise tolérance au traitement (Noens et al .,2009, Marin et al ., 2010). Des facteurs génétiques ou pharmacocinétiques ont également été incriminés.

La différence de poids corporel pourrait expliquer cette différence de concentration. Un poids inférieur à celui des hommes, signifie que les femmes peuvent recevoir en moyenne une dose de médicament en milligramme par kilogramme supérieure par rapport aux hommes, ce qui peut rendre compte d'une plus forte concentration plasmatique (Branford et al ., 2013).

L'hypothèse selon laquelle une réponse immunitaire transitoire pendant les premiers stades du traitement par ITK est à prendre en considération et pourrait être un facteur majeur dans la dynamique et la diminution de la charge tumorale de la LMC (Wodarz, 2010 ; Chen et al ., 2008).

Les scores pronostics

A ce jour, les scores de Sokal et EUTOS conservent tout leur intérêt pour prédire la réponse au traitement et la survie globale, bien que le score de sokal ait été élaboré avant l'apparition des ITK pour le traitement de la LMC. Cependant, aucun élément n'indique que l'un de ces deux systèmes soit supérieur ou plus pratique que l'autre, et aucune preuve ne montre que des patients à risque intermédiaire présentent une évolution différente par rapport à ceux à faible risque. L'ELN ne formule aucune recommandation sur le système de score pronostic à adopter et recommande par contre, de diviser les patients en population à faible risque (comprenant le risque intermédiaire) et à haut risque (Baccarani et al ., 2013).

Le score Sokal

Dans l'étude IRIS, les taux de RMM à 12 mois étaient de 50%, 30% et 19% respectivement pour les patients à score faible, moyen et à haut risque ($p = 0,007$) (Druker et al ., 2006). Dans notre étude, bien que les patients à score faible et intermédiaires aient les meilleurs taux de RMM comparativement à ceux avec un score élevé, nous n'avons trouvé aucune différence statistiquement significative entre les sous-groupes (41,93% vs 51,61% vs 6,45% ; $p=0.26$),

Réponses optimales précoces à 3 et 6 mois

Une réponse optimale est associée aux meilleurs résultats à long terme. L'identification précoce d'un sous-groupe de mauvais répondeurs constitue donc un objectif essentiel pour prévenir la progression de la maladie chez ces patients. Un seuil de 10% de transcrit BCR-ABL1 à 3 ou à 6 mois a été défini comme étant une valeur optimale et constitue un objectif primaire à atteindre (Baccarani et al ., 2013, O'Brien et al ., 2013).

La signification pronostic de l'évaluation de la réponse moléculaire précoce après l'initiation de l'IM ou d'un ITK2 en première ligne, a fait l'objet de plusieurs publications et qui ont toutes, signalé l'importance d'une réponse précoce prédictive de résultats favorables à long terme Hughes et al (2003) (Hughes et al.,2003), Branford et al (2003) (Branford et al.,2003), (Hughes et al (2010) (Hughes et al.,2010), Hughes et al (2014) (Hughes et al.,2014), Marin et al (2012) (Marin et al.,2012), Hanfstein et al(2012) (Hanfstein et al.,2012), Hanfstein et al (2014) (Hanfstein et al.,2014), Brummendorf et al (Etude Bella 2012) (Brümmendorf THet al.,2012), Neelakantan et al (2012) (Neelakantan et al.,2012), Kim et al (2014) (Kim et al.,2014), Jabbour et al (2014) (Jabbour et al.,2014), Branford et al (2014) (Branford et al.,2014), Castagnetti et al (2015) (Castagnetti et al.,2015), Fava et al (2016) (Fava et al.,2016).

Dans notre étude nous avons étudié la valeur pronostic des niveaux d'expression des transcrits BCR-ABL1 à 3 et 6 mois sur la RMM à 12 et 18 mois. Conformément aux études sus citées, les RMM étaient significativement plus élevées respectivement chez les patients qui avaient un faible niveau ($\leq 10\%$) à 3 mois (83,33% VS 19 % ; $p < 0.0001$) ou à 6 mois ($\leq 1\%$) (68,96% VS 28 % ($p < 0.0001$)).

Dans l'étude IRIS, tous les patients qui ont réduit leur taux à 3 mois de plus de 2 log $_{10}$, ont réussi à obtenir une RMM à 24 mois et aucun n'a développé une résistance primaire ou secondaire après 30 mois de traitement. En revanche, seulement 13% des patients qui n'ont pas atteint une réduction de 1 log $_{10}$ à 3 mois ont réalisé une RMM et 83% ont développé une résistance primaire ou secondaire à 30 mois ($P < 0,001$). Dans une analyse de 55 patients traités par IM 400 mg / jour, Branford et al, ont constaté que les patients ayant une réduction de plus de 2 log $_{10}$ à 3 mois ($< 1\%$) avaient des taux de RMM nettement meilleurs à 24 mois par rapport a ceux qui avaient une réduction ≤ 2 log $_{10}$ (100 contre 54%, $P < 0,001$) (Branford et al.,2003)

Dans une autre étude plus récente (Branford et al.,2014), le même auteur et ses collaborateurs, ont également rapporté des taux de RMM et de RM 4.5 significativement plus élevés chez les patients ayant des réponses précoces avec respectivement (88% vs 41%; $P < 0.0001$) et (41% vs 5,7%; $P < 0.0001$).

L'impact prédictif de la réponse optimale précoce pour différents ITK a donc bien été démontré, cependant, la question de savoir lequel des deux repères est le plus prédictif et le plus informatif pour décider d'un changement thérapeutique reste à ce jour controversé. Selon

les recommandations du NCCN (O'Brien et al., 2013), un niveau d'expression $> 10\%$ représente un échec et justifie un changement de thérapie, contrairement à l'approche plus prudente de l'ELN, où la cinétique de décroissance est plus importante que l'évaluation à un seul point et qui ne recommande un changement de thérapie qu'au 6^{ème} mois (Baccarani et al., 2003). Dans notre étude, Parmi les patients qui n'ont pas atteint une réduction de $1 \log_{10}$ à 3 mois (2/11) (16,67%), seul 1 (3,22%) a réussi à obtenir une RMM à 18 mois ($p < 0.0001$), et un patient a échoué.

Par contre ceux qui avaient un taux $> 10\%$ à 6 mois n'ont pas pu obtenir une RMM au bout des 18 premiers mois, alors que parmi les 20 patients qui avaient un taux compris entre 1-10%, 9 ont pu l'obtenir (31,04 %) ($p < 0.0001$).

Conclusion

Conclusion

Dans le cadre de la prise en charge de la LMC, la RT-PCR est devenue la technique la plus sensible actuellement disponible pour la caractérisation du réarrangement BCR-ABL1 ainsi que pour son suivi moléculaire.

Nous avons assisté à la réalisation de cette technique au niveau de service d'Hématologie de CHU de Sidi bel Abbes, ce qui nous a permis d'atteindre les objectifs fixés au début de l'étude.

La recherche du transcrit de fusion BCR-ABL par RT-PCR est indiquée pour le diagnostic de la leucémie myéloïde chronique.

- Si le taux de transcrit de fusion BCR-ABL est ($>10\%$ IS) le sujet présente une LMC.
- Si le taux de transcrit de fusion BCR-ABL est ($<10\%$ IS) le diagnostic doit être confirmé par une RT-PCR.

Nous avons effectué un suivi moléculaire selon les recommandations de l'ELN chez les patients atteints de LMC. Ce suivi nous a permis de définir plusieurs cinétiques de décroissance de la charge tumorale depuis le début du traitement par Imatinib. Plusieurs degrés de réduction ont été ainsi observés notamment après 12 mois de traitement.

L'évaluation de la réponse moléculaire a montré des résultats concordant avec la littérature concernant la RMM dont presque la moitié l'on obtenu au bout de 18 mois de traitement par l'Imatinib.

D'autre part, la quantification des transcrits BCR-ABL1 de nos patients à différents points de leur suivi nous a permis de déceler les cas d'échec primaire et les pertes de réponses et de proposer ainsi au clinicien la possibilité de passer à un ITK2.

Nos résultats concordent avec les données récentes de la littérature quant aux facteurs prédictifs de la RMM. L'analyse uni variée a pu montrer que les facteurs suivants sont associées à de meilleures RMM : des scores Sokal faibles, le sexe féminin, des niveaux d'expression $\leq 10\%$ à 3 moi

Au terme de notre étude, nous concluons que l'utilisation de la RT-PCR est indispensable au diagnostic et également au suivi moléculaire en proposant un suivi moléculaire adapté. De même que la surveillance moléculaire qui dépend de plus en plus d'une mesure plus sensible pour évaluer l'efficacité du traitement et surveiller la réponse.

Enfin, La RT-PCR de par sa sensibilité et sa standardisation apporte dans ce contexte, un puissant outil pour le suivi moléculaire qui doit être bien respecté afin surtout de déterminer au plus vite les patients résistants.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- 1) A.I.P.E.H., 1999. Association Interrégionale pour la promotion de l'enseignement en Hématologie. Edition marketing S.A, Paris.
- 2) .Ait Ali H et al., 2012. Approche epidemiologique de la leucemie lymphoïde chronique (LLC) en algerie,.
- 3) Alvandi F., Kwitkowski V. E., Ko C. W., Rothmann M. D., Ricci S., Saber H., et al. U.S. Food and Drug Administration Approval Summary: Omacetaxine Mepesuccinate as Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. *Oncologist*. 2014;19(1):94-9.
- 4) Alvarado Y., Kantarjian H., O'Brien S., Faderl S., Borthakur G., Burger J., et al. Significance of Suboptimal Response to Imatinib, as Defined by the European LeukemiaNet, in the Long-Term Outcome of Patients With Early Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase. *Cancer*. 2009;115(16):3709-18.
- 5) Amarante-Mendes G.P., Kim C.C., Liu L., Huang Y., Perkins C.L., Green D.R., et al. Bcr-Abl exerts its antiapoptotic effect against diverse apoptotic stimuli through blockage of mitochondrial release of cytochrome C and activation of caspase-3. *Blood*. 1998;91(5):1700-5.
- 6) .Andrieu JM and Colonna P., Eds. (1997). *Cancers : évaluation, traitement et surveillance*. Paris.
- 7) Arana - Trejo R, Sanchez ER, Ignacio - Ibarra G, La Fuente D, Báez E, Garces O, et al. BCR/ABL p210, p190 and p230 fusion genes in 250 Mexican patients with chronic myeloid leukaemia (CML). *Clinical & Laboratory Haematology*. 2002;24(3):145-50.
- 8) Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;blood-2016-03-643544
- 9) Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J, et al. Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *Journal of clinical oncology*. 2009;27(35):6041-51.

- 10) 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;122(6):872-84.
- 11) Baccarani M, Pileri S, Steegmann J-L, Muller M, Soverini S, Dreyling M, et al. Chronic myeloid leukemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2012;23(suppl 7):vii72-vii7.
- 12) Baccarani M, Castagnetti F, Gugliotta G, Rosti G. A review of the European LeukemiaNet recommendations for the management of CML. *Annals of hematology*. 2015;94:141.
- 13) Bardina, C., Tafzi, N., Declèves, X., Huet, E., & Chast, F. (2007). Pharmacocinétique des inhibiteurs de tyrosine kinase dans la leucémie myéloïde chronique. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2007(395), 31-35.
- 14) Barroca V., 2009. Renouveau des cellules souches : plasticité des progéniteurs germinaux et rôle du gène Fancg dans la fonction des cellules souches hématopoïétiques, Thèse de doctorat. LABORATOIRE Gamétogenèse Apoptose et Génotoxicité.
- 15) Bartram C.R., Klein A., Hagemeijer A., Agthoven T.V., Kessel G.V. et al., 1983. Translocation of c-abl oncogene adjacent to a translocation breakpoint in chronic myelogenous leukemia. *Nature*. 306, 277–280.
- 16) Benakli M., Hamladji RM., Ahmed-nacer R., 2013. L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques à conditionnement atténué. Société algérienne d'hématologie et de transfusion sanguine. Jan 26, 2013.
- 17) Bennour A, Ouahchi I, Achour B, Zaier M, Youssef YB, Khelif A, et al. Analysis of the clinico-hematological relevance of the breakpoint location within M-BCR in chronic myeloid leukemia. *Medical oncology*. 2013;30(1):348.
- 18) Benosman Chahrazed., 2010. Contrôle de la Dynamique de la Leucémie Myéloïde Chronique par Imatinib, thèse de doctorat- Université Bordeaux.
- 19) Bjerregaard B.K., et Wilquin J.L., 2006. The effect of occasional smoking on smoking related cancers: In the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Cancer Causes Control*; 17:1305-9.

- 20) Bories, D., Devergie, A., Gardembas-Pain, M., Kuentz, M., Legros, L., Mahon, F. X., ... & Rousselot, P. (2003). Stratégies thérapeutiques et recommandations pour la prise en charge des patients atteints de leucémie myéloïde chronique. *Hématologie*, 9(6), 497-512.
- 21) Boyne J., 2015. Les cancers du sang ou hématologiques.
- 22) Branford S, Hughes T, Rudzki Z, et al. Monitoring chronic myeloid leukaemia therapy by real-time quantitative PCR in blood is a reliable alternative to bone marrow cytogenetics *Br J Haematol* 2003 ; 107 : 587-99.
- 23) Branford S, Rudzki Z, Harper A, Grigg A, Taylor K, Durrant S, et al. Imatinib produces significantly superior molecular responses compared to interferon alfa plus cytarabine in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Leukemia*. 2003;17(12):2401-9.
- 24) Branford S, Yeung DT, Prime JA, Choi S-Y, Bang J-h, Park JE, et al. BCR-ABL1 doubling times more reliably assess the dynamics of CML relapse compared with the BCRABL1 fold rise: implications for monitoring and management. *Blood*. 2012;119(18):4264-71.
- 25) Branford S, Yeung DT, Parker WT, Roberts ND, Purins L, Braley JA, et al. Prognosis for patients with CML and > 10% BCR-ABL1 after 3 months of imatinib depends on the rate of BCR-ABL1 decline. *Blood*. 2014;124(4):511-8.
- 26) Branford S, Yeung DT, Ross DM, Prime JA, Field CR, Altamura HK, et al. Early molecular response and female sex strongly predict stable undetectable BCR-ABL1, the criteria for imatinib discontinuation in patients with CML. *Blood*. 2013;121(19):3818-24.
- 27) Branford S, Fletcher L, Cross NC, Müller MC, Hochhaus A, Kim D-W, et al. Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. *Blood*. 2008;112(8):3330-8.
- 28) Branford S, Rudzki Z, Harper A, Grigg A, Taylor K, Durrant S, et al. Imatinib produces significantly superior molecular responses compared to interferon alfa plus cytarabine in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Leukemia*. 2003;17(12):2401-9.
- 29) Breccia M, Cannella L, Diverio D, Streponi P, Nanni M, Stefanizzi C, et al. Isolated thrombocytosis as first sign of chronic myeloid leukemia with e6a2 BCR/ABL fusion transcript, JAK2 negativity and complete response to imatinib. *Leukemia research*.

- 30) Bruzzoni-Giovanelli H, González JR, Sigaux F, Villoutreix BO, Cayuela JM, Guilhot J, et al. Genetic polymorphisms associated with increased risk of developing chronic myelogenous leukemia. *Oncotarget*. 2015;6(34):36269.
- 31) Buclin T, Csajka C, Guiducci C, Decosterd LA. Suivi thérapeutique pharmacologique des inhibiteurs de protéines kinases. *Innovations & Thérapeutiques en Oncologie*. 2015;1(1):12-23.
- 32) Burmeister T, Reinhardt R. A multiplex PCR for improved detection of typical and atypical BCR–ABL fusion transcripts. *Leukemia research*. 2008;32(4):579-85.
- 33) Brümmendorf TH, Kantarjian HM, Gambacorti-Passerini C, Guilhot F, Akard L, Doshi V, et al. Assessment of early molecular response as a predictor of long-term clinical outcomes in the phase 3 BELA study. *Blood*. 2012;120(21):69-.
- 34) Byrd JC., Furman RR., Coutre SE., Flinn IW., Burger JA., Blum KA., et al., 2013. Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2013 Jul ;369 (1) :32-42. Références bibliographiques
- 35) Byrd JC., O'Brien S., James DF. Ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2013 Sep ;369 (13) : 1278-1279.
- 36) Canitrot Y, Falinski R, Louat T, Laurent G, Cazaux C, Hoffmann J-S, et al. p210 BCR/ABL kinase regulates nucleotide excision repair (NER) and resistance to UV radiation. *Blood*. 2003;102(7):2632-7.
- 37) Castagnetti F, Gugliotta G, Breccia M, Stagno F, Iurlo A, Albano F, et al. Long-term outcome of chronic myeloid leukemia patients treated frontline with imatinib. *Leukemia*. 2015;29(9):1823-31.
- 38) Cayuela J-M, Huguet F. Chronic myeloid leukemia (CML) diagnosis in 2012. *Oncologie*. 2012;14(10-11):561-8.
- 39) Cayuela J-M, Rousselot P, Nicolini F, Espinouse D, Ollagnier C, Bui-Thi M, et al. Identification of a rare e8a2 BCR-ABL fusion gene in three novel chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib. *Leukemia*. 2005;19(12):2334-.
- 40) Cayuela J-M. Treatment response evaluation *Horizons Hémato*. 2015.

- 41) Chen Y., Li S. Omacetaxine mepesuccinate in the treatment of intractable chronic myeloid leukemia. *Onco Targets Ther.* 2014;7:177-86.
- 42)Chen CI-U, Maecker HT, Lee PP. Development and dynamics of robust T-cell responses to CML under imatinib treatment. *Blood.* 2008;111(11):5342-9.
- 43) Chomel J. C., Sorel N., Mayeur-Rousse C., Turhan A. G. Les syndromes myéloprolifératifs. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée.* 2009;24(2):69-85.
- 44).CIRC, 2002. Summary of data reported and evaluation on Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. Volume 83. Rapport scientifique de consensus.
- 54) Clarke., C. A., S. L. Glaser, et al., 2011. "Lymphoid malignancies in U.S. Asians: incidence rate differences by birthplace and acculturation." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20(6): 1064-1077.
- 46).Colditz G.A., Sellers T.A., Trapido E., 2006. Epidemiology-identifying the causes and preventability of cancer?. *Nat. Rev. Cancer:* 6(1), 75-83.
- 47) Cony-Makhoul P., Gardembas M., Coiteux V., Carpentier N., Pommier C., Violet I, et al. Nilotinib after imatinib first-line: a real-life longitudinal cohort of patients with chronic myeloid leukaemia in chronic phase. *British journal of haematology.* 2018; 180(3):356-64.
- 48) Cortes J.E., Jimenez C.A., Mauro M.J., Geyer A., Pinilla-Ibarz J., Smith B.D. Pleural Effusion in Dasatinib-Treated Patients With Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase: Identification and Management. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia.* 2017;17(2):78-82.
- 49). Cortes J. E., Gambacorti-Passerini C., Kim D. W., Kantarjian H. M., Lipton J. H., Lahoti A., et al. Effects of Bosutinib Treatment on Renal Function in Patients With Philadelphia Chromosome-Positive Leukemias. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2017;17(10):684-95.e6.
- 50) Cortes J., Digumarti R., Parikh P. M., Wetzler M., Lipton J. H., Hochhaus A., et al. Phase 2 study of subcutaneous omacetaxine mepesuccinate for chronic-phase chronic myeloid leukemia patients resistant to or intolerant of tyrosine kinase inhibitors. *Am J Hematol.* 2013;88(5):350-4.
- 51) Cortes J. E., Nicolini F. E., Wetzler M., Lipton J. H., Akard L., Craig A., et al. Subcutaneous omacetaxine mepesuccinate in patients with chronic-phase chronic myeloid

leukemia previously treated with 2 or more tyrosine kinase inhibitors including imatinib. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2013;13(5):584-91.

52) Cross NC. Standardisation of molecular monitoring for chronic myeloid leukaemia. Best practice & research Clinical haematology. 2009;22(3):355-65.

53) Cross N, White H, Müller M, Saglio G, Hochhaus A. Standardized definitions of molecular response in chronic myeloid leukemia. Leukemia. 2012;26(10):2172-5.

54) Cross N, White H, Colomer D, Ehrencrona H, Foroni L, Gottardi E, et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. Leukemia. 2015;29(5):999-1003.

55) Daley G.Q., Van Etten R.A., Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. Science. 1990;247(4944):824-30.

56) Damien Roos-Weil, Michèle Imbert. Un piège diagnostique à éviter : à propos d'un cas d'hyperplaquettose de découverte fortuite. CAS clinique. Revue francophone des laboratoires. Septembre- octobre 2009 - N°415.

57) De Groot R.P., Raaijmakers J., Lammers J.J., Jove R., Koenderman L. STAT5 activation by BCR-Abl contributes to transformation of K562 leukemia cells. Blood. 1999;94(3):1108-12

58) Deininger M., Goldman J.M., Melo J.V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood. 2000;96(10):3343-56

59) Deininger M, O'Brien SG, Guilhot F, Goldman JM, Hochhaus A, Hughes TP, et al. International Randomized Study of Interferon vs STI571 (IRIS) 8-Year Follow up: sustained survival and low risk for progression or events in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) treated with imatinib. Blood. 2009;114(22):1126-

60) De Klein A., Van Kessel A.G., Grosveld G., Bartram C.R., Hagemeijer A., Bootsma D., et al. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. Nature. 1982;300(5894):765.

61) Delbaldo C. Pharmacocinétique (PK) et pharmacodynamie (PD) de l'imatinib (Glivec®). Therapie. 2007;62(2):87-90.

- 62) Del Peso L., González-García M., Page C., Herrera R., Nuñez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science*. 1997;278(5338):687-9.
- 63). Denis Soulières., Jean-Luc Dionne., 2002 La leucémie lymphocytaire chronique : comment la prendre en charge?
- 64) Deb P, Chakrabarti P, Chakrabarty S, Aich R, Nath U, Ray SS, et al. Incidence of BCR-ABL transcript variants in patients with chronic myeloid leukemia: Their correlation with presenting features, risk scores and response to treatment with imatinib mesylate. *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology*. 2014;35(1):26
- 65). Di Bernardo, M. C., D. Crowther-Swanepoel., et al. 2008. "A genome-wide association study identifies six susceptibility loci for chronic lymphocytic leukemia." *Nat Genet* 40(10): 1204- 1210.
- 66). Djouadi K AN, Harieche F, et al. Approche épidémiologique de la leucémie méloïde chronique : Etude Algéro-Tunisienne. A propos de 1195 cas sur 05 ans (2010 - 2014). *Revue Algérienne D'hématologie*. 2016.
- 67) Djouadi K, Bouchakour A, Taoussi S, Abad M, Ouchenane Z, Sidi Mansour N, et al. Evaluation of the Imatinib Treatment of Patients with Chronic Myeloid Leukemia (CML). a Retrospective Study from Algerian Working Group on CML (GAT-LMC). *Blood*. 2016;128(22):5454-.
- 68) Doan V., Wang A., Prescott H. Bosutinib for the treatment of chronic myeloid leukemia. *Am J Health Syst Pharm*. 2015;72(6):439-47.
- 69) Dorer D. J., Knickerbocker R. K., Baccarani M., Cortes J. E., Hochhaus A., Talpaz M., et al. Impact of dose intensity of ponatinib on selected adverse events: Multivariate analyses from a pooled population of clinical trial patients. *Leuk Res*. 2016;48:84-91.
- 70) Druker B. J., Tamura S., Buchdunger E., Fanning S., 1996. Effects of selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*. 2:561-6.
- 71) Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2006;355(23):2408-17.

- 72) Entasoltan B., Bekadja M. A., Touhami H., Mehalhal N., Zouaoui Z., Mesli N., et al. Outcome of Frontline Treatment with "Generic" Imatinib In Adult Patients with Chronic Myeloid Leukemia in Algerian Population: A Multicenter Study. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2017;9(1):e2017062.
- 73) Eskazan A.E., Keskin D. Radotinib and its clinical potential in chronic-phase chronic myeloid leukemia patients: an update. *Therapeutic advances in hematology.* 2017;8(9):237-43.
- 74) Espinoza J. P., Cardenas V. J., Jimenez E. A., Angulo M. G., Flores M. A., Garcia J. R. A complex translocation (9;22;16)(q34;q11.2;p13) in chronic myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005;157(2):175-7.
- 75) Faderl S., Talpaz M., Estrov Z., O'Brien S., Kurzrock R., Kantarjian H.M. The biology of chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine.* 1999;341(3):164-72.
- 76) Farhat-Maghribi S, Habbal W, Monem F. Frequency of BCR-ABL Transcript Types in Syrian CML Patients. *Journal of Oncology.* 2016;2016.
- 77) Fava C, Rege-Cambrin G, Dogliotti I, Gottardi E, Berchiolla P, Di Gioacchino B, et al. Early BCR-ABL1 Reduction Is Predictive of Better Event-free Survival in Patients With Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia Treated With Any Tyrosine Kinase Inhibitor. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia.* 2016;16:S96-S100.
- 78) Flandrin-Gresta P, Cornillet P, Hayette S, Gachard N, Tondeur S, Mauté C, et al., editors. Recommendations for accreditation of laboratories in molecular biology of hematologic malignancies. *Annales de biologie clinique;* 2015.
- 79) Frame D., Clinical update 2007. Making strides in the management of chronic myeloid leukaemia *Am J Health – Syst Pharm* 2007 vol 64 Dec 15.
- 80) Gabert J, Beillard E, Van der Velden V, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia—a Europe Against Cancer program. *Leukemia.* 2003;17(12):2318-57.
- 81) Gainor J. F., Chabner B. A. Ponatinib: Accelerated Disapproval. *Oncologist.* 2015;20(8):847-8.

- 82) G. Dine, Y. Rehn, S.Brahimi, N. Ali Ammar, B. Gaillard, Y. Bocq, G.Fumagalli. Maladie résiduelle et leucémie myéloïde chronique. *Immunoanalyse et biologie spécialisée* (2013).
- 83) Gambacorti-Passerini CB, Donadoni C, Parmiani A, Pirola A, Redaelli S, Signore G, et al. Recurrent ETNK1 mutations in atypical chronic myeloid leukemia. *Blood*.2015;125(3):499-503.
- 84) Gandhi V., Plunkett W., Cortes J. E. Omacetaxine: a protein translation inhibitor for treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res*. 2014;20(7):1735-40.
- 85) Garg R.J., Kantarjian H., O'Brien S., Quintas-Cardama A., Faderl S., Estrov Z., et al. The use of nilotinib or dasatinib after failure to 2 prior tyrosine kinase inhibitors: long-term follow-up. *Blood*. 2009;114(20):4361-8.
- 86) Gendron N, Belhouachi N, Morel V, Azgui Z, Maloum K, Nguyen-Khac F, et al., editors. Leucémie myéloïde chronique avec transcrite de fusion variant BCR-ABL1 e19a2: intérêt de l'identification moléculaire au diagnostic pour le suivi de la maladie résiduelle. *Annales de biologie clinique*; 2014.
- 87) Ghavamzadeh A, Alimoghaddam K, Jahani M, Mousavi S-A, Irvani M, Bahar B, et al. Frequency of BCR-ABL fusion transcripts in Iranian patients with chronic myeloid leukemia. *Archives of Iranian Medicine*. 2008;11(3):247-51.
- 88) Gocuel A., Cavigeaux A., Jean Bernard ET. Les leucémies benzéniques de la région parisienne entre 1950 et 1965. *Nouv. Rev Fr d'hématologie Tome 7, 1967 n°4*, pp : 465-480.
- 89) Goh H-G, Hwang J-Y, Kim S-H, Lee Y-H, Kim Y-L, Kim D-W. Comprehensive analysis of BCR-ABL transcript types in Korean CML patients using a newly developed multiplex RT-PCR. *Translational research*. 2006;148(5):249-56.
- 90) Goldman J. *Chronic Myeloid Leukemia* 2009.
- 91) Goldin L. R., M. Bjorkholm, et al. 2009. "Elevated risk of chronic lymphocytic leukemia and other indolent non-Hodgkin's lymphomas among relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia." *Haematologica* 94(5): 647-653
- 92) Goldin, L. R., O. Landgren, et al. 2010. "Familial Aspects of Chronic Lymphocytic Leukemia, Monoclonal B-Cell Lymphocytosis (MBL), and Related Lymphomas." *European J Clin Med Oncol* 2(1): 119-126.

- 93) Goldman J.M., Melo J.V. Chronic myeloid leukemia—advances in biology and new approaches to treatment. *New England Journal of Medicine*. 2003;349(15):1451-64.
- 94) Gordon M.Y., Dowding C.R., Riley G.P., Goldman J.M., Greaves M.F. Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature*. 1987;328(6128):342.
- 95) Gotta V, Buclin T, Csajka C, Widmer N. Systematic review of population pharmacokinetic analyses of imatinib and relationships with treatment outcomes. *Therapeutic drug monitoring*. 2013;35(2):150-67.
- 96) Gotta V, Bouchet S, Widmer N, Schuld P, Decosterd LA, Buclin T, et al. Large-scale imatinib dose–concentration–effect study in CML patients under routine care conditions. *Leukemia research*. 2014;38(7):764-72.
- 97) Groffen J., Stephenson J.R., Heisterkamp N., Klein A., Bartram C.R., Grosveld G. Philadelphia Chromosomal Breakpoints Are Clustered within a Limited Region, bcr, on Chromosome 22. *Cell*. 1984 : 36, 93–99.
- 98) Guilhem Denis., 2015. Leucémie : symptômes, traitement, définition, de quoi s’agit-il ?,
- 99) Guilhot F., Roy L., Guilhot J., Millot F., 2004. Interferon therapy in chronic myelogenous leukemia. *Hematol Oncol Clin N Am* 2004; 18: 584-603.
- 100) Guilhot F. Diagnostic et traitement des hémopathies malignes comportant un réarrangement bcr-abl. *Hématologie*. 1995;1(2):133-44.
- 101) Hanfstein B, Lauseker M, Hehlmann R, Saussele S, Erben P, Dietz C, et al. Distinct characteristics of e13a2 versus e14a2 BCR-ABL1 driven chronic myeloid leukemia under first-line therapy with imatinib. *Haematologica*. 2014;99(9):1441-7.
- 102) Hanfstein B., Muller M. C., Hehlmann R., Erben P., Lauseker M., Fabarius A., et al. Early molecular and cytogenetic response is predictive for long-term progression-free and overall survival in chronic myeloid leukemia (CML). *Leukemia*. 2012;26(9):2096-102.
- 103) Hanfstein B, Shlyakhto V, Lauseker M, Hehlmann R, Saussele S, Dietz C, et al. Velocity of early BCR-ABL transcript elimination as an optimized predictor of outcome in chronic myeloid leukemia (CML) patients in chronic phase on treatment with imatinib. *Leukemia*. 2014;28(10):1988-92.

- 104) Hantschel O., Superti-Furga G. Regulation of the c-Abl and Bcr–Abl tyrosine kinases. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2004;5(1):33
- 105) Haouala A., Widmer N., Duchosal M. A., Montemurro M., Buclin T., Decosterd L. A. Drug interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, dasatinib, and nilotinib. *Blood*. 2011;117(8):e75-87.
- 106) Haouala A, Zanolari B, Rochat B, Montemurro M, Zaman K, Duchosal M, et al. Therapeutic drug monitoring of the new targeted anticancer agents imatinib, nilotinib, dasatinib, sunitinib, sorafenib and lapatinib by LC tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2009;877(22):1982-96.
- 107) HARALD THEML. Atlas de poche d'hématologie. Diagnostic pratique, morphologique et clinique. ISBN : 2-257-10132-4. Pages: 112- 119.
- 108) Harisson TR., 1993. Principe de médecine interne. Médecine-sciences. Flammarion. 5ème éd. Paris ; 1993.
- 109) Hartmann J.T., Haap M., Kopp H-G., Lipp H-P. Tyrosine kinase inhibitors-a review on pharmacology, metabolism and side effects. *Current drug metabolism*. 2009;10(5):470-81.
- 110) Hasford J, Pffirmann M, Hehlmann R, Allan NC, Baccarani M, Kluin-Nelemans JC, et al. A New Prognostic Score for Survival of Patients With Chronic Myeloid Leukemia Treated With Interferon Alfa Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. *Journal of the National Cancer Institute*. 1998;90(11):850-9.
- 111) 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;118(3):686-92.
- 112) Hehlmann R., Hochhaus A., Baccarani M. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*. 2007;370(9584):342-50.
- 113) Hehlmann R., Heimpel H., Hasford J., Kolb H.J., Pralle H., Hossfeld D.K., et al. Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group [see comments]. *Blood*. 1994;84(12):4064-77.

- 114) Heyssel R, Brill AB, Woodbury LA, Nishimura ET, Ghose T, Hoshino T, et al. Leukemia in Hiroshima atomic bomb survivors. *Blood*. 1960;15(3):313-31.
- 115) Hochhaus A, Larson RA, Guilhot F, Radich JP, Branford S, Hughes TP, et al. Longterm outcomes of imatinib treatment for chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2017;376(10):917-27.
- 116) Huet S, Dulucq S, Chauveau A, Ménard A, Chomel JC, Maisonneuve H, et al. Molecular characterization and follow-up of five CML patients with new BCR-ABL1 fusion transcripts. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2015;54(10):595-605.
- 117) 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;108(1):28-37.
- 118) Hughes T.P., Hochhaus A., Branford S., Müller M.C., Kaeda J.S., Forni 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;116(19):3758-65.
- 119) Hughes TP, Saglio G, Kantarjian HM, Guilhot F, Niederwieser D, Rosti G, et al. Early molecular response predicts outcomes in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase treated with frontline nilotinib or imatinib. *Blood*. 2014;123(9):1353-60.
- 120) 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. *New England Journal of Medicine*. 2003;349(15):1423-32.
- 121) Hughes TP, Ross DM, Melo JV. *Handbook of Chronic Myeloid Leukemia*: Springer; 2014.
- 122) Hussain S.R., Naqvi H., Raza S.T., 2012. Ahmed F., Babu S.G et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T genetic polymorphisms and risk of leukaemia among the North Indian population. *Cancer Epidemiology*. 2012 : 36(4), e227-e231.

123) Isfort S., Keller-v Amsberg G., Schafhausen P., Koschmieder S., Brummendorf T. H. Bosutinib: a novel second-generation tyrosine kinase inhibitor. *Recent Results Cancer Res.* 2014;201:81-97.

124) Jabbour E., Kantarjian H., Cortes J., editors. *Chronic myeloid leukemia and second-generation tyrosine kinase inhibitors: when, how, and which one?* Seminars in hematology; 2010: Elsevier.

125) Jabbour E, Kantarjian HM, Saglio G, Steegmann JL, Shah NP, Boqué C, et al. Early response with dasatinib or imatinib in chronic myeloid leukemia: 3-year follow-up from a randomized phase 3 trial (DASISION). *Blood.* 2014;123(4):494-500.98). Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J, Smigal, C, Thun, M.J. *Cancer statistic 2006.* CA Cancer J. Clin. 56 (2006) 106-130.

126) Jenny Roy., 2006. *Synthèse chimique et activité biologique d'agents stéroïdiens par le traitement du cancer de la prostate et de la leucémie.* Thèse de doctorat. Université Laval Québec.

127) J.F. Morère et al., *Thérapeutique du cancer.* Springer-Verlage France 2011. Chapitre 43. H.J. Olney. *Leucémie myéloïde chronique.* P 746.

128) Jiang Q., Zhao D., Jin J., Wu D., Meng F., Hu J., et al. A prospective, multi-centre clinical trial to evaluate the early clinical efficacy and safety of a generic imatinib in treating patients with chronic phase of chronic myelogenous leukemia. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 2015;36(8):651-5.

129) Jinawath N, Norris-Kirby A, Smith BD, Gocke CD, Batista DA, Griffin CA, et al. A rare e14a3 (b3a3) BCR-ABL fusion transcript in chronic myeloid leukemia: diagnostic challenges in clinical laboratory practice. *The Journal of Molecular Diagnostics.* 2009;11(4):359-63.

130) Kang E.M., Hsieh M.M., Metzger M., Krouse A., Donahue R.E., Sadelain M., et al. Busulfan pharmacokinetics, toxicity, and low-dose conditioning for autologous transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells in the rhesus macaque model. *Experimental hematology.* 2006;34(2):132-9.

140) Kantarjian H.M., Giles F., Gattermann N., Bhalla K., Alimena G., Palandri F., et al. Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is

effective in patients with Philadelphia chromosome–positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase following imatinib resistance and intolerance. *Blood*. 2007;110(10):3540-6.

141) Karlin L., Coman T., 2008 LIVRE D'hématologie. Collection sous la direction de G.perlemuter, D-Montani , L.Perlemuter.

142) Khoury H. J., Cortes J. E., Kantarjian H. M., Gambacorti-Passerini C., Baccarani M., Kim D. W., et al. Bosutinib is active in chronic phase chronic myeloid leukemia after imatinib and dasatinib and/or nilotinib therapy failure. *Blood*. 2012;119(15):3403-12.

143) Khoury H. J., Cortes J., Baccarani M., Wetzler M., Masszi T., Digumarti R., et al. Omacetaxine mepesuccinate in patients with advanced chronic myeloid leukemia with resistance or intolerance to tyrosine kinase inhibitors. *Leuk Lymphoma*. 2015;56(1):120-7.

144) Kim D.D., Lee H., Kamel-Reid S., Lipton J.H. BCR-ABL1 transcript at 3 months predicts long-term outcomes following second generation tyrosine kinase inhibitor therapy in the patients with chronic myeloid leukaemia in chronic phase who failed Imatinib. *British Journal of Haematology*. 2013;160(5):630-9.

145) Kim DDH, Hamad N, Lee HG, Kamel- Reid S, Lipton JH. BCR/ABL level at 6 months identifies good risk CML subgroup after failing early molecular response at 3 months following imatinib therapy for CML in chronic phase. *American journal of hematology*. 2014;89(6):626-32.

146) Kim S-H., Menon H., Jootar S., Saikia T., Kwak J-Y., Sohn S-K, et al. Efficacy and safety of radotinib in chronic phase chronic myeloid leukemia patients with resistance or intolerance to BCR-ABL1 tyrosine kinase inhibitors. *Haematologica*. 2014;haematol. 2013.096776.

147) Kujawski L.A., Talpaz M. The role of interferon-alpha in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Cytokine & growth factor reviews*. 2007;18(5-6):459-71.

148) Kurtin S. E., Matta L. Omacetaxine Mepesuccinate: A New Treatment Option for Patients With Chronic Myelogenous Leukemia. *J Adv Pract Oncol*. 2013;4(4):257-62.

149) Labussière H., Hayette S., Tigaud I., Michallet M., Nicolini F-E. Le traitement de la leucémie myéloïde chronique en 2007. *Bulletin du Cancer*. 2007;94(10):863-9.

- 150) Lackritz B., 2001. Adult leukemia: a comprehensive guide for patients and families. Cambridge, MA. O'Reilly.
- 151) Larson RA, Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Riviere GJ, Krahnke T, et al. Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. *Blood*. 2008;111(8):4022-8.
- 152) La Faculté de Médecine de Angers, France <http://hematocell.univangers.fr>
- 153) Le plan cancer Algérie., 2015-2019.
- 154) Leguay T., Mahon F-X., Leucémie myéloïde chronique, France.
- 155) Leguay T., Mahon F.X. 2005Chronic myelogenous leukaemia. *EMC-Hématologie.*: 2(3), 187- 205.
- 156) Leguay T., Mahon F.X.Leucémie myéloïde chronique. *EMC-Hématologie.* 2005;2(3):187-205.
- 157) Lemare F., Cazin J.L., Limat S., Aulagner G.Pharmacie Clinique Pratique en Oncologie: Elsevier Masson; 2016.
- 158) Lindauer M., Hochhaus A. Dasatinib. *Recent Results Cancer Res.* 2010;184:83-102.
- 159) Li S, Ilaria RL, Million RP, Daley GQ, Van Etten RA. The P190, P210, and P230 forms of the BCR/ABL oncogene induce a similar chronic myeloid leukemia–like syndrome in mice but have different lymphoid leukemogenic activity. *The Journal of experimental medicine.* 1999;189(9):1399-412.
- 160) Lin HX, Sjaarda J, Dyck J, Stringer R, Hillis C, Harvey M, et al. Gender and BCR-ABL transcript type are correlated with molecular response to imatinib treatment in patients with chronic myeloid leukemia. *European journal of haematology.* 2015.
- 161) Madaan K., Kaushik D., Verma T. Hydroxyurea: a key player in cancer chemotherapy. *Expert review of anticancer therapy.* 2012;12(1):19-29.
- 162) Maigre M., Harrousseau JL. Leucémie myéloïde chronique : acquisitions récentes. *Le concours médical ;* 1990 :112-19.

- 163) M. Lessard, L. Mauvieux, R. Herbrecht. La leucémie myéloïde chronique. Université Louis Pasteur – Faculté de Médecine - 2005/2006 - DCEM3 -Module 17 - Maladies du Sang et Transfusion.
- 164) Marina Lafage-Pochitaloff. MCU-PH en Hématologie. Explorations complémentaires en Hématologie Cellulaire. Laboratoire de Cytogénétique Onco-Hématologique. Département de Génétique. Aix-Marseille Université. Cours L3 Médecine. 4 Octobre 2012.
- 165) Marin D, Ibrahim AR, Lucas C, Gerrard G, Wang L, Szydlo RM, et al. Assessment of BCR-ABL1 transcript levels at 3 months is the only requirement for predicting outcome for patients with chronic myeloid leukemia treated with tyrosine kinase inhibitors. *Journal of clinical oncology*. 2012;30(3):232-8.
- 166) Marin D, Bazeos A, Mahon F-X, Eliasson L, Milojkovic D, Bua M, et al. Adherence is the critical factor for achieving molecular responses in patients with chronic myeloid leukemia who achieve complete cytogenetic responses on imatinib. *Journal of clinical oncology*. 2010;28(14):2381-8.
- 167) Martin R. Howard, Peter J. Hamilton. *Hématologie*. Campus illustré 2002. P 44-45.
- 168) Massaro F., Molica M., Breccia M. Ponatinib: A Review of Efficacy and Safety. *Curr Cancer Drug Targets*. 2017.
- 169) Mayeur-Rousse C, et al. . Can p230 BCR-ABL myeloproliferative neoplasm be distinguished from chronic myelogenous leukaemia?. 15 (6) : 416-23. . *Hématologie*. 2009.
- 170) McGlave P.B., De Fabritiis P., Deisseroth A., Goldman J., Barnett M., Reiffers J., et al. Autologous transplants for chronic myelogenous leukaemia: results from eight transplant groups. *The Lancet*. 1994;343(8911):1486-8.
- 171) Meggendorfer M, Bacher U, Alpermann T, Haferlach C, Kern W, Gambacorti-Passerini C, et al. SETBP1 mutations occur in 9% of MDS/MPN and in 4% of MPN cases and are strongly associated with atypical CML, monosomy 7, isochromosome i(17)(q10), ASXL1 and CBL mutations. *Leukemia*. 2013;27(9):1852-60.
- 172) Melo J.V. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype [editorial; comment]. *Am Soc Hematology*; 1996.
- 173) Merlin J-L. Les inhibiteurs de tyrosine kinase en oncologie. *La Lettre du pharmacologue*. 2008;22(2):51-62.

- 174) Menif S ea. Analyse du variant BCR-ABL chez les tunisiens atteints de leucémie myéloïde chronique (à propos de 70 cas). Congrès de la Société Française d'Hématologie. Paris 2005 (08-07). 2005.
- 175) Michel Tulliez. Traitement de la leucémie myéloïde chronique en 2007.nouvelles approches diagnostic et thérapeutique en hématologie. Revue francophone des laboratoires. septembre-octobre 2007. N° 395.
- 176) Miller G. D., Bruno B. J., Lim C. S. Resistant mutations in CML and Ph(+)*ALL* – role of ponatinib. *Biologics*. 2014;8:243-54.
- 177) Moguillansky N. I., Fakih H. A. M., Wingard J. R. Bosutinib induced pleural effusions: Case report and review of tyrosine kinase inhibitors induced pulmonary toxicity. *Respir Med Case Rep*. 2017;21:154-7.
- 178) Mohammedi Kenza., 2015.Etude de l'association entre les polymorphismes génétiques C677T du méthylène tétrahydrofolate réductase et risque de leucémie myéloïde chronique. Thèse de magister. Université de Biskra.
- 179) Molica S., 1994. "Infections in chronic lymphocytic leukemia: risk factors, and impact on survival, and treatment." *Leuk Lymphoma* 13(3-4): 203-214.
- 180) Molica S., 2005. "Second neoplasms in chronic lymphocytic leukemia: incidence and pathogenesis with emphasis on the role of different therapies." *Leuk Lymphoma* 46(1): 49-54.
- 181) Muller M. C., Cervantes F., Hjorth-Hansen H., Janssen J.J.W.M., Milojkovic D., Rea D., et al. Ponatinib in chronic myeloid leukemia (CML): Consensus on patient treatment and management from a European expert panel. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017;120:52-9.
- 182) Najab A., L.M.C de l'enfant. Thèse en médecine à la faculté de rabat 1981-n°199.
- 183) Neelakantan P., Gerrard G., Lucas C., Milojkovic D., May P., Wang L., et al. Combining BCR-ABL1 transcript levels at 3 and 6 months in chronic myeloid leukemia: implications for early intervention strategies. *Blood*. 2013;121(14):2739-42.
- 184) Nicolini F., Rousselot P., Guilhot F., Guilhot J., 2005. Leucémie myéloïde chronique: une prise en charge spécifique pour le sujet âgé. Société Nationale Française de Médecine Interne, Nantes.

- 185) Nicolini F-E., Ducastelle S., Corm S. Résistances à l'imatinib mésylate par mutation BCR-ABL au cours de la leucémie myéloïde chronique. Quelle stratégie adopter? *Hématologie*. 2007;13(6):457-64.
- 186) Noens L, Van Lierde M-A, De Bock R, Verhoef G, Zachée P, Berneman Z, et al. Prevalence, determinants, and outcomes of nonadherence to imatinib therapy in patients with chronic myeloid leukemia: the ADAGIO study. *Blood*. 2009;113(22):5401-11.
- 187) Nowell PC., Hungerford DA., 1960. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*, 132, 1497-1501 1960.
- 188) O'Brien S, Radich JP, Abboud CN, Akhtari M, Altman JK, Berman E, et al. Chronic myelogenous leukemia, version 1.2014. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2013;11(11):1327-40.
- 189) Oda T., Heaney C., Hagopian J.R., Okuda K., Griffin J.D., Druker B.J. Crkl is the major tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(37):22925-8.
- 190) Ongoren S., Eskazan A.E., Suzan V., Savci S., Erdogan Ozunal I., Berk S., et al. Third-line treatment with second-generation tyrosine kinase inhibitors (dasatinib or nilotinib) in patients with chronic myeloid leukemia after two prior TKIs: real-life data on a single center experience along with the review of the literature. *Hematology*. 2017:1-9.
- 191) O'Hare T., Walters D.K., Deininger M.W. N., Druker B.J. AMN107: Tightening the grip of imatinib. *Cancer Cell*. 2005;7(2):117-9.
- 192) O'Hare T., Shakespeare W. C., Zhu X., Eide C. A., Rivera V. M., Wang F., et al. AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer Cell*. 2009;16(5):401-12.
- 193) Ohnishi K., Ohno R., Tomonaga M., Kamada N., Onozawa K., Kuramoto A., et al. A randomized trial comparing interferon-alpha with busulfan for newly diagnosed chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Blood*. 1995;86(3):906-16.
- 194) Organisation mondiale de la Santé, 2014.
- 195) Osman E-AI, Hamad K, Elmula IMF, Ibrahim ME. Frequencies of BCR-ABL1 fusion transcripts among Sudanese chronic myeloid leukaemia patients. *Genetics and molecular*

biology. 2010;33(2):229-31.

196) Pallera A, Altman JK, Berman E, Abboud CN, Bhatnagar B, Curtin P, et al. NCCN Guidelines Insights: Chronic Myeloid Leukemia, Version 1.2017. Journal of the National Comprehensive Cancer Network. 2016;14(12):1505-12.

197) Pan J. W., L. S. Cook, et al., 2002. "Incidence of leukemia in Asian migrants to the United States and their descendants." Cancer Causes Control 13(9): 791-795.

198) Pan J. W., L. S. Cook, et al., 2002. "Incidence of leukemia in Asian migrants to the United States and their descendants." Cancer Causes Control 13(9): 791-795.

199) 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)[see comments]. Blood. 1996;88(7):2410-4.

200) Paul M.K., Mukhopadhyay A.K. Tyrosine kinase—role and significance in cancer. International journal of medical sciences. 2004;1(2):101.

201) Pavey T., Hoyle M., Ciani O., Crathorne L., Jones-Hughes T., Cooper C., et al. Dasatinib, nilotinib and standard-dose imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukaemia: systematic reviews and economic analyses. 2012.

202) Pendergast A.M., Muller A.J., Havlik M.H., Maru Y., Witte O. BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner. Cell. 1991;66(1):161-71.

203) Pignon J.M., editor Translocation bcr-abl: méthodes diagnostiques et intérêt clinique. Annales de Biologie Clinique; 1998.

204) Pelicci G., Lanfrancone L., Salcini A.E., Romano A., Mele S., Grazia M.B., et al. Constitutive phosphorylation of Shc proteins in human tumors. Oncogene. 1995;11(5):899-907.

205) Peng B., Lloyd P., Schran H. Clinical pharmacokinetics of imatinib. Clinical pharmacokinetics. 2005;44(9):879-94.

206) Poch Martell M., Sibai H., Deotare U., Lipton J. H. Ponatinib in the therapy of chronic myeloid leukemia. Expert Rev Hematol. 2016;9(10):923-32.

- 207) Prudhomme C., 2010. Livre d'oncologie d'hématologie. Collection dirigée par Jean-François d'ivernois. Paris.
- 208) Quintas-Cardama A., Kantarjian H., Jones D., Nicaise C., O'Brien S., Giles F., et al. Dasatinib (BMS-354825) is active in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia after imatinib and nilotinib (AMN107) therapy failure. *Blood*. 2007;109(2):497-9.
- 209) Rea D. Management of adverse events associated with tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. *Ann Hematol*. 2015;94 Suppl 2:S149-58.
- 210) Rea D CJ. Leucémie myéloïde chronique 9(4):1-12. EMC-Hématologie 2014.
- 211) Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukemia. *Nat Rev Cancer* 2005; 5: 172-83.
- 212) R. Lacroix, F. Sabatier, F. Dignat-george, J.Sampol. Laboratoire d'immunologie et d'hématologie, UFR de pharmacie, Aix-Marseille Université. La leucémie myéloïde chronique. *Hématologie clinique*. Tome 2.
- 213) Robb J., Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene* 2007;26:6715
- 214) Robien K., Ulrich C.M. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and leukemia risk : a HuGE minireview. *Am J Epidemiol*. 2003 : 157, 571-582.
- 215) Roche-Lestienne C., Prudhomme C. Résistance au Glivec®: actualités. *Hématologie*. 2007;13(1):43-53.
- 216) Roche-Lestienne C, Mahon F-X. Progression de la leucémie myéloïde chronique: des mécanismes moléculaires multiples mais une origine probablement commune, l'instabilité génétique? *Hématologie*. 2014;20(6):308-18.
- 217) Roskoski R.J. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacological research*. 2015;94:9-25.
- 218) Rosti G., Castagnetti F., Gugliotta G., Palandri F., Baccarani M. Physician's guide to the clinical management of adverse events on nilotinib therapy for the treatment of CML. *Cancer Treat Rev*. 2012;38(3):241-8.
- 219) Roufosse R., Beguin Y., 2010. Observance thérapeutique en hématologie : le cas particulier de la leucémie myéloïde chronique. *Med Liège*; 65 : 5-6 : 409-412

- 220) Rousselot P., Rochant H., Turhan A.G., Bernheim A., Bories D., Recher C., et al. Mise au point sur la leucémie myéloïde chronique. *Médecine thérapeutique*. 2000;6(2):129-40.
- 221) Rowley J.D., 1973. A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining. *Nature*. 1973 : 243, 290 –293.
- 222) Saglio G, Guerrasio A, Rosso C, Zaccaria A, Tassinari A, Serra A, et al. New type of Bcr/Abl junction in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 1990;76(9):1819-24.
- 223) Sébahnoun G., 2005. *Hématologie clinique et biologique* 2 éd. Rueil-Malmaison.578p.
- 224) Sgambati M., M Linet, et al., Eds., 2001. *Chronic lymphocytic leukemia: epidemiological, familial, and genetic aspects*. Basel, Switzerland: Marcel Dekker.
- 225) Skorski T., Bellacosa A., Nieborowska-Skorska M., Majewski M., Martinez R., Choi J., ET al. Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *The EMBO journal*. 1997;16(20):6151-61.
- 226) S.G. O'Brien, Guilhot F., Goldman J.M., Hochhaus A., Hughes T.P., Radich J.P., et al. International Randomized Study of Interferon Versus STI571 (IRIS) 7-Year Follow-up: Sustained Survival, Low Rate of Transformation and Increased Rate of Major Molecular Response (MMR) in Patients (pts) with Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase (CMLCP) Treated with Imatinib (IM). *Blood*. 2008;112(11):186-.
- 227) Société canadienne du cancer et l'Institut national du cancer du Canada. *Statistiques canadiennes sur le cancer 2006*. Toronto, Canada. (2006). *Références bibliographiques*
- 228) Société française d'hématologie, 2009.
- 229) Société Française d'Hématologie. *Leucémie myéloïde chronique*. *Hématologie*. 2007;13(5): 328-30.
- 230) Societe Francaise d'Hematologie, Groupe Francais d'Hematologie Cellulaire, College d'Hematologie des Hopitaux, Syndicat National des Biologistes Hospitaliers. *Guide de bonnes pratiques des ponctions médullaires*(Juin 2003).

- 231) Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, Tura S, Gomez GA, Robertson JE, et al. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. *Blood*. 1984;63(4):789-99.
- 232) Shabneez H., Shaikh M.U. Response and adverse effects of nilotinib in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia patients: data from a developing country. *Clinical therapeutics*. 2015;37(11):2449-57.
- 233) Stansfield L., Hughes T. E., Walsh-Chocolaad T. L. Bosutinib: a second-generation tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. *Ann Pharmacother*. 2013;47(12):1703-11.
- 234) Strati P and F., Caligaris-Cappio., 2011. "A matter of debate in chronic lymphocytic leukemia: is the occurrence of autoimmune disorders an indicator of chronic lymphocytic leukemia therapy?" *Curr Opin Oncol* 23(5): 455-460.
- 235) Tal E., Dan J., Michal A., Yulia V., Haim M. Nilotinib-Associated Acute Pancreatitis. *Annals of Pharmacotherapy*. 2013;47(1):e3-e.
- 236) Tannock R., Bristow R., Harrington L. *Le cancer dans le monde*. New York; Toronto. McGraw-Hill, Médical Pub. Division. (2005).
- 237) Tang M, Gonen M, Quintas-Cardama A, Cortes J, Kantarjian H, Field C, et al. Dynamics of chronic myeloid leukemia response to long-term targeted therapy reveal treatment effects on leukemic stem cells. *Blood*. 2011;118(6):1622-31.
- 238) Tefferi A, Vardiman J. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*. 2008;22(1):14-22.
- 239) Teillet-Thiebaud., *Leucémie myéloïde chronique : étiologie, épidémiologie, physiopathologie*. EMC 13011B67 -1986.
- 240) T. Leguay, F.-X Mahon. *Leucémie myéloïde chronique*. EMCHématologie2 (2005) 187-205.
- 241) The National Institute for Health and Care Excellence (NICE). Dasatinib, nilotinib and imatinib for untreated chronic myeloid leukaemia UK: The National Institute for Health and Care Excellence (NICE); 2016 [Available from: <https://www.nice.org.uk/guidance/ta426>].

- 242) Treuil Pascal. La leucémie myéloïde chronique et son traitement par l'imatinib. *Actualités Pharmaceutiques*. 2008;47(473):25-30.
- 243) Turhan Ali G. Leucémie myéloïde chronique: actualités biologiques et thérapeutiques. *Bulletin du cancer*. 2005;92(1):75-82.
- 244) Uz B., Dolasik I. An unexpected and devastating adverse event of dasatinib: Rhabdomyolysis. *Leuk Res Rep*. 2016;5:1-2.
- 245) Van Maele-Fabry G, Duhayon S, Mertens C, Lison D. Risk of leukaemia among pesticide manufacturing workers: a review and meta-analysis of cohort studies. *Environmental research*. 2008;106(1):121-37
- 246) Van Erp N. P., Gelderblom H., Guchelaar H. J. Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Treat Rev*. 2009;35(8):692-706.
- 247). Verdy E., G potron., Fisnard., 1994. LIVRE D'hématologie Tome 2. Albert Najman, 701 pages.
- 248). Viel JF., S. Richardson., P. Danel et ALL., 1993. Child hood leukemia incidence in the vicinity of la hague nuclear wast reprocessing facility (France). *Cancer causes and control* 1993 4(4):341-3.
- 249) Virginie Eclache, Franooise Lejeune. 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. *Revue Française des Laboratoires*, janvier 2002, N°339.
- 250) Wang SA, Hasserjian RP, Fox PS, Rogers HJ, Geyer JT, Chabot-Richards D, et al. Atypical chronic myeloid leukemia is clinically distinct from unclassifiable myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2014;123(17):2645-51.
- 251) Weerkamp F, Dekking E, Ng Y, Van der Velden V, Wai H, Böttcher S, et al. Flow cytometric immunobead assay for the detection of BCR-ABL fusion proteins in leukemia patients. *Leukemia*. 2009;23(6):1106-17.
- 252) Weisberg E, Catley L, Wright RD, Moreno D, Banerji L, Ray A, et al. Beneficial effects of combining nilotinib and imatinib in preclinical models of BCR-ABL+ leukemias. *Blood*. 2007;109(5):2112-20.

- 253) Widmer N, Béguin A, Rochat B, Buclin T, Kovacsovics T, Duchosal M, et al. Determination of imatinib (Gleevec®) in human plasma by solid-phase extraction–liquid chromatography–ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography B*. 2004;803(2):285-92.
- 254) Wiernik P. H., 2004. "Second neoplasms in patients with chronic lymphocytic leukemia." *Curr Treat Options Oncol* 5(3): 215-223.
- 255) Wodarz D. Heterogeneity in chronic myeloid leukaemia dynamics during imatinib treatment: role of immune responses. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2010;277(1689):1875-80.
- 256) Xavier T., 2013. First contributors in the history of leukemia. *World Journal of Hematology*: 2 (3), 62–70.
- 257) Xie S, Lin H, Sun T, Arlinghaus RB. Jak2 is involved in c-Myc induction by Bcr-Abl. *Oncogene*. 2002;21(47):7137.
- 258) Xu C., Reck B.H., Xue Z., Huang L., Baker K. L., Chen M., et al. Pazopanib-induced hyperbilirubinemia is associated with Gilbert's syndrome UGT1A1 polymorphism. *Br J Cancer*. 2010;102(9):1371-7.
- 259) Zatlá L., Dahméne M.R., Yachkour M., Rahal Y., Sfaoui W., Taibi K., Kéhal F; Touhami H., 2008. *Hématologie, Centre Hospito-Universitaire Oran, Algérie*.
- 260) Zekkari, N. (2014). *Aspects cytohématologiques de la leucémie myéloïde chronique et leurs impacts pronostic (Doctoral dissertation)*.
- 261) Zent C. S and N. E. Kay 2010. "Autoimmune complications in chronic lymphocytic leukaemia (CLL)." *Best Pract Res Clin Haematol* 23(1): 47-59.

Annexes

Annexe1: définition des réponses hématologique, cytogénétique et aussi moléculaire selon les recommandations de l'ELN 2009(Baccarani M et al ; 2009)

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

Annexe2: tableau comparatif des deux molécules de chimiothérapie (Rousselot et al ; 2000).

Molécule	Présentation	Posologie	Effets indésirables	Résultats
Busulfan (Myleran®)	Comprimés de 2mg	0,1 mg/kg/j	Hématologiques : myélosuppression sévère et prolongée Autres : fibrose pulmonaire, stérilité, pigmentation cutanée, cataracte	Rémission hématologique (effet retardé) Epuisement progressif de l'effet
Hydroxyurée (Hydrea®)	Gélules de 500mg	40mg/kg/j	Hématologiques : macrocytose Autres : atrophie cutanée, aphtes, ulcères cutanés, photosensibilité	Rémission hématologique (effet rapide) efficacité supérieur au busulfan

Annexe 3: Les valeurs normales de formule de numérotation sanguine « FNS »

	Homme	Femme	Enfant de 3 à 10 ans
Hématies (million/mm ³)	4,2 à 5,7	4,2 à 5,7	4,2 à 5,7
Leucocytes (par mm ³)	4000 à 10000	4000 à 10000	4500 à 13000
Plaquettes (mille/mm ³)	150 à 400	150 à 400	150 à 400
Hémoglobine (g/100ml)	14 à 17	12.50 à 15.5	12.0 à 14.5
Hématocrite (%)	40 à 52	37 à 46	36 à 45
VGM (μ ³)	80 à 95	80 à 95	74 à 91
TCMH (pictogramme)	28 à 32	28 à 38	24 à 30
CCMH %	30 à 35	< 30 à 35	28 à 33

Annexe 4 : Définition de la réponse aux inhibiteurs d'ABL1 en 1ère ligne de traitement (tout ITK) (Baccarani et al ; 2013).

A-Traitement ITK première ligne			
	Optimale	Avertissement	Echec
Diagnostic	NA	Haut risque ou ACC/Ph+ (+8,i(17)(q10),+19,+der(22))	NA
3 mois	BCR-ABL1 ≤ 10% Et/ou Ph+ ≤ 35%	BCR-ABL1 > 10% et/ou 35% < Ph+ ≤ 95%	absence de RHC et/ou Ph+ > 95%
6 mois	BCR-ABL1 ≤ 1% Et /ou ph+=	1% < BCR-ABL1 ≤ 10% et/ou 0 < Ph+ ≤ 35%	BCR-ABL1 > 10% et/ou Ph+ > 35%
12 mois	BCR-ABL1 ≤ 0,1%	0,1% < BCR-ABL1 ≤ 1%	BCR-ABL1 > 1% et/ou Ph+ > 0
Puis à n'importe quel moment	BCR-ABL1 ≤ 0,1%	ACA/Ph- (-7 ou 7q-)	Perte de la RHC Perte de la RCyC Perte de RMM confirmée* ACA/Ph+
<p>NA : non applicable ; ACA/Ph+ : anomalie chromosomique clonale dans les cellules Ph+ ; ACA/Ph- : anomalie chromosomique clonale dans les cellules Ph- ; RMM : réponse moléculaire majeure BCRABL1 ≤ 0,1%.* sur 2 examens consécutifs, avec au moins un des deux indiquant BCR-ABL1 > 1%</p>			

Annexe 5 : Fiche de renseignement

Nom et prénom :

Sexe : H F

Age au diagnostic :

Origine géographique :

La profession :

La phase de la LMC :

Score de SOKAL : Faible Intermédiaire Haut **Quantification des transcrits et évaluation moléculaire :**

Ratio BCR/ABL (%) au diagnostic :

Ratio BCR/ABL (%) à 3 mois :

Ratio BCR/ABL (%) à 6 mois :

Ratio BCR/ABL (%) à 12 mois :

Ratio BCR/ABL (%) à 24 mois :

Qualité de la réponse : Optimale Echec Alerte RMM : Oui Non RMM : 3M 6M 12M 24M RMP : Oui Non Niveau de la RMM : RM³ RM⁴ RM^{4.5} RM⁵

Annexe 6 : Fiche de résultat au diagnostic

GeneXpert PC

Test Report

Sample ID: [REDACTED]
 Test Type: Specimen
 Sample Type: Whole blood

Assay Information

Assay	Assay Version	Assay Type
Xpert BCR-ABL Ultra	1	In Vitro Diagnostic

Test Result: **BCR-ABL has been detected at a level of 55% (IS)**

Test and Analyte Result

Analyte Name	Ct	EndPt	Analyte Result	Probe Check Result	Target Delta Ct
BCR-ABL	11.4	765.0	POS	PASS	-1.0
ABL	10.4	510.0	PASS	PASS	

User: [REDACTED]
 Status: Done
 Expiration Date*: 31/03/19
 S/W Version: 4.4a
 Cartridge S/N*: 146343992
 Reagent Lot ID*: 06801
 Notes: Malade suivi pou LMC sous IMATIB 400mg
 Error Status: OK

Start Time: [REDACTED]
 End Time: [REDACTED]
 Instrument S/N: 805217
 Module S/N: 646652
 Module Name: B1

Errors
 <None>

Tech. Initial/Date _____ Supervisor Initial/Date _____

* indicates that a particular field is entered using a barcode scanner

For In Vitro Diagnostic Use Only.

GeneXpert® Dx System Version 4.4a

Page 1

