

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ DE MENTOURI CONSTANTINE

Faculté des Sciences de
la Nature et de la Vie.

Département des Sciences de
la Nature et de la Vie.

N° d'ordre :

N° de série :

Mémoire pour l'obtention du diplôme de
Magistère en Génétique Moléculaire.

Contribution à l'étude cytogénétique des leucémies.

Présenté par : Rezgoune Mohamed Larbi

Soutenu publiquement le 27/09/2006 devant les membres du jury :

Président :	ABADI N. :	<i>Professeur de la faculté de médecine, Constantine.</i>
Rapporteur :	SATTA D. :	<i>Professeur de l'université de Mentouri, Constantine.</i>
Examineurs :	NAIMI D. :	<i>Professeur de l'université de Mentouri, Constantine.</i>
	ROUABAH L. :	<i>Maître de conférence de l'université de Mentouri, Constantine.</i>
	BENDJEDDOU D. :	<i>Maître de conférence de l'université de Guelma.</i>

*Au Nom de Dieu, le Tout Miséricordieux, le Très
Miséricordieux*

*Merci dieu tout puissant, qui m'a honoré
d'être parmi ceux qui savent lire et écrire,
et qui a guidé mes pas sur le chemin de la
science.*

*Je l'implore de m'éclairer et de me guider
sur le droit chemin ...*

*A toutes les personnes qui souffrent
de cette terrible maladie, puisse dieu
leurs venir en aide. Je souhaite
qu'un jour très proche la science les
soulagera de ce fléau qu'on appelle :
CANCER.*

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu, M^{me} BELATRECHE et M. ABADI de m'avoir accueilli au sein du laboratoire de recherche de biologie génétique, pour la liberté qu'il m'ont laissé pendant tout ce temps, et sans qui, la réalisation de ce travail n'aurait pas été possible. Je tiens à remercier également les docteurs BENACHOUR et HANNACHI, M. BRIHMAT et M^{elle} BOUCHARBEB pour leurs accompagnements et leurs participations actives, morales et pratiques, tout au long de la réalisation de ce mémoire. Merci pour cette atmosphère si particulière qui m'a permis d'évoluer vers d'autres horizons, et de m'initier à la recherche scientifique dans une ambiance chaleureuse et conviviale.

Je voudrais également, remercier M^{me} SATTI d'avoir accepté d'être le rapporteur de ce manuscrit et mon encadreur de thèse, pour les longues heures qu'elle m'a consacré pour la finalisation de ce travail.

Je tiens à remercier messieurs HAMOUR et SIDI MANSOUR pour m'avoir permis d'accéder au laboratoire d'hématologie du CHUC ainsi qu'aux malades. La réalisation de la partie hématologique de ce travail n'aurait pu se faire sans eux.

Je tiens en fin à exprimer ma reconnaissance aux membres du jury :

M. ABADI N, qui malgré ces nombreuses occupations et charges, a accepté de présider ce jury.

M^{mes} NAIMI D, ROUABAH L et BENDJEDDOU D pour m'avoir fait l'immense honneur d'accepter de lire, étudier et évaluer ce travail, et de siéger dans le jury de ma thèse de magister.

Plus particulièrement, M^{me} SATTI D, M ABADI N, M^{mes} ROUABAH L et NAIMI D qui étaient mes formateurs et qui m'ont tant apporté. Et aujourd'hui me donne la possibilité de présenter mon travail devant eux.

... ainsi que toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

J'ai l'immense plaisir de dédier ce travail de magistère :

- *A la mémoire de mon père **BOUDJEMAA**, qui a tout fait pour ce que je ne manque de rien et que je sois le meilleur dans mes études et qui, je suis sûre, aurait aimé me voir arriver jusque là.*
- *A la mémoire de mon grand père **SMAIN**, récemment décédé et qui a insisté pour que je termine mes études.*
- *A ma mère **FATIMA** qui a tout sacrifiée pour moi, son unique enfant, et m'a donné l'envie, mais surtout le courage, de réussir et de dépasser mes limites.*
- *A ma femme **DJALILA**, qui m'a beaucoup aidé et encouragé, et a été le meilleur soutien moral qu'un homme puisse rêver d'avoir, sans me reprocher mes oublis et mon investissement total dans mes études.*
- *A mon beau père **YOUSSEF**, qui m'a aidé de toutes les manières possibles dans la réalisation de ce travail.*
- *A mes tentes : **TEFAHA, HALIMA, FATIMA** et **ZAHIA** et leurs maris, respectivement **MESSAOUD, SALEH, DJAMEL** et **KADOUR***
- *A mon oncle **SAID**, sa femme **SHERIFA** et ma cousine **KHADIDJA**.*
- *A toute ma belle famille : spécial dédicace à ma belle mère **FATIHA** et ces enfants **ZAKI, ZOULEIKA, ASMA** et **ABDELKADER**.*
- *A mon encadreur M^{me} **SATTA** à qui je la dédie ce travail avant de la remercier pour m'avoir guidé à le faire, qui était toujours là à 8 h du matin, et qui a cru et s'est battue pour moi, et pour tous ces magisters.*
- *A messieurs **ABADI** et **BRIHMAT** qui, en plus de m'apprendre de nouvelles choses de la vie, m'ont aidé à me sentir moins seul et ont été pour moi une bouffée d'oxygène dans ce milieu, totalement nouveau pour moi.*
- *A M^{me} **ROUABAH** pour la manière, si originale et efficace, dont elle nous a enseigné la biologie.*
- *A M^{me} **NAIMI** qui nous a fait aimé la biologie.*
- *Au Docteur **BENACHOUR** et au Docteur **HANNACHI** et qui ont pris de leurs temps et m'ont consacré des heures pour m'initier à la pratique du laboratoire.*
- *Spécial dédicace à mes « frères d'arme » les post-graduées de la spécialité génétique année 2003 : **SANA, HADIA, RAZIKA, SANA** « l'algéroise », **ASMA, MORAD** et **SALIMA**. Ainsi que les post-graduées de l'année 2004 : **FATHI** et **ADEM**.*
- *Spécial dédicace à Docteur **SIFI, MESSAOUDA, MANEL, ABLA, SOUAD** et **NAOUEL**.*
- *A mes amis **AMIR, DJELOUL, AMAR, NACER, FATEH, SOFIANE, KAMEL, DJABER, MOHAMED** et tellement d'autres ...*

A toutes celles et ceux qui me donnent des raisons d'être ce que je suis...

Abréviations

AR: Anémie Réfractaire.

AREB: Anémie Réfractaire avec Excès de Blastos.

AREBt: Anémie Réfractaire avec Excès de Blastos en transformation.

ARS: Anémie Réfractaire avec Sidéroblastes en couronne.

BCR: Breakpoint Cluster Region.

BOM: Biopsie Ostéo-Médullaire.

CALLA: Commun Acute Lymphoblastic Leukemia.

CD: Cluster Differentiation.

CFUs: Colony forming unit in the spleen.

CGH: Comparative Génome Hybridization.

CIVD: Coagulation Intra Vasculaire Disséminée.

CRDM: Cytopénie Réfractaire avec Dysplasie Multilignée.

CRDM-RS: Cytopénie Réfractaire avec Dysplasie Multilignée et Sidéroblastes en Couronne.

CSH: Cellule Souche Hématopoïétique.

del: délétion.

EBS: Earl Balanced Salt.

EBV: Epstein Barr Virus

EDTA: Ethylene acid Daimio Tetra Acetate.

EPO: Érythropoïétine.

FAB: French-American-British Coopérative Group.

FISH: Fluorescence In Situ Hybridization.

G-CSF: Granulocytic Colony Stimulating Factor.

GFCH: Groupe Français de Cytogénétique Hématologique.

GM-CSF: Granulocytic Monocytic Colony Stimulating Factor.

GTP: Guanosine Tri Phosphate.

Hb: Hémoglobine.

Hct: Hématocrite.

hsr: homogeneously staining régions.

HTLV1: Human T-cell Leukemia Virus.

IL: Interleukines.

INSP: Institut National de la Santé Publique.

Iso: isochromosomes.

Kcl: chlorure de potassium.

LA: Leucémie Aigue.

LAL: Leucémies Aigues Lymphoïdes.

LAM: Leucémies Aigues Myéloïdes.

LAM4eo: Leucémies Aigues Myéloïdes 4 avec éosinophiles anormaux.

LAP: Leucémie Aiguë Promyélocytaire.

LH: Lymphome de Hodgkin.

LLC: Leucémie Lymphoïde Chronique

LMC: Leucémie Myéloïde Chronique.

LMMC: Leucémie Myélo Monocytaire Chronique.

LNH: Lymphomes Non Hodgkinien.

mar: marqueur.

M-bcr: Major breakpoint cluster region.

MCH: Mean Corpuscular Hemoglobin – contenu moyen du GR en Hb.

MCHC: Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration – concentration moyenne Hb des GR.

M-CSF: Monocytic Colony Stimulating Factor.

MCV: Mean Corpuscular Volume – Volume globulaire moyen.

MGG: May-Grünwald Giemsa.

ml: millilitre.

MM: Myélome Multiple.

MMR: Miss Match Repair.

MPO: Myélo Per Oxydase.

Na₂HPO₄: phosphate de sodium anhydre.

NER: Nucléotide Excision Région.

NFS: Numération Formule Sanguine.

NK: Natural Killer.

OMS: Organisation Mondiale de la Santé.

p: bras chromosomique court.

PAL: Phosphatase Alcaline Leucocytaire.

PCR: Polymérase Chain Réaction.

PE: Polyglobulie Essentielle.

Ph: chromosome de Philadelphie.

PHA C: Phyto Hém Agglutinine C.

PLT: plaquettes.

PNB: Poly Nucléaire Basophile.

PNE: Poly Nucléaire Eosinophile.

PNN: Poly Nucléaire Neutrophile.

q: bras chromosomique long.

RBC: Red Blood Count.

RTK: Récepteurs à activité Tyrosine Kinase.

RT-PCR: Reverse Transcriptase- Polymérase Chain Réaction.

SCF: Stem Cell Factor.

SM: Splénomégalie Myéloïde.

SMD: Syndromes Myélo Dysplasiques.

SMPC: Syndromes Myélo Prolifératifs Chroniques.

SSPP: Solution Stable de Protéines Plasmatiques.

t: translocation.

TCR: T-Cell Receptor.

TE: Thrombocytémie Essentielle.

ter: terminal.

TPO: Thrombopoïétine.

WBC: White Blood Count.

WHO: World Health Organisation.

μl: microlitre.

Sommaire

Introduction	-1-
---------------------------	-----

CHAPITRE 1 : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.

1- Historique.....	-3-
1-1- les leucémies	-3-
1-2- les techniques d'analyse cytogénétique des leucémies	-4-
2- Sang, moelle et hématopoïèse.....	-5-
2-1- hématopoïèse	-5-
2-2- ontogenèse.....	-7-
2-3- phénomènes de différenciations cellulaires impliqués dans l'hématopoïèse.....	-8-
3- Classification des leucémies.....	-11-
3-1- la pathologie myéloïde	-12-
3-1-1- les leucémies aiguës myéloïdes (LAM)	-12-
3-1-2- les syndromes myéloprolifératifs chroniques (SMPC)	-12-
3-1-3- les syndromes myélodysplasiques (SMD)	-14-
3-2- la pathologie lymphoïde	-16-
3-2-1- les leucémies aiguës lymphoïdes (LAL).....	-16-
3-2-2- la leucémie lymphoïde chronique (LLC).....	-16-
3-2-3- le myélome multiple.....	-17-
3-2-4- la macroglobulie de waldenstrom ou lymphome lymphoplasmocytaire.	-17-
3-2-5- les lymphomes.....	-18-
3-2-6- les formes particulières d'hémopathies lymphoïdes chroniques.....	-18-
3-2-7- les leucémies bi phénotypiques (leucémies mixtes).....	-19-
4- Incidence des leucémies	-20-
5- Étiologie.....	-22-
5-1- les facteurs génétiques.....	-22-

5-2- les facteurs exogènes et environnementaux.....	-23-
6- Symptomatologie clinique.....	-25-
6-1- syndrome d'insuffisance médullaire.....	-25-
6-2- syndrome tumoral.....	-26-
6-3- syndromes particuliers.....	-27-
7- Symptomatologie biologique.....	-28-
8- Pronostic.....	-31-
9- Traitement.....	-34-
10- La cancérogenèse des leucémies (leucémogénèse).....	-35-
10-1- les mécanismes moléculaires de la cancérisation.....	-35-
10-1-1- les oncogènes.....	-36-
10-1-2- les gènes suppresseurs de tumeurs.....	-37-
10-2- les méthodes d'analyse des anomalies cytogénétique dans les leucémies	-38-
10-3- les anomalies cytogénétique dans les leucémies.....	-40-
10-3-1- les anomalies cytogénétiques des LMC.....	-40-
10-3-2- les anomalies cytogénétiques des LAM	-41-
10-3-3- les anomalies cytogénétiques des LAL.....	-44-
10-3-4- les anomalies chromosomiques des LLC	-47-

CHAPITRE 2 : MATÉRIEL ET MÉTHODES :

1- Matériel.....	-48-
2- Réactifs.....	-48-
3- Méthodologie.....	-49-
3-1- prélèvements.....	-50-
3-2- hémogramme.....	-51-
3-3- cytologie et frottis sanguin.....	-52-
3-4- cultures cellulaires	-53-
3-5- caryotype standard : arrêt des mitoses, fixation, étalement et observation	-55-
3-6- R-banding	-57-

CHAPITRE 3 : RÉSULTATS

1- Malades	-58-
2- Questionnaire	-58-
3- Le choix des cas	-59-
4- Présentation des cas	-60-
4-1- aspect clinique et hémato-biochimique.....	-60-
4-2- aspect cytologique	-65-
4-3- aspect cytogénétique.....	-73-
4-3-1- cultures cellulaires	-73-
4-3-2- l'interprétation du caryotypes	-75-
4-3-3- présentation des caryotypes.....	-76-
4-3-4- R-banding	-85-

CHAPITRE 4 : DISCUSSION

Discussion des résultats.....	-86-
Conclusion	-90-
Références bibliographiques.....	-91-
Annexes	-96-

Résumé en arabe.

Résumé en anglais

Résumé en français

Introduction :

Les leucémies sont des maladies clonales et acquises de la cellule souche hématopoïétique ou d'un précurseur déjà engagé vers les lignées lymphoïdes et/ou myéloïdes. Les leucocytes ainsi que toutes les cellules sanguines sont produites essentiellement par la moelle osseuse et les ganglions lymphatiques. Cette hématopoïèse est normalement régulière et contrôlée. Les leucémies sont définies par la disparition de cette régulation conduisant à une prolifération excessive, désordonnée et étendue à de vastes territoires de cellules qui, dans la moelle et les ganglions, sont les précurseurs des globules blancs du sang. Cette prolifération au niveau des centres hématopoïétiques peut s'accompagner ou non d'augmentation du nombre des globules blancs du sang périphérique.

La leucémie est une maladie cancéreuse grave désignée aujourd'hui dans le langage courant, de " cancer du sang " .

Les leucémies font partie des hémopathies malignes. Dans ces pathologies, un clone cellulaire anormal prolifère. Par son caractère d'anarchie, de non réponse aux régulateurs normaux de la prolifération cellulaire et son caractère envahissant, ce clone revêt tous les caractères de la malignité. Selon le type cellulaire incriminé, on distingue :

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

En matière de leucémies, il est important de distinguer les leucémies myéloïdes des lymphoïdes, et de définir ensuite le caractère aigu ou chronique de la prolifération. Dans chacune d'elle subsiste plusieurs sous types, qui nécessitent une prise en charge particulière pour : Guider le diagnostic, choisir et adapter le traitement, et établir un pronostic fiable.

La détermination du type de leucémie dépend de plusieurs techniques :

- Cytomorphologiques (frottis sanguin et médullaire, hémogramme et myélogramme).
- Cytochimiques (réaction avec certains colorants spécifiques).
- Immunologiques (immunophénotypage des cellules leucémiques).
- Génétiques (cytogénétique et biologie moléculaire).

Actuellement dans notre pays, les méthodes de diagnostic des leucémies, s'appuient sur l'aspect clinique, la cytomorphologie et la cytochimie relevant de la classification FAB (French American British Coopérative Group), Ce qui est en décalage avec la nouvelle classification OMS ou WHO (Organisation Mondiale de la Santé ou en anglais World Health Organisation) en usage depuis 1992. Cette dernière s'appuie essentiellement sur les méthodes cytogénétiques et qui s'est révélée plus efficace dans le diagnostic, le pronostic, le choix et le suivi thérapeutique. Cependant, son utilisation reste limitée.

Notre travail de recherche vise à :

- Apprendre et appliquer les diverses techniques de l'analyse hématologique, cytologique et biochimique au diagnostic biologique des leucémies.
- Mettre au point des cultures cellulaires du sang des leucémiques.
- Adapter les techniques de cytogénétique standard (caryotype simple et banding) à l'analyse des leucémies afin d'améliorer la prise en charge des patients au niveau des centres hospitaliers.
- Comprendre qu'elles sont les causes moléculaires de la pathologie et leurs mécanismes d'action.

1- Historique :

1-1- Les leucémies :

Les premières descriptions de la " leucémie " se produisirent simultanément mais indépendamment en France, en Allemagne et en Grande Bretagne vers 1850 par : David Craigie, Alfred Donné (1) et, de manière plus explicite, John Bennett et Rudolf Virchow (2).

Le terme leucémie fit son entrée dans le langage médical en 1856, dérivé du terme allemand " leukämie " (3) qui fût introduit dans le vocabulaire spécialisé par l'allemand Rudolf Virchow en 1847 (4); Du grec *leukos* qui signifie " blanc lumineux, blanc éclatant " et *aima* qui veut dire " sang " (5).

Ils définissaient la leucémie par l'association d'un excès de globules blancs et d'une hypertrophie de la rate, du foie et/ou des ganglions lymphatiques (6), (7).

La caractérisation de la leucémie et son autonomisation nosologique à cette époque résulta d'avancées techniques et conceptuelles dans 3 domaines : La microscopie, l'émergence de la théorie cellulaire et de l'intérêt sans précédent pour le sang (8).

Dès les premières descriptions de ces pathologies et avec le développement des connaissances en médecine et en biologie, une confusion s'est installée dans les termes utilisés pour désigner les différents cas. Cela rendait difficile la comparaison des résultats de recherches. La classification des leucémies en une série de variétés distinctes s'est imposée du simple fait de leurs diversités cytomorphologiques. Cette constatation a débouché sur la réunion d'un groupe de travail composé d'hématologistes français, américains et britanniques en 1974, leurs travaux ont conduit à la publication en 1976 de la classification FAB qui distingue 3 approches complémentaires pour établir une classification : L'aspect clinique, la cytomorphologie et la cytochimie (9). Ces subdivisions ont montré par la suite un intérêt pronostique du fait de leurs sensibilités différentes aux chimiothérapies (10), (11).

La conception FAB de la classification des hémopathies malignes en général et des leucémies en particulier a évolué avec le développement des connaissances surtout en cytogénétique, en immunologie, et en biologie moléculaire. Ceci a conduit à l'apparition de nouveaux critères dans le sens d'une meilleure distinction entre les diverses formes de leucémies en général et des leucémies aiguës en particulier et a une réduction de l'inclassable dans le but de définir des entités biologiquement homogènes et cliniquement pertinentes (12) ; C'est la classification OMS mise en oeuvre en 1992, qui est plus limpide (13).

1-2- Les techniques d'analyses cytogénétiques des leucémies :

L'organisation dense et compacte de la substance nucléaire appelée " chromatine ", a été décrite pour la première fois par Miescher en 1869, et a été nommée ainsi par Fleming en 1882. En 1890, Von hanseman découvrit des anomalies de l'appareil chromosomique dans les cancers humains et nota l'existence de mitoses multipolaires (14). En 1914, Boveri énonce l'hypothèse que les anomalies chromosomiques étaient la cause même du cancer (15), et Winge introduisit la notion de sélection des clones cellulaires anormaux à la base de leurs équipements chromosomiques (16). Un pas important a été franchit en 1956 par la description du caryotype humain normal réalisée par Tjio et Levan, les études chromosomiques ont connue dès lors un nouvel essor, mais des problèmes techniques demeuraient non résolus (14). Les connaissances les plus importantes accumulées jusqu'à lors par l'étude cytogénétique des cancers concernent les hémopathies malignes et surtout les leucémies. Ceci essentiellement pour des raisons techniques.

La relation étroite entre ,d'une part, le chromosome Philadelphie découvert par Nowell et Hungerford (17), les premiers, en 1960, et la LMC , d'autre part, a confirmé le caractère clonal de l'anomalie (18) et fait naître l'idée que des anomalies chromosomiques spécifiques pouvaient être liées à des types particuliers d'hémopathies malignes. La recherche de tels " variants communs " n'a pas permis d'obtenir de résultats réellement probants à cause de l'insuffisance des techniques jusqu'à la mise en place des procédés de production de bandes sur les chromosomes métaphasiques à partir de 1970 (19). La description de la translocation t (9,22) (q34, q11) de la leucémie myéloïde chronique en 1973 : Première anomalie cytogénétique acquise et caractéristique d'un processus tumoral, marque le début de la recherche d'anomalies chromosomiques récurrentes des leucémies (20).

La reconnaissance du caractère non aléatoire des anomalies chromosomiques en regard du type de différenciation de l'hémopathie maligne a été acquise progressivement à partir de la fin des années 1970 .C'est ainsi qu'est née la distinction entre les anomalies dites primaires, communes à la grande majorité des proliférations d'un type cellulaire donné et considérées comme proches d'un événement causal, et des anomalies secondaires, souvent non aléatoires elles aussi, et surajoutées aux précédentes (21).

2- Sang, moelle et hématopoïèse :

Le sang est un tissu vivant spécialisé d'origine mésenchymateuse , constitué d'un liquide, le plasma, dans lequel se trouvent en suspension des cellules : Les globules rouges (ou hématies), les globules blancs (ou leucocytes) et les plaquettes (ou thrombocytes). Le plasma contient de nombreuses protéines aux fonctions multiples, anti-infectieuses (anticorps), anti-hémorragiques (facteurs de coagulation), hormones, ainsi que des médiateurs ou des produits du catabolisme (22) (voir annexe ; tableau 1).

Le sang irrigue tous les tissus et organes, et alimente donc directement ou indirectement toutes les cellules de l'organisme en remplissant ainsi diverses fonctions nécessaires à la vie :

- Oncotique : assurée par le plasma (albumine et électrolytes).
- Oxyphorique : assurée par les globules rouges (hémoglobine).
- Hémostase : assurée par la paroi vasculaire et les plaquettes sanguines (facteurs plasmatiques de la coagulation et molécules d'adhésion cellulaires).
- Défense de l'hôte : assurée par le système immunitaire, spécifique et non spécifique (les mononucléaires-macrophages, granulocytes, lymphocytes et immunoglobulines) (23).

La pathologie hématologique de l'une de ces fonctions correspond a leur diminution ou leur effondrement, isolément ou en association, ou par leur exagération. Leur étiologie reconnaît des facteurs multiples (déficiences congénitales, infections, carences, agents toxiques et médicamenteux, auto ou iso immunisation). La pathologie hématologique englobe aussi une importante partie néoplasique (les leucémies, lymphomes et myélomes) où la symptomatologie clinique est marquée par un syndrome anémique, infectieux, hémorragique ou les trois réunis, avec ou non une ou plusieurs organomégalie de la rate, des ganglions et du foie (23).

2-1- Hématopoïèse :

L'hématopoïèse est l'ensemble des phénomènes qui concourent à la fabrication quantitativement très importante et au remplacement continu et régulé des cellules sanguines. C'est un processus complexe et coordonné de prolifération, de différenciation et d'apoptose de cellules hématopoïétiques, dirigé par un ensemble de facteurs régulateurs, positifs et négatifs. L'homéostasie du système hématopoïétique impose que le nombre de cellules produites dans chaque lignée soit précisément contrôlé en fonction des besoins de l'organisme.

Toutes les cellules sanguines trouvent leurs origines dans la moelle, siège exclusif de l'hématopoïèse chez l'adulte, à partir d'une cellule ancestrale appelée CSH (Cellule Souche Hématopoïétique) ou CFUs (Colony Forming Unit in the spleen) qui donne naissance, par conditionnements et différenciations spécifiques à tous les éléments figurés du sang ; Processus qui sont réglés par le microenvironnement médullaire, des actions intercellulaires, et des facteurs de croissance et cytokines. Après plusieurs divisions qui aboutissent à des cellules souches engagées à la potentialisation de différenciation de plus en plus limitée, les progéniteurs deviennent spécifiques d'une seule lignée. Les cellules ancestrales conditionnées déterminent les 5 lignées : érythrocytaire, granulocytaire, monocytaire, mégacaryocytaire et lymphocytaire (24), (25).

Suite à d'autres différenciations on aboutit aux précurseurs, cellules identifiables morphologiquement sur un prélèvement de moelle osseuse. Ces précurseurs se divisent et deviennent matures. Ils correspondent à la majorité des cellules vues sur un étalement de myélogramme ou sur une biopsie ostéo médullaire (médullaire) (voir annexe ; tableau 3).

La maturation terminale donne naissance à neuf types cellulaires qui passent dans le sang ; Cellules très spécialisées avec des fonctions diverses et considérées comme des éléments terminaux et fonctionnels de lignées : les érythrocytes, les polynucléaires neutrophiles, les polynucléaires éosinophiles, les polynucléaires basophiles, les monocytes, les ostéoclastes, les mégacaryocytes, les lymphocytes T et les lymphocytes B (24).

Ces cellules se caractérisent par une durée de vie limitée, leurs renouvellements continus au cours de la vie de l'individu est indispensable au maintien des fonctions vitales du sang.

L'hématopoïèse comprend donc, respectivement, 4 compartiments cellulaires : les cellules souches pluripotentes, les progéniteurs, les précurseurs et les cellules matures (voir figure 1).

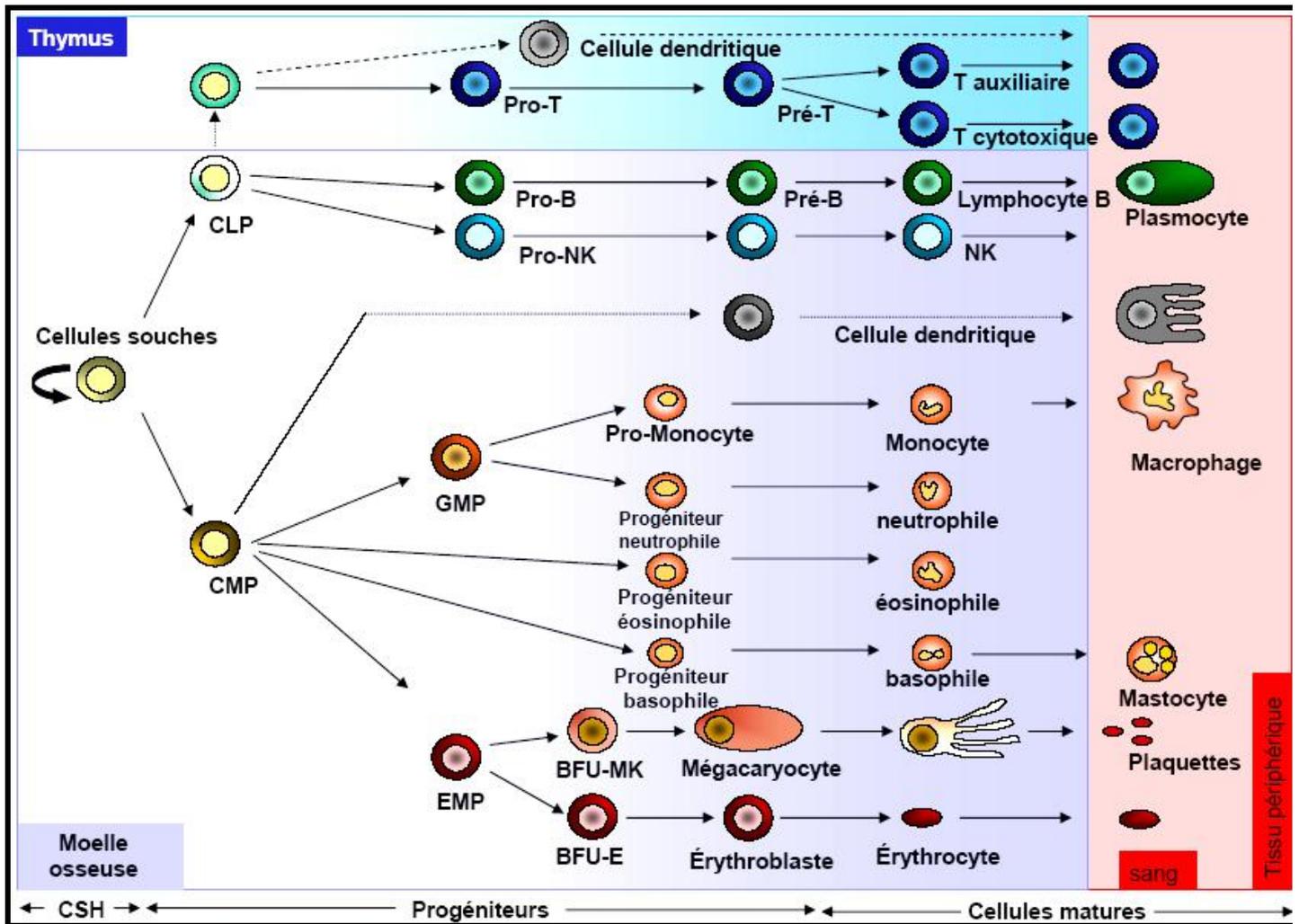


Figure 1 : Représentation schématique des différents compartiments du système hématopoïétique. (Lacombe C. D1 – Hématologie 2005 – 2006.)

2-2- Ontogenèse :

Le siège de l'hématopoïèse varie :

• L'hématopoïèse foetale lors de la vie intra-utérine :

- S'effectue au niveau du tissu conjonctif embryonnaire jusqu'au 2^{ième} mois.
- Est hépatique et splénique du 2^{ième} au 6^{ième} mois.
- Devient, en partie, médullaire à partir du 4^{ième} mois, ce qui coïncide avec le développement des ébauches osseuses.

- Après la naissance, l'hématopoïèse normale est localisée exclusivement dans la moelle osseuse. Jusque l'âge de 5 ans, tous les os ont une activité hématopoïétique. Ensuite cette activité va progressivement se limiter au niveau des os courts et plats (sternum, côtes, vertèbres, os iliaques) (26).

La moelle hématopoïétique, " organe " anatomiquement dispersée dans de multiples pièces osseuses est enfoncée à l'intérieur d'un cadre osseux. L'examen d'une coupe de moelle d'os spongieux hématogène permet de reconnaître différentes structures en disposition concentrique :

- Le cadre osseux et les cellules fonctionnelles (ostéoblastes, ostéoclastes).
- Le compartiment vasculaire.
- Le microenvironnement ou trame conjonctivo vasculaire.
- Le parenchyme hématopoïétique ; Véritable structure hématogène, mais qui serait, non fonctionnelle sans les autres structures citées précédemment (26).

2-3- Phénomènes de différenciations cellulaires impliquées dans l'hématopoïèse :

La différenciation peut se décomposer en deux étapes : Une première dite d'engagement, qui correspond à la restriction des potentialités (détermination) d'une cellule souche pluripotente au profit d'une seule lignée, et une seconde qui correspond à la maturation terminale en cellules fonctionnelles.

Deux catégories de facteurs régulateurs peuvent être rencontrés et individualisés sur le chemin de la différenciation des CSH vers les cellules matures du sang :

Ø **Facteurs diffusibles** : L'étude des cellules souches par culture de moelle in vitro a montrée l'existence de molécules considérées comme des "facteurs de croissance hématopoïétiques" nécessaires pour la survie, la multiplication, la différenciation, et la maturation des cellules de l'hématopoïèse. Le premier facteur connu a été l' EPO (érythropoïétine). Depuis, de nombreux autres facteurs ont été découverts, clonés et synthétisés. Leurs rôles exact dans l'hématopoïèse est de mieux en mieux défini, certains mêmes sont déjà utilisés en thérapeutique (27).

Ce sont des glycoprotéines agissant comme de véritables "hormones hématopoïétiques". Cependant, à l'exception de l'EPO, elles sont synthétisées par un grand nombre de cellules présentes dans divers organes (Cellules endothéliales, fibroblastes, monocytes-macrophages, lymphocytes). Elles sont connues sous le nom de cytokines et pour celles synthétisées par les lymphocytes, de lymphokines et interleukines (IL). Ces cytokines reconnaissent leurs cellules cibles par l'intermédiaire de récepteurs transmembranaires spécifiques. On distingue schématiquement 3 types de facteurs de croissance selon leurs lieu d'action au cours de l'hématopoïèse :

- **Facteurs de promotion** : Principalement l' IL 1, IL 4, IL 6 et le SCF (Stem Cell Factor). Ils augmentent le nombre de cellules souches pluripotentes en cycle cellulaire et les sensibilisent à l'action des autres facteurs de croissance.

- **Facteurs multipotents** : Principalement l' IL 3 et le GM-CSF (CSF : Colony Stimulating Factor). Ils agissent sur les cellules souches les plus immatures après sensibilisation par les facteurs de promotion et ils permettent leurs survie et différenciation.

- **Facteurs restreints** : Ils agissent sur les cellules souches engagées et favorisent la multiplication cellulaire et la maturation des précurseurs. Ce sont principalement : Le G-CSF (lignée granuleuse neutrophile), le médullaire (lignée monocyttaire), IL 5 (lignée granuleuse éosinophile), IL 4 (lignée granuleuse basophile), médullaire 6 (lignée mégacaryocytaire), l'EPO (lignée érythroïde), la TPO (thrombopoïétine, mégacaryocytaire).

Ø **Interactions cellulaires** : Par contact direct entre les précurseurs des lignées hématopoïétiques et les composants du microenvironnement médullaire, interactions qui mettent en jeu différentes molécules d'adhésion (25).

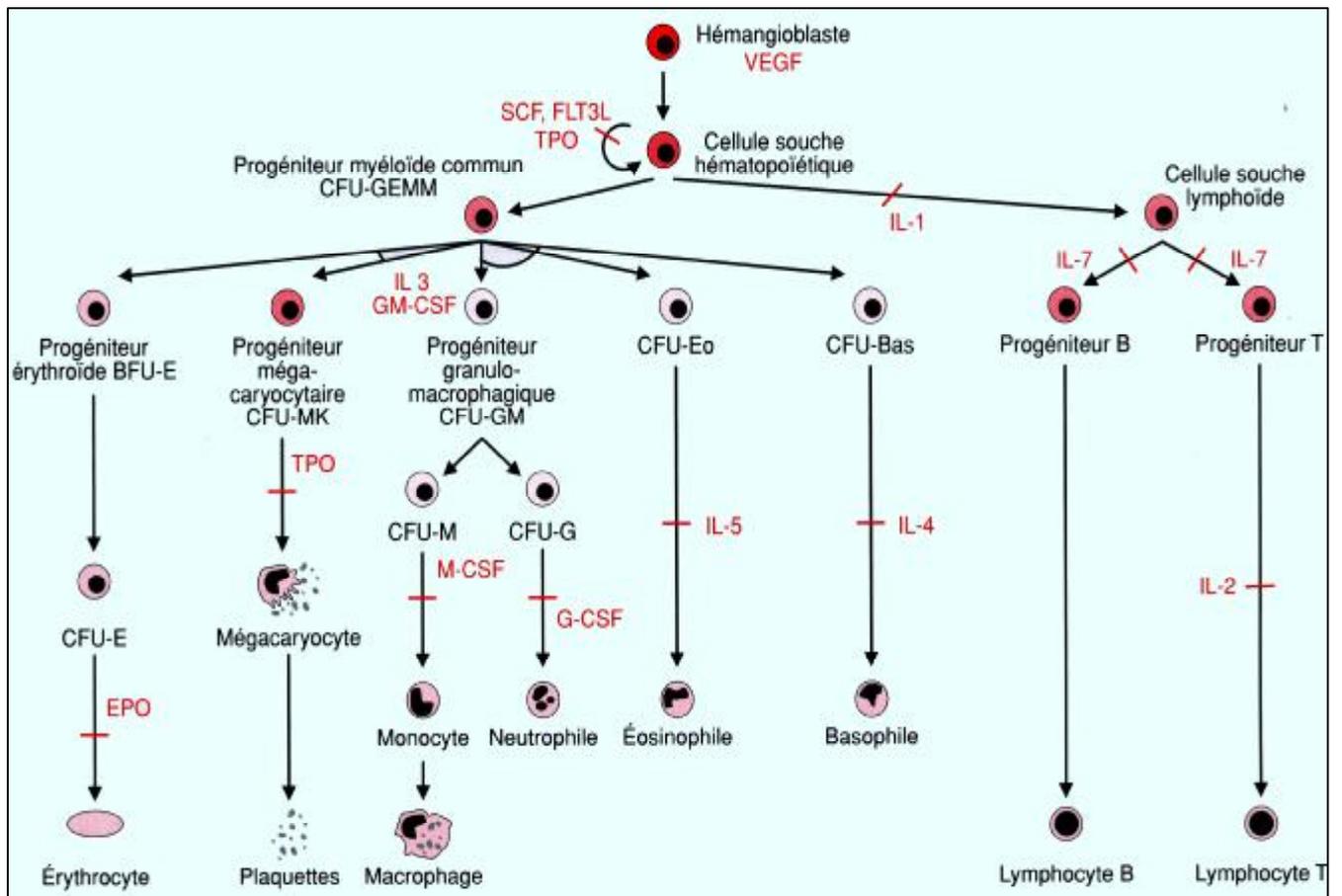


Figure 2 : Représentation schématique des principales étapes cibles des facteurs extrinsèques de l'hématopoïèse. (Lacombe C. D1 – Hématologie 2005 – 2006.)

La dérégulation de l'homéostasie hématopoïétique par une expression inadaptée ou par des altérations structurales de certains de ces facteurs protéiques, due à des mutations ponctuelles ou à des réarrangements chromosomiques, peuvent être à l'origine des hémopathies malignes. L'évolution de toute maladie cancéreuse est multi-étapes, chacune des étapes étant caractérisée par l'apparition de nouvelles anomalies génétiques (27).

3- Classification des leucémies :

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

Ce qui est important pour la clinique est de distinguer d'abord les leucémies des lymphomes et de séparer ensuite les leucémies myéloïdes des lymphoïdes, et de définir enfin le caractère aigu ou chronique de la maladie :

- Le caractère lymphoïde ou myéloïde se reconnaîtra surtout au microscope, avec parfois l'aide de la cytochimie.
- Le caractère aigu ou chronique se déterminera par le degré de différenciation cellulaire : différenciation absente ou incomplète dans les leucémies aiguës, plus ou moins complète dans les leucémies chroniques.
- Il existe des états intermédiaires caractérisés par des différenciations composites, des évolutions plus ou moins rapides et des modifications peu manifestes du médullogramme annonçant cependant un risque accru de leucémie aiguë franche. C'est le cas des myélodysplasies appelées aussi anciennement " états pré leucémiques " (28).

Les clones cellulaires anormaux responsables des leucémies ont en commun la prolifération cellulaire non contrôlée et un caractère envahissant. Ils se distinguent par :

- Le type cellulaire.
- Le degré de différenciation cellulaire.
- La vitesse de la prolifération qui est plus ou moins rapide.
- L'intensité de leur caractère envahissant.

A ces principaux caractères qui ont été, et sont encore à la base de la classification des leucémies se sont ajoutés ensuite :

- Les anomalies du caryotype
- Les marqueurs de membrane.
- Les réarrangements au niveau du génome particulièrement en ce qui concerne les gènes des immunoglobulines et des récepteurs T, ainsi que les oncogènes.

3-1- La pathologie myéloïde :

Il s'agit d'hémopathies malignes où le clone cellulaire impliqué dans la prolifération anarchique appartient à la lignée myéloïde, avec des degrés de différenciations et d'agressivités variables selon la pathologie en question.

3-1-1- Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) :

Les LAM sont des proliférations néoplasiques de précurseurs médullaires des cellules sanguines, associées à un blocage de maturation de ces précurseurs au stade de blastes, qui s'accumulent dans la moelle, dans le sang, et éventuellement dans d'autres organes. Par ailleurs, il existe un déficit de production de cellules matures, d'où une anémie, une neutropénie et une thrombopénie, et leurs conséquences cliniques (29).

La transformation maligne peut toucher les précurseurs des différentes lignées sanguines myéloïdes (Granulocytaire, monocytaire, érythrocytaire et mégacaryocytaire), donnant lieu aux différents types de leucémies aiguës myéloblastiques (30) (voir annexe ; tableau 4 et 5).

Trois catégories cliniques de LAM sont bien définies en fonction de leurs étiologies : LAM primitive dite " de novo ", LAM secondaire chimio induite (après agents alkylants ou après épipodophyllotoxines) et des LAM secondaires avec antécédent de syndromes myélodysplasiques ou de syndromes myéloprolifératifs chroniques (31).

3-1-2- Les syndromes myéloprolifératifs chroniques (SMPC) :

Les SMPC sont des hémopathies myéloïdes chroniques caractérisées par une prolifération portant sur une ou plusieurs lignées myéloïdes sans blocage de maturation, les cellules gardent un potentiel de différenciation terminale normal ou quasi-normal. On réunit sous le nom de SMPC plusieurs entités selon la classification FAB ou OMS (voir annexe ; tableau 6). Toutes résultent d'une transformation maligne de la cellule souche hématopoïétique et ont en commun :

- Une hyperplasie en bloc de la moelle osseuse avec, à des degrés divers, une prolifération accrue, sans blocage de maturation, des trois lignées myéloïdes.
- des transformations possibles de l'un vers l'autre de ces états.
- Une évolution terminale fréquente en leucémie aiguë, particulièrement en ce qui concerne la LMC.

On regroupe sous le terme de SMPC : La leucémie myéloïde chronique (LMC), la polyglobulie essentielle (PE) ou maladie de Vaquez, la myélofibrose avec splénomégalie myéloïde (SM) et la thrombocytémie essentielle (TE) (32).

a- La leucémie myéloïde chronique (LMC) :

La leucémie myéloïde chronique est un syndrome myéloprolifératif. C'est une maladie clonale de la cellule souche pluripotente hématopoïétique caractérisée par la prolifération prédominante de la lignée granulocytaire (polynucléose neutrophile et myélémie). Elle prédomine dans la moelle osseuse, la rate, le foie. Ces deux derniers sont les sièges d'une métaplasie myéloïde accompagnée d'une hyperleucocytose avec myélémie dans le sang périphérique.

b- La polyglobulie essentielle ou maladie de Vaquez (PE) :

La maladie de Vaquez est un syndrome myéloprolifératif caractérisé par une hyperplasie avec maturation complète des trois lignées médullaires, érythrocytaire, granulocytaire et thrombocytaire. L'hyperplasie de la lignée rouge domine toutefois le tableau biologique de la maladie. La lignée lymphocytaire n'est pas impliquée.

La pathogénie des symptômes repose sur l'accroissement du volume et de la viscosité du sang qui entraîne diverses conséquences : ralentissement de la circulation, surtout dans les petits vaisseaux, diminution de l'irrigation cérébrale, une augmentation du travail du cœur et une tendance aux thromboses vasculaires et aux hémorragies.

c- La myélofibrose avec splénomégalie myéloïde (SM) :

La myélofibrose avec splénomégalie myéloïde est un syndrome dans lequel la moelle osseuse est progressivement remplacée par une prolifération de tissu conjonctif. Cette prolifération est réactionnelle, secondaire au développement anormal des mégacaryocytes, et responsables d'une libération excessive de cytokines stimulantes des fibroblastes.

L'ensemble de la symptomatologie résulte de :

- L'insuffisance médullaire progressive en rapport avec les lésions de fibrose médullaire.
- La métaplasie myéloïde extra médullaire (le plus important de tous les syndromes myéloprolifératifs) prédomine au niveau de la rate et du foie, et donne naissance à une importante hépato-splénomégalie.

d- La thrombocytémie essentielle (TE) :

C'est un syndrome myéloprolifératif caractérisé par une élévation du nombre des plaquettes. Il se rencontre habituellement après 50 ans. Le risque de thrombose coexiste avec celui d'hémorragie par thrombopathie (les plaquettes peuvent être fonctionnellement anormales).

3-1-3- Les syndromes myélodysplasiques (SMD) :

Les myélodysplasies ou états pré leucémiques se caractérisent par une moelle osseuse riche avec une ou plusieurs cytopénies du sang périphérique. La tendance à évoluer vers une leucémie myéloïde aiguë est marquée. Ce sont des pathologies rares, au-delà de 70 ans l'incidence de la maladie est triplée par rapport aux patients plus jeunes. Les myélodysplasies peuvent être soit idiopathiques, ou survenir après traitement par chimiothérapie et/ou radiothérapie pour d'autres maladies. Les myélodysplasies ont été classifiées en cinq types selon la classification FAB (23).

La classification OMS des SMD établie en 2001 est basée sur plusieurs critères de diagnostique : La présence de signes de dysplasie unilignée ou multilignée, le pourcentage de blastes sanguins et médullaires et la présence ou non de sidéroblastes pathologiques. Elle regroupe les SMD en 5 entités distinctes :

- Anémie réfractaire (AR).
- Anémie réfractaire avec sidéroblastes en couronne (ARS).
- Cytopénie réfractaire avec dysplasie multilignée (leucémiques).
- Cytopénie réfractaire avec dysplasie multilignée et sidéroblastes en couronne (CRDM-RS).
- Anémie réfractaire avec excès de blastes (AREB) :
 - Leucémiques (blastés médullaires : 5 à 9 %).
 - Leucémiques (blastés médullaires : 10 à 19 %).
- Syndromes myélodysplasiques non classables.
- Syndrome myélodysplasique avec anomalie isolée 5q- (syndrome 5 q-).

Cependant, l'utilisation en pratique médicale de cette classification reste limitée du fait qu'elle ne fait pas aujourd'hui l'unanimité. Donc, on va décrire les SMD selon la classification FAB encore en vigueur (23).

a- L'anémie réfractaire (AR) :

La granulopoïèse et la mégacaryopoïèse ont une allure normale, mais il existe une hyperplasie de la lignée rouge avec des mégaloblastes. Le sang montre une anémie macrocytaire avec réticulocytose basse. La transformation leucémique est rare, et la survie médiane est de 5 ans. Ce type de myélodysplasie comprend 20 à 30 % de l'ensemble des myélodysplasies.

b- L'anémie sidéroblastique (AS) :

Les images sanguines et médullaires sont similaires à l'anémie réfractaire, mais au moins 15 % des précurseurs de la lignée rouge sont des sidéroblastes en anneau. Seulement 2 à 5 % des patients atteints de myélodysplasie sont atteints d'anémie sidéroblastique. Le pronostic est similaire à celui de l'anémie réfractaire.

c- L'anémie réfractaire avec excès de blastes (AREB) :

Toutes les lignées hématopoïétiques montrent des anomalies de maturation. Il existe une blastose médullaire de 5 à 20 %, et au plus 1 à 5 % de blastes circulants. 40 % des patients verront leurs myélodysplasies transformées en leucémie myéloïde aiguë. La survie médiane est de six à neuf mois. Ce type de myélodysplasie comprend 30 % de l'ensemble.

d- L'anémie réfractaire avec excès de blastes en transformation (leucémiques) :

Il s'agit d'une panmyélose où 20 à 30 % des cellules médullaires sont des blastes. La blastose dans le sang périphérique peut dépasser 5 %. Des bâtonnets d'Auer peuvent exister; 60 à 75 % des patients auront une transformation en leucémie aiguë. La survie médiane est de six mois, 25 % des patients atteints de myélodysplasie ont une anémie réfractaire avec excès de blastes.

e- La leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) :

Les précurseurs de la lignée rouge montrent peu d'anomalies, et l'anémie n'est pas importante. La monocytose sanguine est supérieure à 1000 c/μl. La thrombopénie est discrète, et la morphologie mégacaryocytaire est normale. La moelle contient 1 à 30 % de blastes. Une hépato-splénomégalie peut être présente dans 15 à 20 % des cas. Des atteintes cutanées,

gingivales, des épanchements pleuraux, péricardiques ou de l'ascite peuvent exister. Environ 33 % des patients évolueront en leucémie aiguë. La survie médiane est de 14 à 18 mois. La leucémie myélomonocytaire chronique comprend 15 à 20 % des myélodysplasies. Il s'agit d'une myélodysplasie qui revêt le plus souvent des caractéristiques de syndromes myéloprolifératifs.

3-2- La pathologie lymphoïde :

Il s'agit d'hémopathies malignes, où le clone cellulaire responsable de la prolifération anarchique appartient à la lignée lymphoïde, avec des degrés de différenciations, et surtout d'agressivités et d'essaimage très variables en comparaison avec la pathologie myéloïde.

3-2-1- Les leucémies aiguës lymphoïdes (LAL) :

Les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) sont des hémopathies malignes aiguës correspondant à une prolifération monoclonale des cellules souches engagées dans la différenciation lymphoïde B (LAL B) ou T (LAL-T), à point de départ médullaire, de lymphoblastes, s'accompagnant constamment d'une insuffisance médullaire due à l'envahissement des cellules leucémiques (blastes) dans le sang et la moelle osseuse des patients (33), (34).

3-2-2- La leucémie lymphoïde chronique (LLC) :

La leucémie lymphocytaire chronique (LLC) est une maladie clonale se traduisant par la prolifération et l'accumulation de lymphocytes matures. Elle est définie par une augmentation permanente (sur une période d'au moins trois mois) de la concentration lymphocytaire au-dessus de $5 \times 10^9/l$. Dans la nouvelle classification des syndromes lymphoprolifératifs (OMS), la LLC à cellules B est regroupée avec le lymphome à petits lymphocytes B. Le lymphome à petits lymphocytes B se distingue de la LLC par son expression principalement ou exclusivement extra médullaire alors que dans la LLC l'envahissement médullaire et sanguin est constant. Cette distinction ne présente que peu d'intérêt sur le plan thérapeutique (35), (36).

3-2-3- Le myélome multiple ou maladie de Kahler :

Le myélome multiple (MM) est caractérisé par l'émergence et l'accumulation dans la moelle osseuse d'un clone de cellules plasmocytaires malignes.

Le plasmocyte est la cellule terminale de la différenciation lymphocytaire B. Il est, avec les cellules B mémoires, l'aboutissement du processus de sélection et de maturation des cellules B spécifiques d'un antigène. Les lymphocytes B naïfs sont générés dans la moelle osseuse, migrent dans le sang périphérique, et peuvent, au contact de l'antigène, se différencier dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions, rate et tissus lymphoïdes associés aux muqueuses) en lymphocyte B mémoire ou en plasmocyte. Le plasmocyte migre ensuite vers la moelle osseuse pour se différencier en plasmocyte mature synthétisant en grande quantité des immunoglobulines (23).

Ce n'est pas à proprement parler une leucémie. Il correspond à une prolifération plasmocytaire maligne localisée essentiellement dans la moelle et n'envahissant que rarement le sang ou les organes.

3-2-4- La macroglobulie de Waldenström ou lymphome lymphoplasmocytaire :

Cette maladie associe la prolifération d'un clone lymphoplasmocytaire anormal avec la sécrétion d'une para protéine IgM. Elle envahit la moelle et les organes lymphoïdes et se caractérise par un essaimage sanguin variable de petites cellules lymphoplasmocytaires. Myélomes et macroglobulinémies se caractérisent en outre par la production de para protéines du type immunoglobulines. Pour cette raison, certains auteurs classent ces affections dans le groupe des immunocytomes (23).

3-2-5- Les lymphomes :

Les lymphomes malins sont des tumeurs développées à partir de l'un des éléments cellulaires constituant le tissu lymphoïde. Il s'agit d'affections fréquentes dont la répartition selon l'âge varie avec le type histologique, mais pour lesquelles on ignore s'il existe des causes favorisantes (étiologie inconnue) (32). Selon l'usage, nous distinguerons la maladie de Hodgkin (LH) et les lymphomes malins non hodgkinien (LNH).

a- Lymphome de Hodgkin :

Il s'agit d'un lymphome malin qui se distingue des autres lymphomes appelés non hodgkiniens par la présence de grandes cellules à noyaux polylobés et multinucléolés (les cellules de Sternberg ou cellules de Reed-Sternberg) ou de ses variantes cytologiques. La maladie de Hodgkin est actuellement incluse dans la classification des syndromes lymphoprolifératifs. Ceci explique la tendance actuelle à l'appeler lymphome de Hodgkin (23).

b- Les lymphomes non hodgkiniens (LNH) :

Ils représentent un groupe très hétérogène de proliférations malignes du système lymphoïde dont le point de départ est extra médullaire. Cette hétérogénéité se traduit par des présentations cliniques, anatomopathologiques, immunologiques et cytogénétiques variées et, de ce fait, par un pronostic très différent d'une forme à l'autre (23) (voir annexe ; tableau 6).

3-2-6- Les formes particulières d'hémopathies lymphoïdes chroniques :

Annexées à la LLC, suite à la classification OMS, elles sont individualisées en des entités pathologiques à part entière.

a- La leucémie à tricholeucocytes :

Il s'agit d'une prolifération maligne à cellules lymphocytaires B d'une morphologie particulière, caractérisées par des prolongements chevelus de la membrane cellulaire. Ces cellules infiltrent la moelle avec développement de myélofibrose, splénomégalie, et essaient dans le sang. L'affection se rencontre chez l'adulte, surtout au-delà de 50 ans et à une prédominance masculine. Sur le plan clinique, l'affection est souvent indolente au début. Les signes cliniques principaux consistent en une splénomégalie, hépatomégalie. La cytopénie affectant les éléments normaux, par infiltration médullaire, peut entraîner une tendance accrue aux infections. Une monocytopenie est très souvent présente. L'anémie et la thrombopénie compliquent à la longue l'évolution. L'immunophénotype est caractéristique : CD (Cluster Différentiation) 22+, FMC7+, CD103+ (37).

b- La leucémie à prolymphocytes :

Il s'agit de lymphocytes B, plus grands que ceux trouvés dans la LLC classique, avec souvent des nucléoles bien visibles. La maladie se caractérise surtout par une splénomégalie importante et une leucocytose particulièrement élevée. Le phénotype immunologique est

caractéristique : Immunoglobuline de surface très exprimée, CD19+, CD20+, CD23+/-, FMC7+. Le pronostic est nettement moins bon que celui de la LLC (38).

c- Le lymphome splénique à lymphocytes villeux :

Le lymphome splénique à lymphocytes villeux, encore appelé lymphome splénique de la zone marginale, est caractérisé par une splénomégalie massive et des lymphocytes B monoclonaux circulants. Il s'agit d'une maladie du sujet âgé dont l'évolution est très lente (38).

d- La leucémie à grands lymphocytes granuleux :

Pathologie proliférative caractérisée par la présence de lymphocytes avec cytoplasme abondant et granulations azurophiles de grande taille. Ces cellules sont soit des cellules T ou des cellules NK (Natural Killer). Une neutropénie peut être symptomatique. Les arthralgies et une splénomégalie peuvent exister, de même qu'une positivité pour le facteur rhumatoïde. Fréquemment, aucun traitement n'est nécessaire (38).

e- Le syndrome lymphome/leucémie :

Des cellules lymphoïdes malignes peuvent envahir la circulation sanguine lors de pathologies lymphomateuses comme le lymphome du manteau ou le lymphome folliculaire (38).

3-2-7- Les leucémies biphénotypiques (leucémies mixtes) :

Prolifération de cellules hématopoïétiques immatures (blastes) portant des marqueurs de 2 lignées (soit myéloïdes et lymphoïdes, soit marqueurs B et T), initialement dans la moelle osseuse puis dans le sang périphérique et au cours de l'évolution envahissant tous les organes. , elles peuvent morphologiquement s'apparenter à des LAM peu différenciées (LAM 0) ou à des LAL (39).

4- Incidence des leucémies :

Le cancer constitue un problème de santé publique et l'ampleur de cette morbidité n'a fait qu'accroître au cours de ces dernières années pour devenir l'une des causes essentielles des décès en Algérie.

En l'absence d'un registre de population à l'échelle nationale (on ne dispose que des registres des wilayas d'Alger, Blida et Tizi-Ouzou établis par l'Institut National de la Santé Publique dont les dernières données datent de 2003), les dossiers hospitaliers des malades constituent les principales sources d'information sur l'épidémiologie des cancers en général. Les données nationales concernant le profil épidémiologique et cytologique des leucémies restent très limitées.

Environ 30 000 nouveaux cas de cancers sont diagnostiqués chaque année en Algérie avec une augmentation de plus de 50 % du nombre de cas depuis une décennie. Les dernières données de l'année 2003 analysées par le registre des tumeurs d'Alger, traitant uniquement de la wilaya d'Alger montrent 3399 nouveaux cas de cancers sur un total de 2758509 habitants ; 46,5 % chez les hommes et 53,5 % chez les femmes (les incidences brutes par sexe sont respectivement : 117,3 et 129,2 nouveaux cas pour 100000 habitants et par an chez les hommes et chez les femmes respectivement (40) (voir tableau 1).

Pour l'épidémiologie des leucémies, les transformations d'hémopathies chroniques ne sont pas considérées comme des pathologies de novo ; Elles ne sont pas incluses dans les cas incidents.

Les dernières données de l'année 2003 analysées par le registre des tumeurs d'Alger traitant uniquement de la wilaya d'Alger manquent de précision en ce qui concerne le type de leucémie et le sex-ratio, seul la distinction myéloïde/lymphoïde est faite. Ces données ne reflètent pas la situation actuelle au niveau national. Une enquête nationale lancée par l'Institut national de la santé publique (INSP) est en cours. Des études épidémiologiques futures à grande échelle doivent être réalisées afin de cerner les différents aspects de ces maladies, surtout d'ordre étiologique (épidémiologie analytique) spécifiques à la population algérienne. Une seule étude épidémiologique algérienne (retrouvée dans la bibliographie) faite sur 20 ans en 1988 a montré que la LLC représente 20 % des leucémies de l'adulte, elle est 2 fois moins fréquente que la LMC et 3 fois plus fréquente chez l'homme que chez la femme (32).

Une remarque très importante concernant l'incidence globale des LAL de l'enfant qui peut varier d'un facteur 10 selon les pays. L'incidence la plus basse est observée en Afrique Noire (1,18 à 1,61 pour 105 enfants de moins de 15 ans) et l'incidence la plus élevée dans les populations hispaniques (Costa-Rica et Los-Angeles) (5,94 et 5,02 respectivement pour 105 enfants de moins de 15 ans). Les LAL sont moins fréquentes chez les enfants américains de race noire par rapport à ceux de race blanche. Le pic de fréquence de 2-5 ans est surtout marqué dans les pays occidentaux, peu marqué en Afrique, en Asie et dans la population noire américaine. Ce pic est apparu dans les années 1920 en Grande-Bretagne, dans les années 40 aux Etats-Unis et dans les années 60 au Japon. Son apparition correspond à des périodes d'industrialisation et d'élévation du niveau de vie et est attribuable essentiellement aux LAL de la lignée B (41).

Tableau 1 : Comparaison entre l'incidence de certaines hémopathies malignes, en Algérie et en France, selon les résultats des registres de cancers.

	Type de Leucémies	Incidence (100000 habitants/ans)	Age de survenue	Sex-ratio (homme/femme)
En France	LAM	3,4	surviennent chez le petit enfant de moins de 2 ans, puis au-delà de 15 ans, où elles ont une fréquence progressivement croissante (20/100 000 après 70 ans). L'âge médian se situe autour de 60 ans.	Le sex-ratio est peu marqué.
	LAL	3,6	Nettement plus fréquentes chez l'enfant par rapport à l'adulte (30-35 % des cancers de l'enfant) avec un pic de fréquence se situe entre 2 et 5 ans et un second pic de fréquence après 60 ans.	4 pour les LAL-T et 1,2 pour les LAL B.
	LLC	4	la plus fréquente des leucémies de l'adulte, inconnue chez l'enfant et l'adolescent, exceptionnelle avant l'âge de 30 ans avec une médiane d'âge est de 65 ans.	1,8/1
	LMC	1,8	La fréquence augmente avec l'âge avec une médiane de 53 ans.	sex-ratio peu marquée de 1,1 à 1,2.
En Algérie (Alger)	LH	2,9 (chez les hommes), 1,2 (chez les femmes).	-	-
	MM	1,5 (chez les hommes), 2,1 (chez les femmes).	-	-
	Leucémies myéloïdes	1,9 (chez les hommes), 1,6 (chez les femmes).	-	-
	Leucémies lymphoïdes	0,7 (chez les hommes), 0,5 (chez les femmes).	-	-
	Autres leucémies	- (chez les hommes), 0,1 (chez les femmes).	-	-

5- Étiologie :

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

5-1- Les facteurs génétiques :

Ø **Instabilité génomique** : La transformation maligne d'une cellule souche hématopoïétique résulte de la modification d'une ou plusieurs séquences d'acides nucléiques par activation, inhibition ou fusion avec une autre séquence modifiant la fonction du gène (42).

Ø **Âge** : L'instabilité génétique se majore à l'âge. Ainsi, l'augmentation de l'incidence des leucémies en général est proportionnelle avec l'âge. Ce phénomène de vieillissement des cellules souches est marqué par l'érosion télomérique des chromosomes qui les protègent normalement d'accidents de la réplication ; Les cellules sont ainsi plus exposées à des cassures chromosomiques ou à des modifications génétiques, qui non réparées, causent un déficit de l'engagement dans l'apoptose lié à l'existence de ces anomalies génétiques (42), (43).

Ø **Facteurs génétiques constitutionnels** : Des facteurs génétiques constitutionnels associés peuvent favoriser le phénomène d'instabilité génétique et/ou affaiblir celui de la réparation des modifications accidentelles ou induites des acides nucléiques. Ce sont des maladies associées à une instabilité chromosomique (au début ou à l'évolution) comme les :

- Anomalies chromosomiques constitutionnelles (trisomie 21, syndrome de Turner, syndrome de Klinefelter).
- Aplasies médullaires ou cytopénies isolées (anémie de Fanconi, érythroblastopénie de Blackfan–Diamond, agranulocytose constitutionnelle ou agranulocytose de Kostmann, syndrome de Shwachman-Diamond ou insuffisance pancréatique avec dysmyélopoïèse).
- Syndromes de cassures chromosomiques (Syndrome de Bloom, ataxie télangiectasie, Xéroderma Pigmentosum).
- Neurofibromatose de type I.

- Il existe d'exceptionnels cas familiaux de LAL. Le risque est important pour un jumeau homozygote d'un enfant leucémique (100 % si la LAL survient avant 1 an, 20-25 % si la LAL survient après 6 ans, le risque s'amoin-drit ensuite pour approcher une valeur standard après 10 ans).
- Des anomalies génétiques constitutionnelles augmentent le risque de LAL : La trisomie 21 (les LAL se voient chez l'enfant âgé de plus de 4 ans et rendent compte de 2 % du total des LAL de l'enfant). A noter qu'une trisomie 21 acquise est fréquente au cours d'une LAL (30 %). Le gène impliqué dans la leucémogénèse est en B L'ataxie-télangiectasie favorise la survenue de LAL-T avec anomalies chromosomiques impliquant le chromosome 14 (44).

Ø Hémopathies associées : Certaines LAM et plus rarement des LAL dites secondaires se développent après une hémopathie myéloïde chronique, le plus souvent une leucémie myéloïde chronique, plus rarement une splénomégalie myéloïde, polyglobulie de Vaquez ou une thrombocytémie essentielle, un syndrome myélomonocytaire chronique ou un syndrome myélodysplasique. Le pronostic de ces leucémies aiguës, myéloïdes ou lymphoïdes, secondaires est plus grave que celui des LA dites " de novo " (44).

5-2- Les facteurs exogènes et environnementaux :

Ø Exposition à des agents chimiques :

- Solvants benzéniques (reconnaissance des leucémies touchant les ouvriers qui manipulent ce produit comme maladie professionnelle).
- Chimiothérapie et surtout les alkylants (melphalan, endoxan...), inhibiteurs de la topoisomérase II (étoposide, novantrone...). Aux agents alkylants sont associés des leucémies aiguës secondaires caractérisées par une anomalie des chromosomes 5 ou 7 dont le pronostic est mauvais. Aux inhibiteurs de la topoisomérase II sont associées des leucémies aiguës caractérisées par une cassure du bras long du chromosome 11 au niveau de la bande 8. Le pronostic de ces leucémies aiguës myéloïdes secondaires est plus grave que celui des LAM dites " de novo " (42).
- Une étude scandinave a rapporté un risque élevé de LAL dans la filiation de mères fumeuses, le risque augmentant si le père fume également (41).

Ø **Exposition à des agents physiques** : Le rôle leucémogène est clairement démontré en cas d'irradiations de tous types :

- **Accidentelles** : (Tchernobyl, travailleurs exposés...).

- **Thérapeutiques** : Complications tardives du traitement par radiothérapie externe de la maladie de Hodgkin, du cancer du sein, ou radiothérapie métabolique de la maladie de Vaquez par le phosphore 32.

- **Militaires** : Explosion d'Hiroshima et Nagasaki, le syndrome de la guerre du golf.

L'exposition aux rayonnements ionisants favorise les LAL (pic vers la 8^{ième} année après l'irradiation). Le risque est corrélé à la proximité de l'irradiation. L'exposition *in utero* à faibles doses de rayons X augmente le risque relatif d'un facteur 2. Un excès significatif de LAL a été trouvé chez les populations d'enfants vivants autour des centrales nucléaires. Le travail du père dans la centrale a été trouvé comme facteur favorisant via la survenue d'une mutation germinale (42).

Ø **Autres agents environnementaux** : Il s'agit de peintures, de solvants ou d'exposition en raffinerie de pétrole. L'identification de ces facteurs est importante car elle peut aboutir sur une reconnaissance de maladie professionnelle (42).

Ø **Des facteurs infectieux** : Ont été évoqués dans la genèse de LAL de l'enfant survenant le plus souvent à l'âge scolaire mais aucun agent infectieux n'a été impliqué formellement. Dans la LAL de Burkitt, équivalent leucémique du lymphome de Burkitt, le virus EBV (Epstein Barr Virus) joue un rôle leucémogène dans les formes survenant en Afrique (mais pas dans celles survenant en Europe). Ce rôle paraît lié au fait que ce virus augmente la prolifération des lymphocytes B infectés, favorisant la survenue d'anomalies génétiques dans ces cellules. Dans une forme particulière de leucémie lymphoïde T de l'adulte, assez proche des LAL, et qui est principalement rencontrée au Japon et dans les Antilles, l'infection par le virus HTLV 1 (Human T-cell Leukemia Virus) intervient également dans la leucémogénèse, mais cette fois par l'intégration du virus dans le génome des lymphocytes T (42).

NB :

- L'étiologie des LAL de l'enfant est inconnue (dans plus de 90 % des cas). Il existe des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux qui sont associés à un risque accru de développer une leucémie (cas familiaux de leucémies) (32).

- L'étiologie des LMC est inconnue, mais dans 5 % des cas elle est secondaire à une exposition chronique au benzène, aux radiations ionisantes (maladies professionnelles).

- Pour les LLC, aucune remarque sur l'étiologie n'est à signaler. (32).

6- Symptomatologie clinique :

Les leucémies n'ont en général aucune spécificité physiopathologique particulière d'où la difficulté d'établir un diagnostic fiable uniquement à partir d'un examen clinique. La manifestation sur ce plan de ces affections hématologiques peut être déterminée par deux processus majeurs, ainsi que certains aspects particuliers, de prévalences variables avec tous les extrêmes possibles (23).

Dans les LAL, notamment chez l'enfant, les syndromes tumoraux sont pratiquement constants, alors que dans les LAM, c'est l'insuffisance médullaire qui domine, le syndrome tumoral n'étant pas très parlant. Pour la LMC et la LLC, les signes cliniques sont souvent inconstants, mais de prédominance tumoral, et le diagnostic est de difficulté variable, s'appuyant le plus souvent sur des arguments biologiques. Pour la LMC, la splénomégalie (de volume variable) associée ou non à une hépatomégalie est le signe clinique majeur. Pour la LLC, les adénopathies sont souvent évocatrices, associées ou non à une splénomégalie-hépatomégalie modérée (32).

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

6-1- Syndrome d'insuffisance médullaire :

Due à des cytopénies diverses (anémie, neutropénie et thrombopénie) avec leurs conséquences (syndromes anémiques, infectieux et hémorragiques respectivement).

- **Pour les LAM :** Il est lié à l'existence de blastes granuleux médullaires responsables de l'inhibition de l'hématopoïèse normale et de cytopénie(s) myéloïde(s). L'insuffisance médullaire est quasi constante dans les LAM.

- **Pour les LAL :** Il est lié à la présence d'un envahissement médullaire par des lymphoblastes responsables de cytopénies myéloïdes. L'inhibition de l'hématopoïèse normale entraîne une ou plusieurs cytopénies myéloïdes. L'insuffisance médullaire est quasi constante. Les manifestations cliniques sont liées aux cytopénies. On retrouve de façon plus ou moins complète :

- **Un syndrome anémique d'origine érythrocytaire** (pâleur cutanéomuqueuse, palpitations, tachycardie, fatigabilité et dyspnée à l'effort).

- **Un syndrome hémorragique d'origine plaquettaire** (hémorragies cutanées, pétéchiales et des muqueuses, hématomes et saignements aux points de piqûres évocateurs d'une coagulation intra vasculaire disséminée ou CIVD).
- **Un syndrome infectieux d'origine granulocytaire** : (fièvre, angine, pneumopathie, lésions surinfectées).

6-2- Syndrome tumoral :

Due à la prolifération cellulaire anarchique (adénopathies, splénomégalie, hépatomégalie, et touchant parfois des localisations neuroméningées, cutanées et testiculaires).

- **Pour les LAM** : Assez rare, s'exprime par des tumeurs localisées (chlorome), une hypertrophie des organes hématopoïétiques (adénopathies diffuses, symétriques et indolores, splénomégalie et/ou hépatomégalie), les adénopathies sont plus fréquentes dans les formes de LAM à composante monoblastique (LAM 4 et LAM 5).

- **Pour les LAL** : On trouve des atteintes tumorales des organes lymphoïdes secondaires, plus fréquemment dans les LAL T où le syndrome tumoral lymphoïde entraîne des adénopathies superficielles, symétriques, fermes, indolores et mobiles, touchant toutes les aires, mais en particulier cervicales. Les adénopathies profondes sont avant tout médiastinales et mises en évidence par une radiographie du thorax. L'atteinte médiastinale est associée à une LAL-T dans 95 % des cas. Il peut exister une splénomégalie, une hépatomégalie, une néphromégalie (LAL de la lignée B). On note la présence également d'atteintes tumorales non lymphoïdes, neuro-méningées, mais plutôt lors des phases évolutives (rechutes) ou tardives et avancées de la maladie hématologique. Elles sont responsables de paralysie des nerfs crâniens, de troubles sensitifs, et d'un syndrome d'hypertension intracrânienne (céphalées, vomissements, somnolences, fond d'oeil pathologique).

- **Pour les LMC** : Une splénomégalie quasi-constante, pouvant parfois atteindre la fosse iliaque droite. Elle est dure et indolore, sauf s'il existe un périsplénite (infarctus) ; Une pesanteur dans l'hypochondre gauche, satiété rapide et troubles digestifs en sont souvent les manifestations. Une hépatomégalie, rare au début de la maladie, est souvent présente à la fin, les adénopathies sont exceptionnelles, et des ostéodynies sont assez fréquentes.

- **Pour les LLC** : La symptomatologie se caractérise d'avantage par une hypertrophie des organes lymphoïdes avec de volumineuses adénopathies

superficielles, plutôt symétriques, et souvent généralisées, leurs tailles restent cependant modérées, dépassant rarement 4 cm de diamètre. La splénomégalie peut être isolée ou associée aux adénopathies. En général, elle est limitée, ne dépassant l'ombilic que dans très peu de cas. L'hépatomégalie est exceptionnelle.

6-3- Syndromes particuliers :

Ø **syndrome de CIVD (coagulation intravasculaire disséminée) :** La CIVD est une coagulopathie résultante d'une activation anormale de la coagulation et qui est due au fait que les blastes contiennent dans leurs grains cytoplasmiques des protéines dont la libération aboutit à l'activation intravasculaire excessive de la prothrombine en thrombine, entraînant une diffusion du processus de transformation du fibrinogène en fibrine et la consommation des facteurs de la coagulation (fibrinogène, facteur V) et une réaction du système fibrinolytique. La CIVD est constamment constatée au cours de l'évolution d'une LAM 3 et peut être observée dans les LAM 4 et 5, surtout hyperleucocytaires. Pour les LAL, seulement 15 % des cas présentent une CIVD évidente ou latente (23).

Ø **Syndrome d'hyperviscosité et de leucostase :** La présence de blastes sanguins peut être massive dépassant > 100 Giga/l. Un tel envahissement engendre des troubles de la microcirculation et de la perfusion tissulaire regroupés sous le terme de syndrome d'hyperviscosité ou de leucostase (défaillance respiratoire aiguë avec oedème pulmonaire lésionnel, leucostase pulmonaire accompagnée d'une détresse respiratoire, hypoxie, leucostase cérébrale générant une anoxie cérébrale et parfois une hémorragie). Les grandes hyperleucocytoses blastiques génèrent également un risque de thromboses artériolaires micro emboliques ou de thromboses veineuses avec migration, d'autant plus, qu'il existe une CIVD associée. Les formes monoblastiques de LAM sont particulièrement exposées au risque de leucostase. Pour les LAL, seules les formes très hyperleucocytaires de LAL (> 200 Giga/l) peuvent donner un syndrome de leucostase. La leucostase est souvent tardive dans les LAL car les cellules blastiques sont de petites tailles (23).

Ø **Syndrome de lyse tumorale :** Les cellules tumorales sont capables d'induire spontanément des complications métaboliques liées à la libération massive des produits de lyse cellulaire. Ces complications sont regroupées sous le terme de syndrome de lyse tumorale. Il s'agit d'hyperuricémie, d'hyperphosphorémie ou d'augmentation du lysozyme sérique ou muramidase. Il s'agit d'enzymes des cellules granuleuses, possédant une fonction physiologique de bactériostase. Sa forte excrétion urinaire entraîne une tubulopathie distale avec fuite majeure de potassium et hypocalcémie observées surtout dans les LAM 4 et 5. Les troubles métaboliques du syndrome de lyse sont fréquemment associés à un syndrome de défibrination lié à la libération de facteurs cellulaires à activité procoagulante. Il associe hypofibrinogénémie, thrombopénie, abaissement du temps de Quick et du facteur V, augmentation du taux des D-Dimères (23).

7- Symptomatologie biologique :

Pendant de nombreuses décennies, le diagnostic en matière d'oncologie hématologique dont les leucémies font partie, était le privilège des cytologistes. L'aisance du prélèvement sanguin, médullaire et ganglionnaire par ponction, la simplicité des techniques de coloration a contribué à ça (23). Certes, l'étude cytologique quantitative et qualitative restent la base du diagnostic journalier à travers la réalisation du frottis sanguin et médullaire, hémogramme et myélogramme ; Mais, des changements prodigieux sont intervenus avec la découverte des anomalies du caryotype, des oncogènes et le typage cellulaire par l'étude des antigènes de membrane grâce aux anticorps monoclonaux (39).

Le diagnostic biologique est indispensable pour confirmer le type de leucémie en cause. Cependant, certains examens sont plus importants que d'autres. Frottis sanguin et médullaire, hémogramme et myélogramme restent des examens systématiquement réalisés en présence d'hémopathies, les réactions cytochimiques spécifiques sont utilisées parfois pour préciser le caractère myéloïde ou lymphoïde de la prolifération. Les résultats obtenus par ces techniques sont parfois non concluants, ceci en présence de cas difficiles à classer surtout dans les LA.

Le caryotype sanguin ou médullaire et l'immunophénotypage sont des examens très spécifiques, résultat de l'existence d'anomalies cytogénétiques et d'antigènes de surface membranaire caractéristiques d'une leucémie ou d'un sous-type leucémique.

D'autres examens, d'ordre biochimique, peuvent être réalisés dans un but thérapeutique pour palier à d'éventuels diminution ou excès (voir tableau 2).

Tableau 2 : Récapitulatifs des caractéristiques biologiques des LMC, LLC, LAM et LAL.

Type de leucémie	Résultats de l'analyse biologique
LA	<p>L'hémogramme : montre :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Une blastose sanguine d'importance variable. Lorsqu'elle est importante, elle détermine une hyperleucocytose (leucocytes > 10000 c/mm³). A l'opposé, les blastes peuvent être absents du sang circulant, ou en très petit pourcentage, et l'hémogramme montre alors une leucopénie (leucocytes < 4000 c/mm³). - Une neutropénie (polynucléaires neutrophiles < 1500 c/mm³), tandis que le nombre de lymphocytes est habituellement normal, une monocytose peut se voir dans les LAM origine monocyttaire. - Une anémie quasi constante (90 % des cas) normochrome, normocytaire et arégénérative d'intensité variable. - Une thrombopénie très fréquente (90 % des cas), d'intensité variable, majeure en cas de CIVD. <p>Le myélogramme : Permet de confirmer le diagnostic et montre :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Une moelle de richesse normale ou augmentée (il existe des formes assez rares de LA a moelle pauvre) - Une blastose médullaire, par définition supérieure à 30 % (limite ramenée à 20 % dans la classification récente de l'OMS pour les LAM, toujours à 30 % dans les LAL) souvent massive > 80 %, faite blastes (myéloblastes et/ou monoblastes dans les LAM et de lymphoblastes dans les LAL) au rapport nucléocytoplasmique élevé et avec un noyau porteur d'un ou plusieurs nucléoles. - les lignées normales résiduelles sont soit pratiquement absentes (en cas de blastose médullaire proche de 100 %), soit nettement diminuées. - L'analyse morphologique, cytochimique et immunologique des blastes présents dans la moelle et le sang permet de préciser le type de LA. <p>Autres examens biologiques :</p> <ul style="list-style-type: none"> - La recherche de troubles de la coagulation qui combinent CIVD et fibrinolyse et se traduisent par l'association de signes de "consommation" des facteurs de coagulation (hypofibrinogénémié, baisse du facteur V et du facteur VIII) et des signes de fibrinolyse (élévation des PDF et des D dimères, raccourcissement du temps de lyse des euglobulines). - Le bilan biochimique qui montre habituellement une hyperuricémie, parfois une hyperphosphorémie, une hypo- ou une hyperkaliémie. - L'immunophénotypage des cellules leucémiques par l'utilisation d'anticorps monoclonaux caractérise la lignée myéloïde et/ou lymphoïde à différents stades de différenciation. Les marqueurs myéloïdes sont le CD 13 et le CD 33. Ils sont parfois associés à l'expression de marqueurs de progéniteurs tels le CD 34 et les marqueurs de différenciation lymphoïde sont négatifs dans les LAM. Pour les LAL c'est surtout l'appartenance à la lignée B ou lignée T, ainsi que le stade de maturation qui doit être déterminé. L'antigène CD 10 ou CALLA (Commun Acute Lymphoblastic Leukemia) est présent dans la plupart des LAL de l'enfant et corrélé à un bon pronostic.
LMC	<p>L'hémogramme : assez caractéristique en général avec</p> <ul style="list-style-type: none"> - Une hyperleucocytose, en moyenne de 120000 c/mm³, avec un pourcentage de polynucléaires neutrophiles souvent abaissé de l'ordre de 40 à 50 %. - Une myélémie en moyenne de 25 % (1 à 60 %), cependant, la blastose périphérique est toujours faible de l'ordre de 1 à 5 %. - Une basophilie nette absolue est très caractéristique de la maladie et toujours présente dès qu'il y a plus

de 100000 globules blancs/mm³.

- Les plaquettes sont très fréquemment augmentées avec un taux de l'ordre de 500000/mm³.
- Une anémie peut être présente, mais la moyenne du taux de l'hémoglobine est en général aux alentours de 12 g/dl.

Le myélogramme :

- Un myélogramme très riche avec plus de 80 à 90 % de cellules de la série granuleuse avec un contingent important de myélocytes, diminution des érythroblastes et augmentation des mégacaryocytes qui sont souvent de petite taille.
- La biopsie de moelle confirme l'hyperplasie du tissu myéloïde avec presque disparition des cellules graisseuses, augmentation du nombre absolu de mégacaryocytes, assez rarement une densification de la réticuline.

Autres examens biologiques :

- Les phosphatases alcalines leucocytaires sont classiquement effondrées.
- L'hémostase primaire montre souvent des perturbations liées à une thrombopathie acquise.
- Le bilan biochimique, fréquemment normal dans les formes de début, peut montrer ultérieurement une élévation du taux de la lactico-déshydrogénase, une hyperuricémie avec uraturie, une augmentation du lysozyme sanguin et urinaire et de la vitamine B 12.

LLC

L'hémogramme : montre le plus souvent :

- Une lymphocytose est supérieure à 5000 c/mm³, retrouvée sur une période de plusieurs mois (signe constant), parfois très élevé (> 100000 c/mm³). Les lymphocytes sont d'aspect cytologique comparable à des lymphocytes normaux, même si de petites atypies nucléaires sont possibles. Il peut exister un petit contingent de lymphocytes un peu plus grand.
- Une anémie ou une thrombopénie est observée chez environ 15 % des patients et à une valeur pronostique péjorative.
- l'existence d'une neutropénie est suggestive d'une forme particulière de LLC : la LLC à cellules T, dans ce cas, les lymphocytes ont un noyau irrégulier et un cytoplasme plus clair que les lymphocytes des LLC B et peuvent contenir de fines granulations azurophiles et sont appelées leucémies à grands lymphocytes granuleux).

Le myélogramme : peu indicatif et montre :

- Une lymphocytose médullaire augmentée, en général > 30 % dans une moelle de richesse normale ou accrue.
- Les phénotypes des lymphocytes médullaires sont identiques à ceux des lymphocytes sanguins.

Autres examens biologiques :

- L'immunophénotypage des lymphocytes circulants est un examen essentiel pour le diagnostic précis d'une hémopathie lymphoïde. Les lymphocytes de la LLC sont dans plus de 95 % des cas, des lymphocytes B présentant les antigènes suivants : CD 5 (considéré initialement comme un marqueur T mais en fait également exprimé par environ 15 % des lymphocytes B normaux du sang), CD19, CD23 et des immunoglobulines M de surface. Ces Ig M de surface sont monotypiques (même chaîne légère soit kappa soit lambda) ce qui permet d'affirmer le caractère clonal de la prolifération. Le marqueur FMC7 est en général négatif alors qu'il est positif dans les leucémies polylimphocytaires ou dans certains lymphomes. Dans moins de 5 % des cas les cellules sont de type T, développées à partir des lymphocytes CD 4 et co-expriment les antigènes CD 2, CD 3, CD 5 et CD 7. Quelques proliférations sont de phénotype CD 8 et co-expriment les antigènes CD 4 et CD 8.
- Une diminution des Ig est observée dans 10 à 60 % des cas.
- Une Ig monoclonale est retrouvée dans environ 5 % des cas, le plus souvent de type IgM.

8- Pronostic :

Le pronostic permet de prédire l'évolution de la maladie en fonction de certains facteurs et le choix et/ou la réponse future aux traitements administrés. Le système de pronostic est le plus souvent basé sur un score avec une notation particulière pour des éléments de diagnostics majeurs. On a le score de sokal pour la LMC et le score de RAI pour la LLC (leucémies chroniques sujettes à évolution) (45).

Ø Pour les LAM : Les facteurs de mauvais pronostic des LAM sont : l'âge supérieur à 60 ans, le caractère secondaire de la LAM, l'hyperleucocytose > 30 Giga/l, le type cytologique M 7 ou M 0, les aspects de LAM avec dysmyélopoïèse (les formes cytologiques avec corps d'Auer seraient plus favorables). L'envahissement neuro méningé au diagnostic, les leucémies bi phénotypiques (myéloïde et lymphoïde), l'expression du marqueur d'immaturité CD 34 et la non obtention d'une aplasie non blastique à J 15 et/ou d'une rémission complète après une ligne de chimiothérapie : ils constituent des facteurs très puissants du pronostic défavorable.

Les anomalies cytogénétiques des LAM peuvent être regroupées en trois catégories en fonction de leurs valeurs pronostiques : celles de pronostic favorable : t(8 ;21) (LAM 2); t(15 ;17) (LAM 3) ou t(16 ;16) ou inversion inv (16) (LAM 4eo), celles de pronostic défavorable : délétions du chromosome 7, +8, anomalie du 5q, anomalies chromosomiques complexes et celles de pronostic intermédiaire : caryotype normal ou anomalies du B (46).

Ø Pour les LAL : Dans les LAL, les facteurs de pronostic sont surtout reconnus dans les LAL de l'enfant. Sont de pronostic favorable : le sexe féminin, un âge compris entre 4 et 15 ans, absence de tuméfaction des organes hématopoïétiques, absence d'une hyperleucocytose majeure, une LAL "commune" d'origine "pré" B (porteuse de l'antigène CD 10 ou Calla), un caryotype montrant plus de 50 chromosomes (hyperdiploïdie) ou une t (12; 21). Le taux de guérison de ces formes est d'environ 90 % avec la chimiothérapie. Sont de pronostic défavorable : le sexe masculin, un âge un age inférieur à 12 mois et surtout 6 mois ; supérieur à 10 ans et surtout 15 ans. Le pronostic est particulièrement sombre après 60 ans essentiellement en raison de la fréquence du chromosome Ph 1 dans cette catégorie d'âge. Un syndrome tumoral, une hyperleucocytose importante et surtout une translocation chromosomique sont de mauvais pronostic. A l'extrême, la présence d'une translocation t (9;

22) ne permet pratiquement aucune chance de guérison par la chimiothérapie seule. Chez l'adulte : les facteurs pronostiques sont moins bien tranchés, ne seraient-ce que parce qu'ils n'existent pas, comme chez l'enfant, de formes de "bon" pronostic, mais le caractère péjoratif des translocations et de l'hyperleucocytose est également à noter. Sous traitement : les principaux facteurs pronostiques sont la réponse précoce à la chimiothérapie (notamment aux corticoïdes) et l'évolution de la maladie résiduelle par PCR (seule méthode sensible d'évaluation) utilisant les réarrangements des chaînes d'immunoglobulines (LAL de type B) ou des récepteurs T (LAL de type T et souvent B). Sont de bon pronostic une maladie résiduelle <1 % après le traitement d'induction, et <1 ‰ après le traitement de consolidation (47).

Ø Pour la LMC : Il s'agit d'une affection régulièrement mortelle après une durée variable (médiane de survie de 4 ans). L'évolution naturelle se fait vers une transformation en leucémie aiguë, soit directement, soit après une phase intermédiaire dite phase d'accélération. Seule l'allogreffe de moelle chez des sujets jeunes et disposant d'un donneur histocompatible a permis de modifier l'évolution constamment fatale. Le pronostic est particulièrement sévère et la survie courte quelque soit les modalités de traitement. L'évolution se fait en 3 phases :

a- Phase chronique : Au diagnostic de la LMC.

b- Phase d'accélération : Dont les signes les plus caractéristiques sont : l'altération de l'état général, une augmentation du volume splénique, une aggravation de l'anémie, l'apparition d'une thrombopénie ou au contraire thrombocytose résistante au traitement, l'augmentation dans le sang et la moelle du pourcentage des formes cellulaires jeunes (blastes compris entre 10 et 20 %).

c- Phase d'acutisation ou transformation : Caractérisée par un état général qui se dégrade d'une manière sévère et d'une fièvre évolutive qui apparaît, l'hémogramme objective une anémie et une thrombopénie importante (23). La blastose sanguine et médullaire augmente, dépassant 20 % (critère de transformation en leucémie aiguë) ; blastes majoritairement myéloïdes, mais peuvent également être lymphoïdes B. Deux aspects morphologiques de la transformation sont connus :

- **Acutisation selon un mode lymphoïde :** Correspond à environ 1/3 des acutisations. Le plus souvent la phase d'accélération est discrète ou absente, les aspects morphologiques et immunophénotypiques sont ceux d'une LAL typique. Il s'agit dans la quasi-totalité des cas d'une LAL, CD 10+ (très rares cas de LAL – T) et sur le plan cytogénétique, diverses anomalies se surajoutent au chromosome Philadelphie (23).

- **Acutisation selon un mode myéloïde :** Correspond à environ 2/3 des acutisations, l'installation est souvent plus lente, sur une durée de plusieurs mois. Le tableau est parfois celui d'une LAM classique, avec ou sans différenciation (myéloblastique ou monoblastique), mais souvent la LAM est composite, avec mélange de myéloblastes, de proérythroblastes et de promégacaryoblastes (23).

Ø Pour la LLC : Le pronostic des patients avec LLC est très variable et n'est qu'imparfaitement prévisible. Il s'agit d'une maladie classiquement indolente sur de nombreuses années, avec cependant une grande variabilité d'évolution allant jusqu'à des formes très agressives conduisant au décès en quelques mois. L'évolution vers un lymphome B à grandes cellules s'observe chez 5 à 10 % des malades (syndrome de Richter). L'identification de facteurs pronostiques précoces est donc un enjeu majeur dans cette maladie. Deux classifications pronostiques anatomo-cliniques sont couramment utilisées (classification de RAI et celle de BINET) (48).

9- Traitements :

Les protocoles thérapeutiques modernes ont révolutionnés le pronostic des leucémies en général et plus particulièrement celui de la LAL de l'enfant, de la LAM promyélocytaire et la LMC, c'est dans les LAM que les progrès restent à faire (23).

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

Ø **Le traitement symptomatique :** Qui consiste à palier les syndromes d'insuffisance médullaire en s'attaquant à la pancytopenie par des transfusions, ainsi qu'aux complications infectieuses par une antibiothérapie appropriée.

Ø **Le traitement de fond :** Qui est basé sur une polychimiothérapie lourde dont la nature et le protocole dépendent de l'identification précise de la maladie et de ses facteurs pronostiques. Les drogues utilisées dites cytostatiques se répartissent entre antimétaboliques directs (6-mercaptopurine, méthotrexate, cytosine arabinoside) et indirects (asparaginase), alkylants (cyclophosphamide), antibiotiques (rubidomycine, adriamycine), poisons du fuseau (alcaloïdes de la pervenche, vincristine, vinblastine), hormonaux (prednisone). Tous les médicaments utilisés sont toxiques (à part la prednisone et dans une moindre mesure la vincristine, sont aplasants). (32).

La prise en charge moléculaire, plus spécifique est utilisée actuellement pour le traitement de la LAM promyélocytaire et de la LMC, et constitue une perspective thérapeutique très prometteuse.

10- La cancérogenèse des leucémies (leucémogénèse) :

Dans les organismes pluricellulaires, chaque cellule constitue une entité morphologiquement et fonctionnellement distincte, mais qui reste toutefois, soumise en permanence à des mécanismes de contrôle et de régulation extrêmement rigoureux. Parfois, les cellules échappent à ces systèmes qui inhiberaient leurs multiplications et se comportent ainsi comme des cellules embryonnaires primitives avec une incapacité partielle ou totale à subir les transformations morphologiques et fonctionnelles qui devraient leur permettre de se différencier, de se spécialiser en une cellule mature : c'est le cancer (49), (50).

La naissance d'un clone cellulaire dit « transformé » résulte de l'accumulation dans une seule cellule d'évènements rares et non liés entre eux (mutations). Chaque étape correspond au franchissement d'un des obstacles qui s'opposent, physiologiquement et en permanence, au développement d'une prolifération cellulaire anarchique. C'est un processus « multi étapes », découpé en 3 phases critiques : initiation, promotion et progression (51), (42).

Les principales cibles des altérations génétiques responsables du cancer sont celles des gènes impliqués dans la régulation positive et négative de la prolifération, de la différenciation, de la sénescence et de l'apoptose cellulaire ainsi que les gènes responsables du maintien de l'intégrité du génome (mécanisme de réparation de l'ADN, check points et surveillance du déroulement de la ségrégation des chromosomes au cours de la mitose) (51).

Dans les cancers hématopoïétiques et lymphoïdes regroupant les leucémies et les lymphomes, la prolifération est monoclonale, vérifiée dans de nombreux cas à l'aide de marqueurs phénotypiques (le polymorphisme du gène G6PD) ou à l'aide de marqueurs génotypiques (étude du réarrangement somatique des gènes des immunoglobulines ou des récepteurs T) (52).

10-1- Les mécanismes moléculaires de la cancérisation :

La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans les cancérisations repose sur l'étude de deux grands types de gènes : les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur. Au niveau moléculaire, la cascade d'évènements conduisant à la transformation maligne comporte donc non seulement des étapes d'activation d'oncogènes impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire, mais aussi, des phénomènes de suppression de blocages cellulaires de sécurité exercés en permanence par l'environnement cellulaire ou par la cellule elle-même (53).

10-1-1- Les oncogènes :

Le proto-oncogène (c-onc) est un gène cellulaire, susceptible de devenir, par suite d'une modification qualitative ou quantitative d'expression, un gène transformant capable de conférer le phénotype cancéreux à une cellule normale eucaryote. Ces gènes cellulaires physiologiquement impliqués dans le contrôle des processus de maturation, de division et de différenciation cellulaire et dont l'altération dite : « activation », peut entraîner la transformation cellulaire maligne. L'altération oncogénique est responsable d'un gain de fonction donc ces oncogènes agissent selon le mode dominant. En effet l'activation d'un seul des deux allèles favorise l'apparition d'un cancer (54).

Pour caractériser un oncogène il faut identifier : La protéine codée par ce proto-oncogène dans les conditions normales, le rôle physiologique de ce proto-oncogène et les modifications quantitatives ou qualitatives, pouvant transformer cette protéine normale en une protéine oncogénique.

Les oncogènes sont répartis en 5 grandes classes en fonction des onco-protéines pour lesquels ils codent : les facteurs de croissance, les récepteurs aux facteurs de croissance généralement à activité tyrosine kinase (RTK), les protéines cytoplasmiques transductrices de signaux, les protéines G : GTP (Guanosine Tri Phosphate) dépendantes, les facteurs de transcription et les gènes de contrôle de l'apoptose.

Les proto-oncogènes correspondent à des gènes qui codent pour des protéines nécessaires au développement, à la division ou à la survie des cellules normales. Les proto-oncogènes peuvent se transformer en oncogènes de différentes façons :

- Par une mutation qui altère la séquence nucléique et la structure de la protéine, la rendant plus stable, constitutivement activée ou lui conférant une nouvelle fonction.
- Par une mutation au niveau des séquences régulatrices ce qui induit une surexpression de la protéine normale, une expression à un moment inhabituel dans le cycle cellulaire ou encore une expression ectopique dans un type cellulaire aberrant.
- Lors d'un réarrangement chromosomique, la régulation de l'expression du proto-oncogène normale peut se retrouver dans un environnement différent et provoquer une surexpression de la protéine normale ou une expression atypique.

- Lors d'une modification épigénétique, le promoteur d'un proto-oncogène peut se retrouver hypométhylé ce qui provoque l'expression de l'oncogène.

Ces différentes modifications peuvent participer à la dérégulation d'une cellule et au développement d'un cancer. Actuellement, plus de 100 oncogènes ont été décrits dans les hémopathies malignes humaines. Ces gènes codent pour des protéines de fonctions très diverses dont le dysfonctionnement est responsable de la production d'une protéine de fusion chimérique (exemple bcr-abl) ou de la surexpression d'une protéine oncogénique (voir annexe ; voir tableau 9 et 10).

10-1-2- Les gènes suppresseurs de tumeur :

Les anti-oncogènes aussi appelés gènes suppresseurs de tumeur sont, dans les cellules normales, des régulateurs négatifs de la division cellulaire ; Ils empêchent ainsi une prolifération excessive. Lorsqu'ils sont absents ou déficients, ils peuvent être à l'origine de certains cancers. Les mutations de ces gènes sont généralement récessives car l'inactivation des deux allèles est nécessaire pour la tumorigenèse.

Il existe plusieurs types de gènes suppresseurs de tumeur, impliqués dans le développement des hémopathies malignes : ceux responsables des contrôles entre les étapes critiques du cycle cellulaire, ce sont des points de contrôle de qualité ou « check point », qui ont pour but de vérifier l'intégrité de la transmission d'ADN de la cellule mère vers les cellules filles (entre G 1 et S, entre G 2 et M). Les gènes de surveillance du cycle cellulaire et les gènes de réparation de l'ADN (organisés en 2 grands systèmes : le système de réparation des mésappariements MMR et le système de réparation par excision de nucléotide NER) (55).

L'altération d'un seul des deux allèles peut induire l'inactivation du second. Ceci peut être provoqué par :

- Une mutation qui altère la séquence nucléique et la structure de la protéine, la rendant non fonctionnelle. Par exemple, la création d'un codon stop dans le cadre de lecture induit la synthèse d'une protéine tronquée.
- Une mutation au niveau des séquences régulatrices ce qui induit une perte d'expression de la protéine normale.

- Lors d'un réarrangement chromosomique, le gène suppresseur de tumeur peut se retrouver dans un environnement différent et provoquer une perte d'expression de la protéine normale.
- Par une délétion de la région chromosomique contenant la séquence du gène suppresseur de tumeur.
- Lors de modification épigénétique, la région régulatrice peut se retrouver hyperméthylée et ne plus être transcrite en ARNm.

10-2- Les méthodes d'analyse des anomalies cytogénétiques dans les leucémies :

Les techniques de FISH (hybridation in situ en fluorescence) ont été utilisées pour compléter le caryotype conventionnel. Ces techniques se sont développées depuis une douzaine d'années grâce à la disponibilité de sondes moléculaires marquées ou révélées par un ou plusieurs fluorochromes qui s'hybrident sur les séquences homologues dans les chromosomes (FISH sur métaphase) ou les noyaux (cytogénétique interphasique). La détection des signaux spécifiques se fait au microscope à fluorescence équipée de filtres spécifiques de chacun des fluorochromes employés et le plus souvent couplé à une caméra et un logiciel d'analyses d'images. Trois grands types de sondes sont utilisés en cytogénétique hématologique : Sondes centromériques ou du bras long de l'Y et les sondes locus spécifiques ou séquence unique qui permettent de mettre en évidence des anomalies de structure cryptiques comme les insertions de séquences de trop petite taille qui échappent au caryotype conventionnel. Ces insertions sont mises en évidence dans 5 % des cas de leucémie myéloïde chronique ou de leucémie aiguë promyélocytaire, elles correspondent le plus souvent à des caryotypes normaux. Les techniques moléculaires peuvent mettre en évidence le transcrite chimérique spécifique de la pathologie alors que la FISH montre des signaux de fusion correspondant à la juxtaposition des gènes impliqués. La nomenclature fait suivre la formule chromosomique obtenue par le caryotype conventionnel du résultat obtenu par hybridation in situ (ish). L'utilisation des sondes de peinture chromosomique reste réservée au cas les plus complexes (56), (57).

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

marqués par 2 fluorochromes différents et hybridés sur des métaphases normales. L'analyse des rapports d'intensité entre les 2 fluorochromes au niveau de chaque bande chromosomique est effectuée par un logiciel et permet de mettre en évidence des régions délétées ou amplifiées. La CGH est particulièrement utile dans les pathologies où l'index prolifératif est faible et où les délétions et les amplifications sont fréquentes comme les pathologies lymphoïdes chroniques, qui dans lesquelles, s'accumulent des lymphocytes matures (58).

Le développement en parallèle des techniques d'amplification génique par PCR (polymérase chain réaction) ont très largement modifiées les pratiques, et, sans se substituer à la cytogénétique, permettent une prise en charge fiable du diagnostic et du suivi de certaines hémopathies. Il peut s'agir de PCR conventionnelle ou de PCR quantitative, appliquée soit à un ADN génomique soit à un ADN complémentaire (59).

Le choix de la méthode dépend de la cible à étudier et de la localisation des points de cassure sur l'ADN. Les cassures exoniques ou introniques très regroupées pourront être analysées à partir de l'ADN. Les cassures introniques très variables bénéficieront largement de la maturation et l'épissage des ARN permettant d'amplifier la jonction anormale entre 2 exons quelque soit la localisation des points de cassures dans les introns.

L'étude de la contrepartie moléculaire de ces réarrangements fournira les mêmes indications diagnostiques et pronostiques. Toutefois, alors qu'une étude chromosomique peut identifier l'anomalie quelle qu'elle soit, une analyse moléculaire ne peut identifier que le réarrangement précis pour lequel elle a été conçue (56).

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

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

- Recherche de la présence de 3 transcrits de fusion : BCR-ABL, MLL-AF4 et E2A-PBX 1. Ce dernier est présent dans les LAL de l'adulte, à laquelle il faut ajouter la recherche d'une fusion TEL-AML1 chez l'enfant et SIL-TAL dans les LAL T de l'adulte.

- Suivi et évaluation quantitative du transcrits BCR-ABL dans les LMC traitées par les anti-tyrosine kinases.
- Évaluation de la maladie résiduelle en fin d'induction dans la prise en charge des LAL, le plus souvent par PCR quantitative sur un marqueur de clonalité (des réarrangements de gènes d'immunoglobulines ou des TCR).

En conclusion, les outils de biologie moléculaire, de plus en plus performants, sont venus s'ajouter aux outils de cytogénétique et de cytogénétique moléculaire, et le recours raisonné à cet ensemble de techniques permet aujourd'hui une meilleure prise en charge des patients porteurs d'une hémopathie maligne (60).

10-3- Les anomalies cytogénétique dans les leucémies :

10-3-1- Les anomalies cytogénétiques des LMC :

Dans plus de 95 % des cas de LMC, on trouve une translocation entre le chromosome 9 et le chromosome 22 t (9; 22), conduisant à la formation du chromosome de Philadelphie. Les autres patients (5 %) ont d'autres translocations ou réarrangements géniques plus complexes aboutissant au même résultat final : la fusion du gène *bcr* présent sur le chromosome 22 avec le gène *abl* présent sur le chromosome 9, mais non identifiable par les techniques de cytogénétique (translocation cryptique). On la trouve dans les cellules des lignées rouges, plaquettaires, myéloïdes et lymphoïdes, ce qui démontre que la LMC est une affection de la cellule souche. La conséquence de la translocation t (9; 22) est la formation de la protéine de fusion BCR-ABL qui est une tyrosine kinase cytoplasmique active (61).

Il s'agit d'un réarrangement génétique au cours duquel la très grande majorité des séquences *abl* situées sur le chromosome 9 sont fusionnées à une région spécifique (*breakpoint cluster region* ou *bcr*) d'un gène situé sur le chromosome 22, le gène *bcr*. Dans la totalité des translocations t (9; 22), la cassure chromosomique au niveau du chromosome 22 s'effectue à deux endroits :

- au cours de la LMC, la cassure a lieu au sein d'une région de 5 kb désignée sous le nom de M-bcr (*major breakpoint cluster region*). La molécule d'ARN qui en résulte après épissage est traduite en une protéine de 210 kDa (p210^{*bcr-abl*}).

- au cours des LAL, seul le premier exon du gène *bcr* participe à la protéine de fusion, donnant naissance à une molécule d'ARN hybride de 6,5 kb qui est traduit en une protéine de 190 kDa (p190^{*bcr-abl*}).

Ces 2 anomalies sont parfaitement identiques et ne peuvent être distinguées que par RT - PCR (reverse transcriptase- polymérase chain réaction) (62).

En phase d'acutisation et sur le plan cytogénétique l'évolution clonale suit habituellement la voie suivante : trisomie 8, iso (17q), doublement du Ph 1, et/ou trisomie 19. Quelques patients suivent une autre voie d'évolution : monosomie 17 ou del (17p), anomalie du chromosome 11, monosomie ou réarrangement du chromosome 7, plus rarement une anomalie cytogénétique comparable à celle des LA (63).

10-3-2- Les anomalies cytogénétiques des LAM :

Des anomalies chromosomiques clonales et acquises sont trouvées dans 50 à 70 % des patients présentant une LAM de novo ; 59 % chez les enfants et 52 % chez les adultes. Les techniques de haute résolution et les méthodes d'hybridation in situ ont permis d'augmenter ce pourcentage et déceler des translocations cryptiques.

Les translocations récurrentes, anomalies spécifiquement associées à un type particulier de leucémie, sont rencontrées dans 35 à 40 % des LAM avec anomalies clonales. Le taux et le type d'anomalie décelés dépendent de l'âge (64).

a- Les anomalies de structures (translocations) ; Peuvent être divisées en :

- **Translocations cytogénétiques récurrentes fréquentes ou quasi-spécifiques des LAM :** On rencontre souvent : la t(8; 21)(q22; q22) dans les LAM avec maturation (LAM 2), la translocation t(15,17)(q22;q12-21) et ses variantes dans la leucémie aiguë promyélocytaire (LAP) ou LAM 3, les remaniements du chromosome 16 inv(16)(p13q22) ou t(16; 16)(p13q22) dans les LAMM avec éosinophilie médullaire (M 4 Eo). Des remaniements de la bande chromosomique B observés dans 5 à 6 % des LAM et dans 50 % des LAM 5, le plus souvent a différenciation monocytaire; soit LAM 5a où les monoblastes sont immatures et de grandes tailles, soit LAM 5b où les monoblastes sont plus différenciés avec des monocytes et des promonocytes (65).

- **Translocations récurrentes rares des LAM :** On retrouve souvent : la $t(1;22)(p13;q13)$ dans les LAM 7 à mégacaryoblastes, et qui est restreinte à l'enfant de moins de 1 an. les anomalies du chromosome 3 ($inv(3)(q21;q26)$, $t(3;3)(q21;q26)$, $t(1;3)(p36;q21)$) représentent environ 2 % des LAM et moins de 5 % des LAM de l'adulte. La $t(6;9)(p23;q34)$ retrouvée dans les LAM 2 et la LAM 4 a composante basophile, la translocation $t(8;16)(p11;p13)$ observée dans les LAM 5 avec érythrophagocytose. La $t(9;22)(q34;q11)$, ou chromosome Philadelphie, observée dans environ 3 % des LAM, c'est la même translocation que celle trouvée dans la LMC et les LAL. Elle est souvent en mosaïque avec des cellules normales et est de mauvais pronostic, dans 85 % des cas, les LAM sont classées M 1, M 2 ou M 7 mais tous les types (sauf LAP) ont été observés. Cette anomalie représente 33 % des anomalies observées dans les LA bi phénotypique de l'adulte (LAM 0 avec marqueurs lymphoïdes), associé dans 30 % des cas à une monosomie 7. D'autres translocations encore plus rares impliquant la région 11 p15 observées dans des acutisations de LMC ou dans les LAM secondaires. Des translocations 12p13 sont observées dans 5 % des LAM et SMD. La translocation $t(16; 21)(p11;q22)$; anomalie non aléatoire des LAM avec morphologie variable (M 1, M 2, M 4, M 5, M 7) et des LMC acutisées. La $t(16; 21)(q24; q22)$, anomalie rare mais récurrente trouvé majoritairement dans les LAM secondaires avec des sous types variés (M 1, M 2, M 4, M 5, M 7). D'autres translocations ont été observées : $t(X;6)(p11;q23)$, $1(1;7)(p36;q34)$, $t(1;18)(q25;q23)$, $t(1;19)(q23;p13)$, $t(5,14)(q33,q32)$ (65).

b- Les anomalies de nombre :

- **Les délétions totales ou partielles :** La délétion interstitielle du bras long du chromosome 5 ou la perte d'un chromosome 5 est une anomalie fréquente dans les SMD et les LAM, observée dans les LAM de novo (7 % des caryotypes anormaux), rarement isolée, et souvent secondaire à un traitement ou à une exposition toxique, et retrouvée dans les formes indifférenciées, souvent classées M 0. La délétion interstitielle du bras long d'un chromosome 7 ou la perte d'un chromosome 7 est une anomalie récurrente des désordres myéloïdes, retrouvée chez 10 % des patients présentant un syndrome myélodysplasique ou une LAM de novo, souvent classées M 4 ou M 7, elles sont très souvent secondaires. Les autres délétions concernent le bras court du chromosome 3 et sont observées dans 2,9 % des LAM. La délétion du bras long du chromosome 9,

anomalie secondaire fréquente dans les LAM 2, avec souvent la t(8;21) comme anomalie primaire, isolée elle peut être retrouvée dans tous les sous-types de LAM (2 %). La délétion du bras court du chromosome 12 est moins fréquente dans les LAM (5 %) que dans les LAL, elle est observée dans 20 à 55 % des LAM à composante monocyttaire (M 4 et M 5), et est souvent associée à des caryotypes complexes avec anomalies du chromosome 5 et une trisomie 8. La délétion du bras court du chromosome 17 est observée dans 3 à 4 % des LAM, elle serait corrélée avec une dysgranulopoïèse dans les LAM (M 2 et M 6) et les SMD (65).

- **Les trisomies :** Identifiées dans 10 % des LAM avec anomalies cytogénétiques, les trisomies isolées comme les trisomies 13 et 21 représentent un facteur pronostique indépendant, mauvais en première rémission. D'autres trisomies (4, 14, 15,19, et 22) sont rencontrées.

La trisomie 8, la plus fréquente des trisomies rencontrées dans les LAM, représente 10 à 15 % de toutes les anomalies observées dans les LAM. Elle est observée dans les différents sous-groupes (M 1 à M 7). Elle représente l'anomalie secondaire la plus fréquente dans les LAM (1/3 des cas) ; dans 5 à 10 % des cas, elle est associée à l'inv(16), 20 % associée à la t(9 :11)(p22 ;q23), 15 % à la t(3 ;19)(q23 ;p13), 10 % à la t(6 ;11)(q27 ;q23), dans les LAM la trisomie 8 isolée est considérée comme de pronostic intermédiaire. Les tétrasomies ou pentasomies 8 sont observées dans les LAM monocytaires (M 4 ou M 5) de novo ou secondaires.

La trisomie 21 isolée, représente 1 % des anomalies des désordres hématopoïétiques et 2,5 % de l'ensemble des anomalies rencontrées dans les LAM. La trisomie 22 est souvent associée à une inversion du 16.

Les autres trisomies : la trisomie 4 décrite dans les différents sous-types de LAM, la trisomie 9 décrite comme anomalie primaire ou secondaire dans différents sous groupes (M 2, M 4, M 5), la trisomie 10 rapportée dans 15 cas de LAM avec marqueurs CD 7+ et CD 33+ dans différents sous-types (M 0, M 1, M 2 et M 6). La trisomie 11 isolée représenterait 2 % des anomalies dans les LAM de différents phénotypes (M1, M 2, M 4).

La trisomie 13 a été identifiée dans tous les sous-types de LAM, sauf les M 6 et M 7, et plus fréquemment dans les LAM 0. La trisomie 14 est retrouvée dans des divers désordres myéloïdes avec tous les sous-types. La trisomie 15 est rare, mais a déjà été

observée, seule ou associée à une perte chromosomique. La trisomie 19 est observée isolément ou plus particulièrement comme anomalie secondaire, et serait plus fréquente dans les LAM 7 (65).

- **Les trisomies partielles** : Sont le plus souvent liées à la présence de translocations déséquilibrées, conduisant à des trisomies partielles, souvent associées à des monosomies partielles. L'exemple classique est celui du del(7), par t(1;7) dicentrique ou non, correspondant à une trisomie 1q et une monosomie 7q. Cette anomalie a été trouvée dans 30 % des LAM précédées d'un SMD (65).

10-3-3- Les anomalies cytogénétiques des leucémies lymphoblastiques aiguës :

Des anomalies chromosomiques clonales sont retrouvées dans la majorité des cas de LAL ; 80 % chez l'enfant et 70 % chez l'adulte. Elles ont une valeur pronostique indépendante qui rend le caryotype indispensable avant la mise en route du traitement car il conditionne la thérapeutique. Bien que les techniques du caryotype soient particulièrement difficiles dans les LAL, le taux de réussite des caryotypes s'est considérablement amélioré au cours des dernières années. D'autres techniques comme la FISH et la RT PCR sont des compléments indispensables du caryotype car celui-ci peut être d'interprétation difficile dans cette pathologie. On distingue des anomalies de nombre et des anomalies de structure bien que ces deux types d'anomalies soient parfois associés (64).

a- Les anomalies de nombre :

Des anomalies de nombre isolées ou associées à des anomalies de structure sont présentes dans environ 50 % des LAL. Dans les LAL de l'enfant et de l'adulte, neuf groupes de ploïdie, peuvent être définis à partir du caryotype diploïde normal à 46 chromosomes :

- **Hypodiploïdie (41 à 45 chromosomes)** : Plus de 80 % ont un nombre modal à 45 chromosomes. En dehors de la perte de l'un des chromosomes sexuels (l'Y essentiellement), les chromosomes fréquemment impliqués sont les chromosomes 7, 9, 12, 17 et 20.

- **Near-haploïdie (25 à 29 chromosomes)** : La majorité des chromosomes est sous forme monosomique, mais la disomie est conservée pour les chromosomes 8, 10, 14, 18, 21 ainsi que les chromosomes sexuels.

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

- **hyperdiploïdie (47 à 50 chromosomes)** : Représente environ 15 % des caryotypes des enfants ou des adultes, associés dans 50 % des cas à des anomalies de structure, Les trisomies 8, 18, 19 et 21 sont les plus fréquentes, de répartition équivalente dans les LAL B ou T et de pronostic intermédiaire. La trisomie 8 isolée est considérée comme une anomalie récurrente rare dans les LAL T.

- **hyperdiploïdie à plus de 50 chromosomes (51 à 65 chromosomes)** : Représente environ 25 % des LAL chez l'enfant, 7 % chez l'adulte. Les chromosomes trouvés à l'état trisomique, les plus fréquemment impliqués sont les chromosomes 4, 6, 10, 14, 17, 18, 21 et X ; on trouve fréquemment quatre copies du chromosome 21.

- **Near-triploïdie (64 à 78 chromosomes)** : Très rare chez l'enfant (< 1 %), mais pouvant atteindre 3 % chez l'adulte âgé, ce type d'hyperdiploïdie est caractérisé par un profil non aléatoire et correspond à une duplication d'une forme « hypodiploïdie sévère ». Les chromosomes 3, 7, 15 et 17 sont fréquemment à l'état disomique et les chromosomes 1, 6, 8, 11, 18, 19, 21 et 22 à l'état tri ou tétrasomique.

- **Near-tétraploïdie (82 à 94 chromosomes)** : Groupe rare (1-2 %) résulterait de l'endoduplication d'un clone pseudodiploïde ou hyperploïde. Plus fréquente dans les LAL de la lignée T que B.

- **Pseudodiploïdie (46 chromosomes)** : Groupe hétérogène, plus élevé chez l'adulte que chez l'enfant (59 % et 42 %, respectivement) (66).

b- Les anomalies de structure :

- **Dans les LAL de phénotype B** : Les plus importantes sont : la translocation (9, 22)(q34; q11) ou chromosome Philadelphie, la translocation (4;11)(q21;q23) retrouvée dans 85 % des LAL et survenant avant l'âge de 1 an, la translocation (1;19)(q23;p13) retrouvée avec une fréquence quasi-identique (environ 5 %) dans les LAL de l'adulte et de l'enfant, la translocation (12; 21)(p13; q22) invisible en cytogénétique conventionnelle, car son diagnostic nécessite la FISH et la translocation (8;14)(q24; q32) avec ces rares formes variantes : t(2;8)(p13;q24) et t(8;22)(q24;q11) retrouvées dans le lymphome de Burkitt et les LAL type Burkitt correspondant aux LAL L 3 de la classification FAB (66).

- **Dans les LAL de phénotype T** : La majorité des translocations impliquent les gènes du récepteur T codant pour la chaîne alpha (TCR A), la chaîne delta (TCR D) et la chaîne bêta (TCR B) située en 7q35. Ces translocations sont retrouvées dans 30 % des cas de LAL-T. Les translocations impliquant la bande 10q24, les translocations (11;14)(p13;q11) et (11;14)(p15;q11) qui représentent 7 % des caryotypes anormaux dans les LAL-T l'enfant et 5 % de ceux de l'adulte, les réarrangements impliquant la bande 1p32.

D'autres translocations n'impliquant pas ces gènes : la translocation (10; 11) (p12; q13) retrouvée dans 4 % des LAL-T de l'enfant et 5 % de celles de l'adulte, la translocation (5; 14) (q35; q32) présente dans environ 22 % des LAL-T de l'enfant et 13 % des LAL-T de l'adulte (66).

- **Les anomalies de structure non spécifiques d'un phénotype B ou T** : Il s'agit le plus souvent d'anomalies secondaires à des types de délétions partielles du bras long du 6 (6q-), du bras court du 9 (9p-) ou du 12 (12p-) ou plus rarement isochromosomes (iso 9q, iso 17q, iso 21q), qui eux aussi, entraînent une perte de matériel chromosomique (respectivement 9p, 17p, 21p) mais aussi un gain (respectivement 9q, 17q, 21q). Par ailleurs des amplifications de matériel génétique, comme les amplifications du 21q22, correspondent à des images cytogénétiques de type hsr (homogeneously staining regions) ou mar (pour marqueur c'est-à-dire chromosome non identifié) (66).

10-3-4- anomalies chromosomiques dans la LLC :

La LLC a longtemps résisté à l'analyse chromosomique conventionnelle à cause de son faible index mitotique (de l'ordre de 1 %) et de l'accumulation des cellules en phase de repos (G 0). En effet, malgré l'introduction de cultures longues (72 à 96 h) en présence d'agents mitogènes des lymphocytes, seuls 40 à 50 % des cas étudiés présentent des anomalies chromosomiques clonales.

Malgré ces difficultés, quelques études pionnières ont, non seulement clairement démontrés le caractère non aléatoire des anomalies chromosomiques, mais ont contribué à la caractérisation des LLC, en identifiant des anomalies récurrentes voire quasi spécifiques dans le contexte des hémopathies lymphoïdes B chroniques : gain d'un chromosome 12 (trisomie 12), délétions partielles ou translocations impliquant les chromosomes 6, 11, 13 et 17, et plus rarement anomalies structurales affectant le chromosome 14 dans la bande 14q32, au locus des gènes codant pour les chaînes lourdes des immunoglobulines (67).

- **Délétions ou translocations affectant la bande 13q14** : Observées par FISH chez 55 % des malades (67).

- **Délétions 11q22-23** : S'observent chez environ 20 % des patients au diagnostic (67).

- **Trisomie 12** : Isolée, a été la première anomalie récurrente décrite dans la LLC et longtemps considérée comme l'anomalie cytogénétique la plus fréquente. Une trisomie 12 est rapportée dans 7 à 25 % des LLC par étude cytogénétique conventionnelle et dans 11 à 20 % des LLC par FISH. Par ces techniques FISH, la trisomie 12 est seulement la troisième anomalie la plus fréquente après les anomalies du 13 et du 11 (67).

- **Délétions/translocations du bras court du chromosome 17** : Observées dans 4 % des cas de LLC, elles sont responsables de la perte de la bande 17p13 (67).

- **Délétions/translocations du bras long du chromosome 6** : Comptent parmi les anomalies secondaires les plus fréquentes dans les pathologies lymphoïdes chroniques. Leurs incidences dans la LLC sont évaluées à 6 % sur des données obtenues par cytogénétique conventionnelle. Ces études distinguent deux points chauds de cassures, 6q15 et 6q23. Les études FISH ne retrouvent pas une incidence très différente : 7 % (67).

Matériel et méthodes :

1- Matériel :

- Automate pour analyse hématologique.
- Incubateur pour culture cellulaire (étuve) avec une pression de CO₂ modulable.
- Hotte à flux laminaire vertical.
- Centrifugeuse à grande vitesse.
- Bain marie thermostaté à 100° C +/- 0,1° C.
- Réfrigérateurs à 4° C, un congélateur à - 20° C.
- Microscope optique (Zeiss) équipé d'un système d'acquisition d'image, relié a un ordinateur muni d'un système de traitement d'image (logiciel BandViewTM EXPO 2.0 mis au point par Applied Spectral Imaging).
- Pipettes de 1000 (réglable) ,100 et 50.
- Pointes standard en boîtes.
- Pointes stériles en plastique.
- Lames et lamelles de microscope.
- Tubes de cultures en plastique jetable.
- Tubes de centrifugation en plastique jetable.

2- Réactifs :

- May-Grünwald.
- RPMI 1640 sans bicarbonate, sans L-Glutamine.
- Solution de bicarbonate de sodium 7,5 %.
- Streptomycine.
- Pénicilline.
- L-Glutamine (200 mM).
- Sérum humain.
- Colchicine à 20 mg / l.
- PHA C (phytohémagglutinine C).
- Héparine sodium Salt.
- Kcl (chlorure de potassium) a 5,6 g/l.
- Giemsa liquide.

- Méthanol.
- Acide acétique glacial.
- Huile à immersion.
- Milieu EBS (Earl Balanced Salt).
- phosphate de sodium anhydre (Na_2HPO_4).

3- Méthodologie :

Il s'agit d'une étude descriptive réalisée au niveau du laboratoire d'hématologie et de biologie génétique du CHU Constantine, respectivement pour l'étude hématologique et cytogénétique, des patients atteints de leucémie. Cette étude a concerné tous les patients chez lesquels une leucémie (LAM, LAL, LMC ou LLC) a été diagnostiquée entre le 01 janvier et le 01 juin 2005.

- Analyse hématologique :

- Ø Réalisation d'un hémogramme, aussi appelé formule numération sanguine (FNS), qui a pour buts de quantifier (numération) et de qualifier (frottis sanguin érythrocytaire, leucocytaire et plaquettaire) les éléments figurés du sang.
- Ø Réalisation du myélogramme ; il s'agit d'une étude quantitatif (numération) et cytologique (qualitatif) du frottis médullaire obtenu par ponction et aspiration de la moelle osseuse.
- Ø Réalisation d'un bilan biochimique.

- Analyse cytogénétique :

- Ø Appliquer la technique du caryotype simple réalisée sur prélèvement sanguin (sans dénaturation), actuellement en utilisation (pour le diagnostic de la trisomie 21 et les ambiguïtés sexuelles) sur des prélèvements de sang de patients leucémiques, et permettant de révéler uniquement des anomalies de nombre, ainsi que certaines grosses délétions.
- Ø Mettre au point la technique du banding –R (reverse) avec dénaturation par la chaleur, également réalisée sur prélèvement sanguin, et qui permette un examen plus fin du caryotype (translocations et délétions) ,idéal pour l'analyse cytogénétique des leucémies.
- Ø Mettre au point la technique du caryotype simple et du banding –R réalisée sur prélèvement de moelle osseuse.

3-1- Prélèvements :

- Prélèvement pour la réalisation de l'hémogramme :

- Il se réalise par ponction veineuse franche, chez un sujet qui n'est pas à jeun.
- Le prélèvement se réalise sur tube contenant comme anticoagulant un chélateur du calcium (EDTA : Ethylène acid Diamino Tétra Acétate), le mélange sang-EDTA doit être complet (mouvements répétés de retournement du tube).
- L'EDTA occasionne parfois une agrégation plaquettaire. Il en résultera une fausse thrombopénie si le nombre de plaquettes est mesuré par l'automate. En cas de suspicion, les plaquettes devront alors être recomptées après prélèvement sur un anticoagulant citraté.
- En cas de prélèvements multiples, ceux destinés aux analyses hématologiques (hémogramme et coagulation) doivent être réalisés en premier afin d'éviter un début d'activation des phénomènes d'hémostase à l'intérieur de l'aiguille du prélèvement.
- Les prélèvements ne doivent pas être réalisés dans une veine perfusée ou à partir d'une ligne de perfusion (risque de dilution du sang par le produit de perfusion).
- Les tubes sont calibrés pour des prélèvements de 5 ml, mais, en cas de prélèvements en micro méthodes pour nourrisson et petit enfant, les tubes sont de 1 ml (l'automate d'analyse hématologique utilise un échantillon de 100 µl).

- Prélèvement pour la réalisation du myélogramme :

- La ponction est réalisée au niveau d'un os en activité hématopoïétique (la moelle rouge des épiphyses, des os longs, et celle des os plats représente une organe hématopoïétique diffus, doué d'une importante activité).
- Le sternum chez l'adulte; il est réalisé environ un doigt en dessous du creux sus sternal, à l'aide d'un trocart jetable pour ponction sternale.
- L'épine iliaque postéro supérieure chez l'enfant, ou plus rarement, en épine iliaque antéropostérieur, sous anesthésie locale.
- L'anticoagulant est une solution SSPP (solution stable de protéines plasmatiques correspondant en pratique à une solution d'albumine humaine à 5 %) contenant de l'EDTA à 5 mg/ml et de l'héparine à raison de 5 U/ml.
- Une seringue plastique de 20 ml contenant 2 ml de solution anticoagulante SSPP-EDTA est dès lors adaptée au trocart et une ponction aspiration cytologique est réalisée .L'aspiration régulière retire au plus 1 cm³ de moelle osseuse de façon à ne pas diluer le prélèvement.

- Le délai de réalisation du myélogramme ou de culture de moelle ne doit pas excéder 1 h à température ambiante, 8 h si le produit est conservé à 4° C.

- Prélèvement pour l'étude cytogénétique :

Les prélèvements doivent être effectués selon une procédure précisant les conditions de prélèvement, de recueil et de conditionnement des échantillons. Pour la cytogénétique ; 2 conditions sont de rigueur :

- Les échantillons doivent être recueillis stérilement.
- Le laboratoire doit être prévenu de l'envoi d'un échantillon, dans la mesure du possible avant son prélèvement, afin d'en optimiser les conditions de recueil.
- 2 à 5 ml de sang seront prélevés stérilement sur héparine (l'héparine de lithium est l'anticoagulant de choix, on a utilisé par la suite l'héparine de sodium selon les recommandation du GFCH (Groupe Français de Cytogénétique Hématologique), l'utilisation de l'EDTA est déconseillé) faiblement dosée (10 à 20 U/ml de sang). Le sang peut être conservé à 4 ° C jusqu'à la certitude d'avoir obtenu une culture permettant la réalisation du caryotype (une durée maximale de 4 jours).
- On doit vérifier l'aspect anormal de l'échantillon, quantitativement et qualitativement (aspect laqué, dilué, présence de caillots, volume insuffisant ...).

3-2- Hémogramme :

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

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

3-3- Cytologie et frottis sanguin :

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

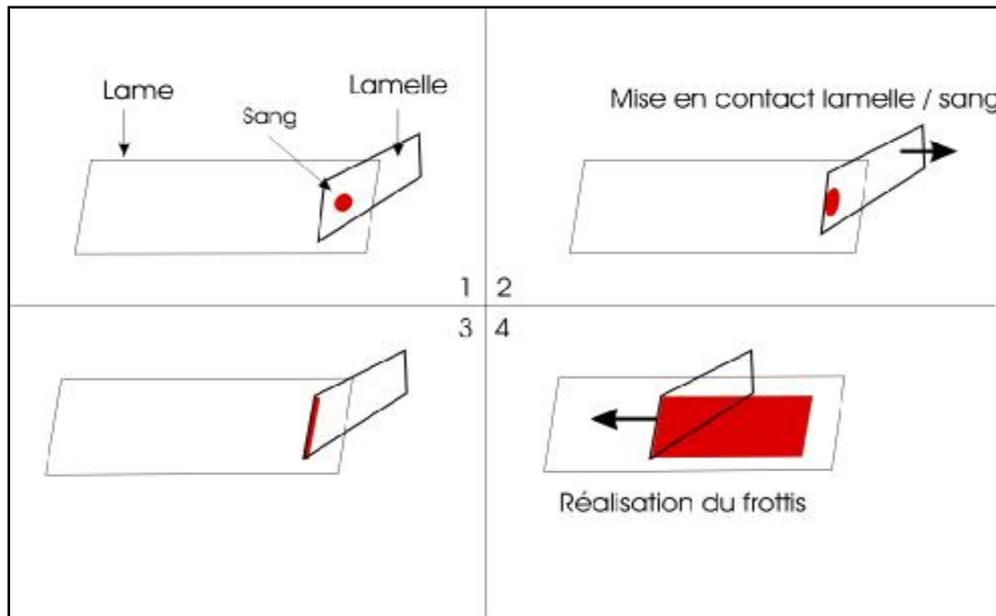


Figure 3 : La réalisation du frottis sanguin (Lacombe C, D1 – Hématologie 2005 – 2006.)

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

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

3- Coloration au Giemsa : On verse le contenu de l'éprouvette dans une boîte de Laveran. Dès que la lame est prête, on mélange en agitant doucement (le pouvoir

colorant est maximum au moment du mélange). On dépose ensuite la lame (frottis en dessous) dans la boîte, on laisse agir pendant 20 minutes (Giemsa lent) et on rince après sous un jet d'eau neutre.

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

Les réactions cytochimiques avec certains colorants spécifiques permettent de définir, le plus souvent, les sous-types de LAM et LAL : myéloperoxydase (MPO) et estérase, des colorants spécifiques pour les cellules des lignées myéloïdes et lymphoïdes, respectivement. C'est l'une des bases de la classification FAB (en complément de la cytomorphologie), mais non utilisée au niveau du service d'hématologie du CHUC (voir en annexe, le tableau sur la classification FAB des leucémies aiguës).

3-4- Cultures cellulaires :

- La mise en culture se fait dans des flacons du type Falcon avec le milieu de culture RPMI (sans L- glutamine), c'est un milieu de culture fourni prêt à l'emploi, mais qui nécessite une dilution de l'ordre de 1/10. Un minimum de deux cultures indépendantes est requis pour réaliser un caryotype.

- La composition du milieu de culture RPMI natif, appelé également milieu de Moore (référence : RPMI-1640 medium 10 x, sterile filtered, endotoxin tested. SIGMA) est indiqué dans l'annexe.

- Composition du milieu de culture RPMI prêt à l'emploi (préparé avant utilisation ex tempérament ou utilisé en aliquotes congelés a -20° C) :
 - milieu de culture RPMI natif : 5 ml.
 - bicarbonate : 1,350 ml.
 - 1 goutte de pénicilline (antibiotique).
 - 1 goutte de streptomycine (antibiotique).
 - 50 ml en qsp (en quantité suffisante pour) d'eau distillé stérile.
 - 7 gouttes de NaOH pour ajuster le pH.

Cela nécessite normalement l'utilisation d'un pH mètre, mais cette dernière pourrait contaminer le milieu de culture. On ajoute des gouttes successives de NaOH et on note le virage de couleur jusqu'à obtenir une teinte dite "épluchure d'ognon" (marron plus ou moins foncé). Le volume de 6 gouttes est une simple appréciation, qui a donné de bons résultats.

- Composition du milieu de culture de l'utilisation :
 - milieu de culture RPMI prêt a l'emploi : 6,5 ml.
 - serum de veau foetal : 1,5 ml.
 - PHA C (phytohémagglutinine) : 100µl (lyophilized powder to be solubilized with sterile demineralised water. BIOSEPRA).
 - héparine : 50 µl.
 - le sang (l'échantillon) : 200 µl.

Le sérum de veau foetal (très chère, sera remplacé par le sérum humain, de sérotype O, et qui a donné de bons résultats) nécessaire à chaque opération sera mis à part dans des flacons et congelé à - 4 ° C dans le congélateur classique (aliquotes). A l'utilisation, il sera décongelé dans l'étuve à 37 ° C.

La PHA C est un mitogène ; ultérieurement en réalisant des cultures cellulaires avec du sang de leucémique, il faut penser à enlever ou adapter la concentration de ce facteur. Comme les cellules cancéreuses ont perdu leur capacité de réguler leurs divisions, ils peuvent croître en absence de tout stimulus ; besoin physiologique in vivo et facteurs externes mitogène in vitro.

La culture est réalisée sur des flacon du type Falcon, elles sont disposés horizontalement dans une étuve a 37° C, pendant 72 heures (cultures brèves plus facile à réaliser, la culture à long terme n'est pas intéressante ici puisque le but ; c'est d'avoir des divisions).

L'observation des cultures sous microscope après 72 h n'est pas nécessaire, les manipulations pour l'obtention du caryotype seront entamées directement.

3-5- Caryotype standard : arrêt des mitoses, fixation, étalement et observation :

- Arrêt des mitoses :

On sort les cultures de l'étuve, elles sont restées 72 heures. Le blocage des mitoses en métaphase se fait par ajout de la colchicine à 150 µl. La colchicine est fournie au laboratoire sous 2 formes :

- En solution (eurobio) : prête à l'emploi.
- En lyophilisat (sigma, 500 mg, appreciatively 95 % HPLC, plant cell culture tested) : nécessite une préparation.
- On remet les tubes dans l'étuve à 37° C après addition de la colchicine, pendant 1 heure 30 en position horizontale pendant que la colchicine puisse agir.
- On centrifuge les tubes à 1500 tours/minute, pendant 5 minutes.

- Choc hypotonique :

- On jette le surnageant et on ajoute 0,5 ml de KCl à 5,6 g/l pour réaliser le choc hypotonique, par des agitations tout d'abord doucement jusqu'à dissolution totale du culot, puis vigoureusement et on termine cette étape en complétant en qsp jusqu'à 5 ml.
- On remet ensuite à l'étuve à 37° C pendant 20 minutes en position horizontale.

- Préfixation :

- On prépare la solution de fixation qui est un mélange de méthanol et d'acide acétique, avec des proportions de 3 V de méthanol et 1 V d'acide acétique. Le volume de la solution de fixation à mettre n'est pas important, cette étape est appelée préfixation ; ce n'est qu'un simple lavage permettant d'éliminer le reste du KCl.
- On mélange puis on centrifuge à 1500 tours/minute pendant 5 minutes.
- On jette le surnageant.

- fixation :

- La 1^{ière} fixation se fait en ajoutant 0,5 ml de la solution de fixation puis on mélange tout d'abord doucement jusqu'à dissolution totale du culot, et on complète ensuite en qsp jusqu'à 5 ml. On laisse pendant 20 minutes à l'air libre (un volume en qsp jusqu'à 5 ml indiqué par une graduation sur le tube). On centrifuge à 1500 tours/minute pendant 5 minutes et on verse le surnageant.

- La 2^{ème} fixation se fait en ajoutant 0,5 ml de la solution de fixation puis on mélange tout d'abord doucement, jusqu'à dissolution totale du culot, et on complète ensuite jusqu'à un volume en qsp jusqu'à 5 ml. On laisse pendant 20 minutes à l'air libre. On centrifuge à 1500 tours/minute pendant 5 minutes et on retire le surnageant avec une pipette en laissant comme même de 0,5 à 1 ml : un volume proportionnel avec la quantité du culot cellulaire. Ce paramètre aura son importance par la suite sur la détermination de la densité des lames en noyaux.

- Observation :

- On mélange jusqu'à dissolution du culot dans le surnageant (c'est en quelque sorte une dilution des mitoses observable sous microscope).

- Avant l'étalement, on doit apprécier la bonne marche de la manipulation jusqu'ici. Cela se fait sous microscope optique. On dépose 5 gouttes séparées de la préparation sur chaque lame, les lames sont séchées à l'air libre ou par passages rapides et successives sur un bec. On colore par le Giemsa dilué au 1/20, le colorant est déposé sur la lame jusqu'à couvrir toute sa surface. On laisse le colorant agir pendant 20 minutes et on rince ensuite les lames à l'eau de robinet.

- Sous microscope, on voit les chromosomes en métaphase et on essaye de repérer les bonnes mitoses avec des chromosomes bien visibles, structurés et individualisés. Dans le cas contraire, il faut tout recommencer (à partir du même prélèvement ou d'un autre si celui-ci a été fait plus de 3 jours auparavant).

- Si tout va bien, on va réaliser l'étalement. On dépose 2 gouttes de la préparation sur chaque lame, les lames sont séchées à l'air libre ou par passages rapides et successives sur un bec. On colore par le Giemsa dilué au 1/20, le colorant est déposé sur la lame jusqu'à couvrir toute sa surface. On laisse le colorant agir pendant 20 minutes et on rince ensuite les lames à l'eau de robinet.

NB :

Pour chaque prélèvement on a lancé 2 cultures et pour chaque culture traitée avec succès on aura 6 lames au minimum; c'est juste une question de sécurité. Si l'une échoue, l'autre peut toujours servir. Pour les échantillons dans lesquelles les mitoses ne sont pas bonnes, on fait un maximum de lames pour élargir le champ de recherche et augmenter la probabilité de trouver de bonnes mitoses.

- Les lames sont marquées avec un crayon diamant.
- La coloration des lames se fait avant ou après vieillissement.

Les lames sont rincées et mis à l'air libre pour ce qu'on appelle : le vieillissement. On les dépose dans une boîte, hermétiquement fermée, avec de multiples rangées.

La date à laquelle s'est faite la confection de ces lames doit être notée afin de connaître la durée du vieillissement; Paramètre qui aura son importance par la suite sur l'étape du banding.

3-6- R-banding :

Pour réaliser le banding, il faut :

- Des lames avec de bonnes mitoses.
- Milieu EBS fournit dans des flacons de 500 ml, et qui va pour l'utilisation être dilué au 1/10 avec de l'eau distillé.
- Phosphate de sodium anhydre (Na_2HPO_4) sous forme de poudre pour équilibrer le pH du milieu de dénaturation jusqu'à 6,5. De très petites quantités sont ajoutées et le virage du pH est surveillé par le pH-mètre. Cela peut prendre beaucoup de temps (30 à 40 min).

Les lames vieilles seront hydratées dans de l'eau distillé avant la dénaturation ; la durée n'est pas précisé (un minimum de 10 min). Le temps de dénaturation n'est pas fixé (de 45 min à 70 min) dans un bain marie à 87° C.

Le temps de dénaturation est un facteur essentiel de la réussite de cette technique, et l'obtention de bandes R, identifiables et surtout reproductibles. Ce temps varie en fonction de 2 paramètres :

- La richesse des lames.
- La durée du vieillissement.

La réalisation de la dénaturation se fait avec une série de 7 lames ; on retire la première après 45 min, et ensuite une lame toute les 5 minutes. On les colore après par le Giemsa (comme précédemment).

Résultats :

1- Malades :

Notre étude a porté sur 50 cas d'hémopathies malignes, parmi lesquelles, nous avons pu sélectionner 24 cas de leucémies tous types confondus. Les prélèvements sanguins de chacun d'eux ont été soumis à une investigation hématologique, biochimique et cytologique. Puis, nous avons réalisé une étude cytogénétique de chacun des patients et nous avons retenue 10 cas, dont 4 les plus représentatifs d'un type de leucémie : LAM, LAL, LMC et LLC.

Cette étude de 10 patients âgés de 19 à 72 ans, hospitalisés dans le service d'hématologie du CHUC est réalisée conjointement au niveau du laboratoire d'hématologie et de biologie génétique du CHU Constantine, respectivement pour l'étude hématologique et cytogénétique des patients atteints de leucémie. Cette étude a concerné tous les patients chez lesquels une leucémie (LAM, LAL, LMC ou LLC) a été diagnostiquée entre le 01 janvier et le 01 juin 2005, et sur lesquelles la réalisation du caryotype a été réussie.

Il s'agit de 5 cas de LMC (3 femmes et 2 hommes) dont un cas est en phase de transformation en LAL, 2 cas de LAM (2 hommes), 2 cas de LAL (1 homme et 1 femme) et un cas de LLC (1 femme), numérotés de 1 à 10 selon la chronologie d'hospitalisation durant la période citée précédemment. Ces malades ont été prélevés le jour même d'admission avant tout traitement par chimiothérapie qui pourrait fausser les résultats de l'analyse cytogénétique, si les cultures s'avéraient stériles, d'autres prélèvements sont réalisés.

Ces données ne sont pas significativement nombreuses pour tirer des conclusions sur l'épidémiologie des leucémies dans la région de Constantine.

2- Questionnaire :

Le questionnaire soumis au malade et accepté de sa part, dans le but de rechercher et de mettre en évidence quelques facteurs étiologiques des leucémies. Les observations de l'examen clinique (les signes majeurs d'insuffisances médullaires, et d'envahissement tumoral), les résultats de l'analyse hématologique (hémogramme et myélogramme, frottis sanguin et médullaire) et biochimique sont notés.

Un compte rendu est réalisé pour déterminer exactement le type de leucémies et le conditionnement de l'analyse cytogénétique.

3- Le choix des cas :

Nous avons choisit d'illustrer 4 cas de leucémies après étude hématologique globale (hémogramme et myélogramme, frottis sanguin et médullaire), biochimique et cytogénétique.

Le choix s'est fait en fonction de 2 paramètres :

- La présence de cellules immatures dans le sang (myélémie et blastémie).
- L'existence d'anomalies cytogénétiques associées à la pathologie en question.

- Le **1^{ier} cas** est une LMC typique en phase chronique avec suffisamment de précurseurs de la lignée myéloïde dans le sang périphérique (une myélémie de 67 %) pour donner des cultures avec un index prolifératif élevé et donc suffisamment de mitoses pour faire une interprétation correcte du caryotype sur un maximum de bonnes mitoses.

L'autre raison pour laquelle ce cas a été choisit est la présence du chromosome Philadelphie associée à cette leucémie dans 95 % des cas.

- Le **2^{ieme} cas** est LAM 6 érythrocytaire présentant une blastémie très importante constituée d'érythroblastes à 44 % et de myéloblastes à 44 % également. La présence d'une blastémie aussi importante pourrait donner des cultures cellulaires avec un index prolifératif important.

Ce cas a été choisit en dépit du fait qu'il est moins susceptible à l'apparition d'anomalie cytogénétique que les autres LAM. Sur un total de 24 cas de leucémies recrutées au départ, seulement 2 LAM ont été trouvées : LAM 3 (LAP) et LAM 6. Malgré plusieurs tentatives, toutes les cultures cellulaires réalisées sur le prélèvement de sang du LAM 3 étaient stériles, même si la blastémie était très importante (de 71 %).

- Le **3^{ieme} cas** est une LAL du type L 1 qui présente un envahissement sanguin important par les lymphoblastes de 92 %, donc, un index prolifératif conséquent. Ce type cytologique de LAL est associé à une très grande variété d'anomalies cytogénétiques.

- Le **4^{ieme} cas** est une LLC typique en phase chronique (stade A selon la classification de BINET) présentant une lymphocytose majeure (97 % de lymphocytes matures sur la formule leucocytaire).

4- Présentation des cas :

Nous avons choisi d'exposer les résultats des quatre cas les plus représentatifs des types de leucémies rencontrées dans l'unité d'hospitalisation du service d'hématologie du CHUC, avec une présentation clinique faisant surgir les signes d'appel symptomatologiques ainsi que les résultats de l'hémogramme et de certaines données biochimiques dont les taux étaient perturbés (baisse ou augmentation).

4-1- Aspect clinique et hémato-biochimique :

Cas N° : 1

Présentation clinique :

Il s'agit d'une femme de 53 ans (taille 1,65 m et poids 47 kg) qui consulte à l'occasion de douleurs abdominales et une pesanteur à l'hypochondre gauche due à une splénomégalie importante, révélée par radiographie abdominale. L'état général est altéré avec pâleur, asthénie et amaigrissement. La symptomatologie clinique permet de signaler l'installation d'une insuffisance médullaire et la présence d'un seul signe tumoral majeur.

Analyses hématologiques et biochimiques :

RBC : $4,3 \times 10^{12}/l$, WBC : $87 \times 10^9/l$, Ht : 25,1 %, MCV : $101,07 \mu^3$, MCH : 41,1 pg, MCHC : 37 %, Hb : 10,3 g/l, plt : +++.

Le pourcentage des différentes populations leucocytaires est le suivant : PNN : 30 %, PNE : /, PNB : /, monocytes : 1,2 %, lymphocytes : 2 %.

Une myélémie de 67 % : promyélocytes 34 %, myélocytes 11 % et métamyélocytes 11 %. Erythroblastes 1 %.

Na⁺ / K⁺ : 1,45 mg/l / 3,4 mg/l, acide urique : 38 mg/l, Phosphatase alcaline leucocytaire : 309 UI/ml, créatinine : 12 mg/l.

L'hémogramme permet de constater d'emblé l'existence d'une leucocytose importante due à la présence d'éléments sanguins immatures, constitué à 67 % de précurseurs granuleux définissant une myélémie importante, et de blastes à 1 % (blastémie d'un taux non significatif). On note un taux de plaquettes très important (supérieur à $1000 \times 10^9/l$, sera affiché par l'automate de numération sanguine +++). Le pourcentage des PNN est normal mais qui donne en valeur absolue $26,16 \times 10^9/l$ et définit une neutrophilie très importante.

Le taux de globules rouge est normal, mais le MCV et le MCH sont augmentés, et le MCHC se situe dans les normes alors que le taux d'hémoglobine est abaissé ; il s'agit d'une anémie modérée macrocytaire et arégénérative (d'origine centrale).

Des analyses biochimiques indiquent une augmentation du taux de K^+ , de PAL et de créatinine. Une diminution du taux de Na^+ est observée.

En résumé :

L'examen clinique indique l'existence d'un syndrome anémique (pâleur et asthénie) et un syndrome tumoral majeur (splénomégalie importante au stade 4).

L'accumulation d'éléments sanguins immatures de la lignée granuleuse avec 3 stades de maturation constitués de promyélocytes, myélocytes et métamyélocytes à 67 % (myélémie supérieur par définition à 20 %), un taux de blastes sanguins de la lignée érythroïde de 1 % (inférieur par définition à 5 %) et une thrombocytose très importante. Toutes ces données permettent d'affirmer qu'il s'agit d'une LMC typique en phase chronique.

L'augmentation des PAL est inhabituelle, ce serait probablement une conséquence de troubles métaboliques autres que la LMC.

Cas N° : 2

Présentation clinique :

Il s'agit d'un homme diabétique (insulinodépendant), âgé de 53 ans (taille 1,82 m et poids 92 kg) qui consulte à l'occasion d'un érysipèle au pied gauche répondant mal au traitement antibiotique, avec une importante fatigabilité et dyspnée d'effort, ainsi que des hématuries à répétition. La symptomatologie clinique permet de signaler une insuffisance médullaire importante. On note également la présence d'une hypertrophie prostatique modérée qui pourrait être due à un processus cancéreux.

Analyses hématologiques et biochimiques :

RBC : $11,74 \times 10^{12}/l$, WBC : $6,1 \times 10^9/l$, Ht : 16,7 %, MCV : $104 \mu^3$, MCH : 38 pg, MCHC : 40,4 %, Hb : 6,7 g/l, plt : $40 \times 10^9/l$

Le pourcentage des différentes populations leucocytaire est le suivant : PNN : 6 %, PNE : /, PNB : /, monocytes : /, lymphocytes : 6 %.

Une blastose de 88 % : 44 % érythroblastes et 44 % blastes de la lignée granuleuse.

Bilirubine : 42 mg/l, créatinine : 12 mg/l.

L'hémogramme permet de constater l'existence d'une blastémie de 88 % constituée de cellules sanguines immatures dont 44 % appartiennent à la lignée érythroïde et 44 % à la lignée granuleuse. Le taux de leucocytes est normal, de l'ordre de $6,1 \times 10^9/l$, même en présence d'une blastémie de l'ordre de 88 %. Le pourcentage des PNN est abaissé, mais qui donne en valeur absolue $0,36 \times 10^9/l$ ce qui définit une neutropénie très importante. On note également la présence d'une thrombopénie sévère.

Le taux de globules rouge est anormalement élevé, mais le MCV et le MCH sont augmentés, et le MCHC est normal, le taux d'hémoglobine est très abaissé ; il s'agit d'une anémie importante macrocytaire et arégénérative.

Des analyses biochimiques indiquent une augmentation du taux de bilirubine et de créatinine.

En résumé :

L'état général est très altéré (cancer de la prostate déjà installé et diabète insulino-dépendant), avec des signes d'insuffisance médullaire anémiques (pâleur, asthénie et dyspnée d'effort), infectieux (un érysipèle au pied gauche répondant mal au traitement antibiotique) et hémorragiques (prurit cutaneo-muqueux intense apyrétique). Aucun signe tumoral n'est à signaler (l'hypertrophie de la prostate résulte d'un processus tumoral indépendant puisque jamais cité comme symptôme de quelque leucémie).

L'association d'une :

- blastémie sanguine de 44 %, en dehors des érythroblastes (supérieur à 20 % par définition).
- neutropénie et thrombopénie sévères.
- une anémie importante.
- ainsi que l'absence d'une symptomatologie tumoral.

Suggère qu'il s'agit d'une leucémie aigue myéloblastique LAM

Par ailleurs, la présence d'un taux de leucocytes normal impose la réalisation du myélogramme pour confirmer qu'il s'agit bien d'une LAM mais de forme leucopénie (rare).

- l'absence d'un syndrome hémorragique.
- la présence d'érythroblastes à 44 % dans le sang (doit être supérieur à 50 % par définition).

Suggère qu'il s'agit d'une LAM 6 (érythroblastique), résultat qui reste à confirmer également par l'examen cytologique du sang et de la moelle.

Cas N° : 3

Présentation clinique :

Il s'agit d'un jeune homme de 19 ans (taille 1,84 m et poids 54 kg) qui consulte des vomissements à répétition, des douleurs cervicales et une fatigabilité extrême. L'examen clinique décrit une pâleur intense associée à une asthénie profonde, des foyers infectieux bucco pharyngés et anaux, des purpura ecchymotiques et pétéchiâles, des adénopathies dans tous les aires ganglionnaires (superficielles et profonde après radiographie), des douleurs osseuses. L'échographie abdominale révèle une splénomégalie importante associée à une hépatomégalie modérée, et une hypertrophie testiculaire. On note également des signes d'une anoxie cérébrale, une défaillance respiratoire ainsi qu'un fond d'œil pathologique.

Analyses hématologiques et biochimiques :

RBC : $3,5 \times 10^{12}/l$, WBC : $120 \times 10^9/l$, Ht : 22 %, MCV : $62 \mu^3$, MCH : 27,4 pg, MCHC : 41,63 %, Hb : 9,6 g/l, plt : - - -

Le pourcentage des différentes populations leucocytaires est le suivant : PNN : 4 %, PNE : /, PNB : /, monocytes : 1,2 %, lymphocytes : 2 %.

Une blastose de 92 %

Uricémie : 0,71 g/l, PAL : 220 UI/ml, créatinine : 11 mg/l, Na^+ / K^+ : 1,8 mg/l / 4,1 mg/l, acide urique : 69 mg/l.

L'hémogramme permet de constater d'emblé la l'existence d'une leucocytose très importante constituée à 92 % de lymphoblastes immatures. Le pourcentage des PNN est normal, de l'ordre de 4 % ce qui donne en valeur absolue $4,8 \times 10^9/l$.

On note également la présence d'une thrombopénie très importante. Le taux de globules rouge est abaissé et les constantes globulaires : MCV très abaissé ($62 \mu^3$), le MCH est abaissé également, alors que le MCHC est normal. Le taux d'hémoglobine est abaissé ; il s'agit d'une anémie normochrome microcytaire et arégénérative.

Sur le plan biochimique, on constate l'existence d'une uricémie importante corrélée avec une augmentation du taux d'acide urique, de PAL, de créatinine et de K^+ .

En résumé :

L'état général est très altéré, avec des signes d'insuffisance médullaire anémiques (pâleur, asthénie et dyspnée d'effort), infectieux (foyers infectieux bucco pharyngées et anaux) et hémorragiques (purpuras ecchymotiques et pétéchiâles). La symptomatologie tumorale est

très importante associant des adénopathies dans toutes les aires ganglionnaires, des douleurs osseuses, une splénomégalie importante associée à une hépatomégalie modérée, hypertrophie testiculaire, une défaillance respiratoire résultante de l'installation d'une leucostase pulmonaire conséquence directe de l'hyperleucocytose.

L'association de :

- l'existence d'une blastose de 92 % constituée de lymphoblastes.
- l'existence d'une anémie assez importante normochrome microcytaire arégénérative.
- une thrombopénie très importante.
- un syndrome tumoral important et généralisé.

Permet d'affirmer qu'il s'agit d'une LAL, résultat à confirmer par une analyse cytologique du frottis sanguin et médullaire pour déterminer le type cytologique (L 1, L 2 ou L 3).

Cas N° : 4

Présentation clinique :

Il s'agit d'une femme de 55 ans (taille 1,71 m et poids 75 kg) qui consulte à l'occasion d'une bronchite sévère et d'une fatigabilité inhabituelle (fatigabilité de plus en plus importante sur une période de 2 ans). A part la symptomatologie respiratoire et une fièvre à 39° C, l'examen clinique est normal et on ne retrouve notamment aucune organomégalie. La patiente rapporte la notion d'un excès de lymphocytes sur un hémogramme réalisé 1 ans auparavant dans le cadre d'une angine. L'échographie abdominale montre une splénomégalie modérée.

Analyses hématologiques et biochimiques :

RBC : $4,7 \times 10^{12}/l$, WBC : $45 \times 10^9/l$, Ht : 44,6 %, MCV : $95 \mu^3$, MCH : 30 pg, MCHC : 31 %, Hb : 10,6 g/l, plt : $124 \times 10^9/l$.

Le pourcentage des différentes populations leucocytaires est le suivant : PNN : 2 %, PNE : /, PNB : /, monocytes : 1 %, lymphocytes : 97 %.

L'hémogramme permet de constater d'emblé la l'existence d'une leucocytose importante constituée à 97 % de lymphocytes matures ce qui est responsable d'une neutropénie (le pourcentage des PNN est de 2 % ce qui donne en valeur absolue $0,9 \times 10^9/l$). Aucune présence d'éléments sanguins immatures n'a été signalée par l'automate de numération sanguine, et donc, une absence de blastémie et de myélémie.

On note également la présence d'une thrombopénie légère de $124 \times 10^9/l$. le taux de globules rouges est normal et les constantes globulaires : MCV, MCH et MCHC se situent

dans les normes alors que le taux d'hémoglobine est abaissé ; il s'agit d'une anémie modérée normochrome normocytaire et arégénérative.

En résumé :

L'examen clinique est peu indicatif, la découverte de la maladie est souvent fortuite à l'occasion de la réalisation d'un hémogramme dans le cadre d'une autre pathologie. Seul fait intéressant est l'installation insidieuse et continue d'un syndrome anémique (fatigabilité).

L'augmentation du taux de lymphocytes sur une long période, due à la prolifération et l'accumulation de lymphocytes matures dans le sang associée à la présence d'une neutropénie et une thrombopénie permet de soupçonner l'installation d'une LLC (à confirmer par une analyse cytologique du frottis sanguin et médullaire).

4-2- Aspect cytologique :

L'aspect cytologique sera étudié essentiellement sur frottis sanguin, le frottis médullaire permettra de confirmer ces observations.

Cas N° : 1

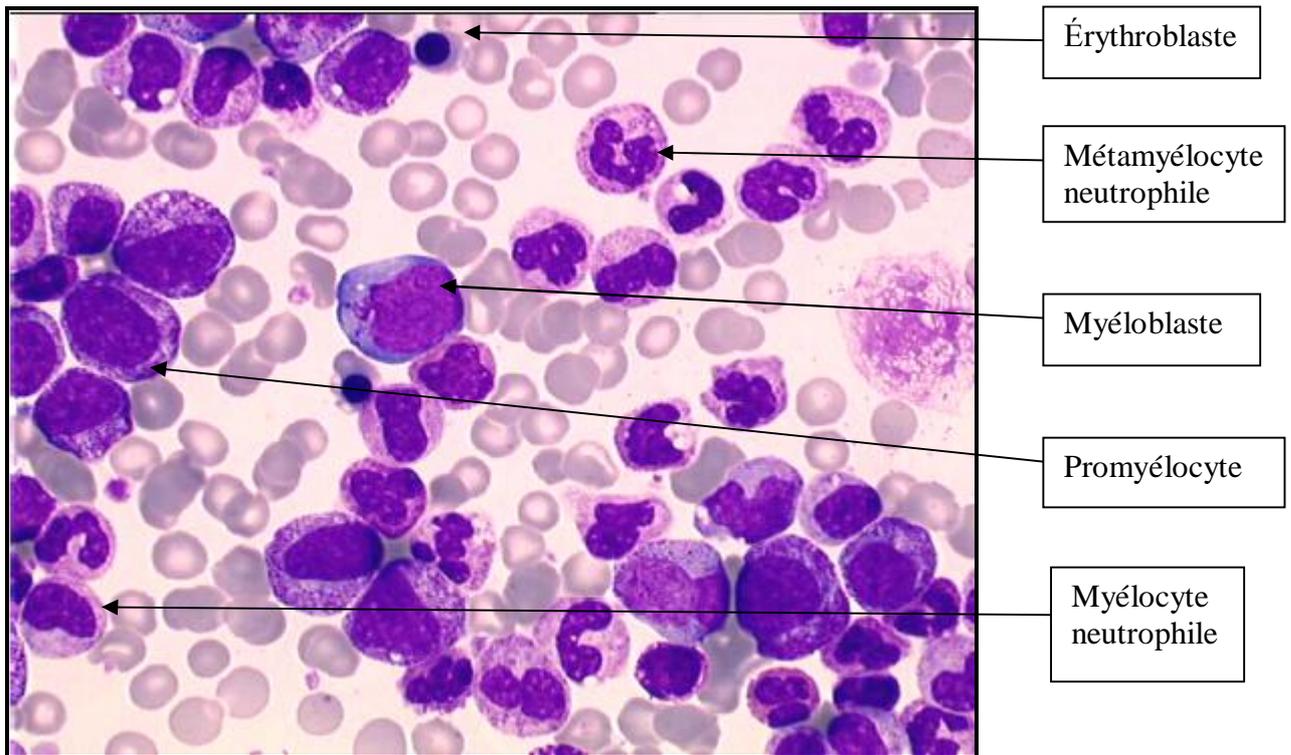


Figure 1 : Frottis sanguin coloré au MGG d'une LMC typique (grossissement X 10).

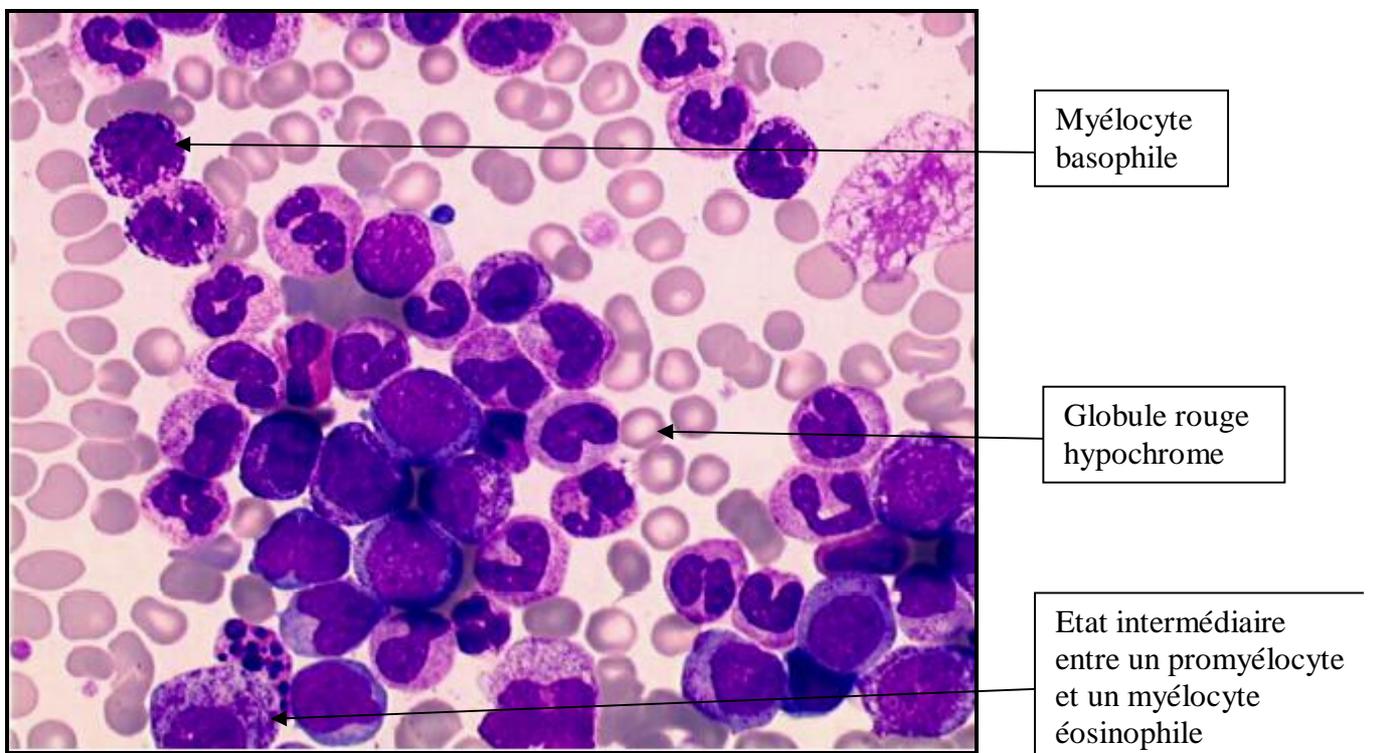


Figure 2 : Frottis sanguin coloré au MGG d'une LMC typique (grossissement 10).

Observations :

Sur frottis sanguin, la myélémie importante indiquée dans l'hémogramme est retrouvée avec tous les stades de différenciations de la lignée myéloïde : myéloblastes, promyélocytes, myélocytes neutrophiles et métamyélocytes neutrophiles (figure 1), myélocytes éosinophiles et une cellule en état intermédiaire entre promyélocyte et myélocyte éosinophile (figure 2). On note également la présence d'un seul érythroblaste (figure 1). La représentativité de chaque élément de la lignée myéloïde indiquée dans l'hémogramme est respectée, avec par ordre décroissant : promyélocytes, myélocytes et métamyélocytes, myéloblastes :

- Le blaste appartenant à la lignée granuleuse est reconnaissable par sa taille moyenne, son faible rapport nucléocytoplasmique avec un contour nucléaire régulier et une chromatine claire, avec 2 nucléoles et un cytoplasme d'une basophilie modérée. Le cytoplasme contient une seule vacuole.
- Les promyélocytes ; cellules de grande taille, dont le noyau plus petit contenant une chromatine plus condensée et excentrée, les nucléoles ne sont pas visibles. Le cytoplasme est plus basophile, renferme de nombreuses petites granulations azurophiles.
- Les myélocytes neutrophiles ; cellules encore plus petites que les précédentes et dont le noyau ovalaire montre des mottes de chromatine denses. Aux granulations primaires s'adjoignent des granulations spécifiques neutrophiles.
- Les métamyélocytes neutrophiles ; cellules ne diffèrent du myélocyte que par l'aspect réniforme du noyau et la chromatine encore plus condensée en blocs denses.
- Un myélocyte basophile avec un noyau plus grand que celui du myélocyte neutrophile et avec de nombreuses granulations intra cytoplasmiques.
- Une cellule dans un état intermédiaire entre un promyélocyte et un myélocyte éosinophile (apparition de nombreuses granulations et diminution du rapport nucléocytoplasmique).

On note l'absence de cellules granuleuses normales (PNN, PNE, PNB) qui définit une agranulocytose totale. On note également que les globules rouges constituent une population hétérogène avec une macrocytose peu importante, quelques globules rouges hypochromes ainsi que des variations de formes peu généralisées (poïkilocytose).

En résumé :

La lignée myéloïde est dominante, majoritairement promyélocytaire, il s'agit d'une myélémie déséquilibrée (le taux des promyélocytes est supérieur à celui des myélocytes). La moelle osseuse montre une hyperplasie granulocytaire. Ces données confirment le diagnostic posé par l'hémogramme d'une LMC typique en phase chronique.

Cas N° : 2

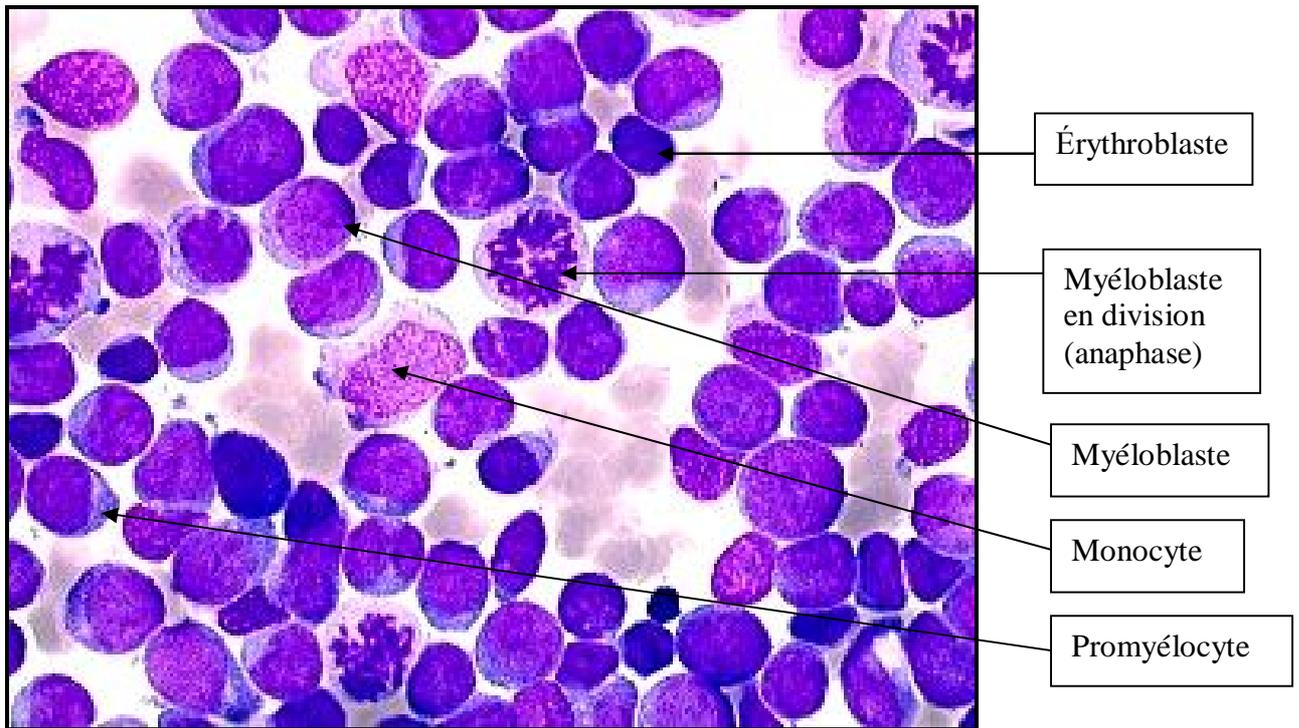


Figure 3 : Frottis sanguin d'une LAM 6 (grossissement X 10).

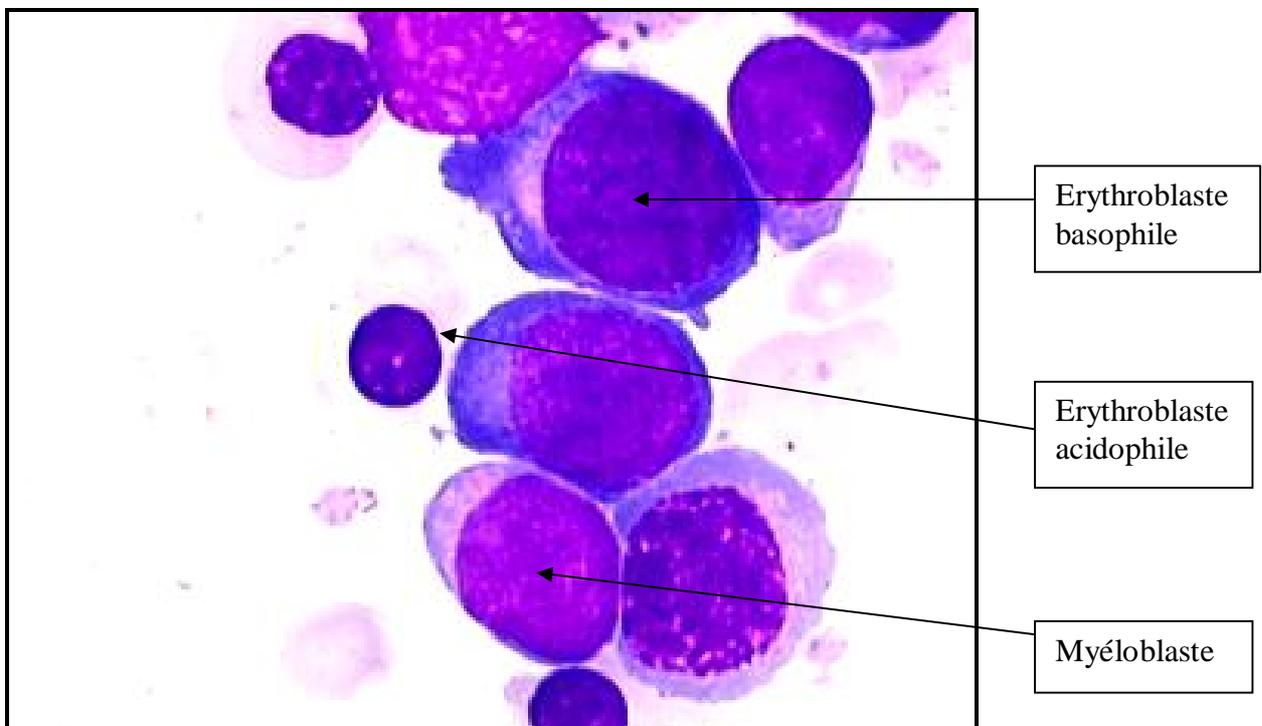


Figure 4 : Frottis sanguin d'une LAM 6 (grossissement X 100) (une autre lame).

Observations :

Sur frottis sanguin, la blastose importante indiquée dans l'hémogramme est retrouvée, et les blastes sont facilement reconnaissables. L'examen attentif du frottis en figure 3 permet de distinguer 2 populations de blastes assez différentes :

- Population de blastes appartenant à la lignée granuleuse de taille moyenne, avec un faible rapport nucléocytoplasmique et un contour nucléaire régulier, une chromatine claire, avec 1 à 4 nucléoles difficilement distingués par leurs colorations plus foncées. La coloration du cytoplasme est peu marquée, ne contenant que très peu, voire pas de granulations, ce qui est une indication d'une basophilie modérée. Le cytoplasme de ces myéloblastes ne contient pas de vacuoles.

- Population de blastes appartenant à la lignée érythrocytaire : peu importante en effectif, constituée de 2 types d'érythroblastes : des érythroblastes acidophiles reconnaissables par leurs petites tailles, un rapport nucléocytoplasmique élevé et un cytoplasme acidophile. Des érythroblastes basophiles de plus grande taille avec un noyau arrondi et un cytoplasme basophile reconnaissable sur la figure 4.

On note l'absence de cellules granuleuses normales (PNN, PNE, PNB) qui définit une agranulocytose totale, on remarque la présence de 2 monocytes apparemment normaux (le monoblaste peut avoir l'aspect différencié du monocyte).

On note également la présence de quelques promyélocytes identifiables par leurs noyaux excentrés, les nucléoles ne sont pas visibles, le cytoplasme plus développé et plus basophile que celui des myéloblastes qui renferme de nombreuses granulations.

En résumé :

Le frottis sanguin est très riche en blastes essentiellement de la lignée myéloïde, mais les érythroblastes sont moins nombreux que les myéloblastes, ceci est contradictoire avec les résultats de l'hémogramme qui donne un taux d'érythroblastes et de myéloblastes égaux (44 %). L'examen du frottis médullaire montre une moelle hypocellulaire avec agranulocytose presque totale et un envahissement par des érythroblastes.

Ces données confirment le diagnostic posé par l'hémogramme d'une LAM 6 Erythroblastique ou érythroleucémie.

Cas N° : 3

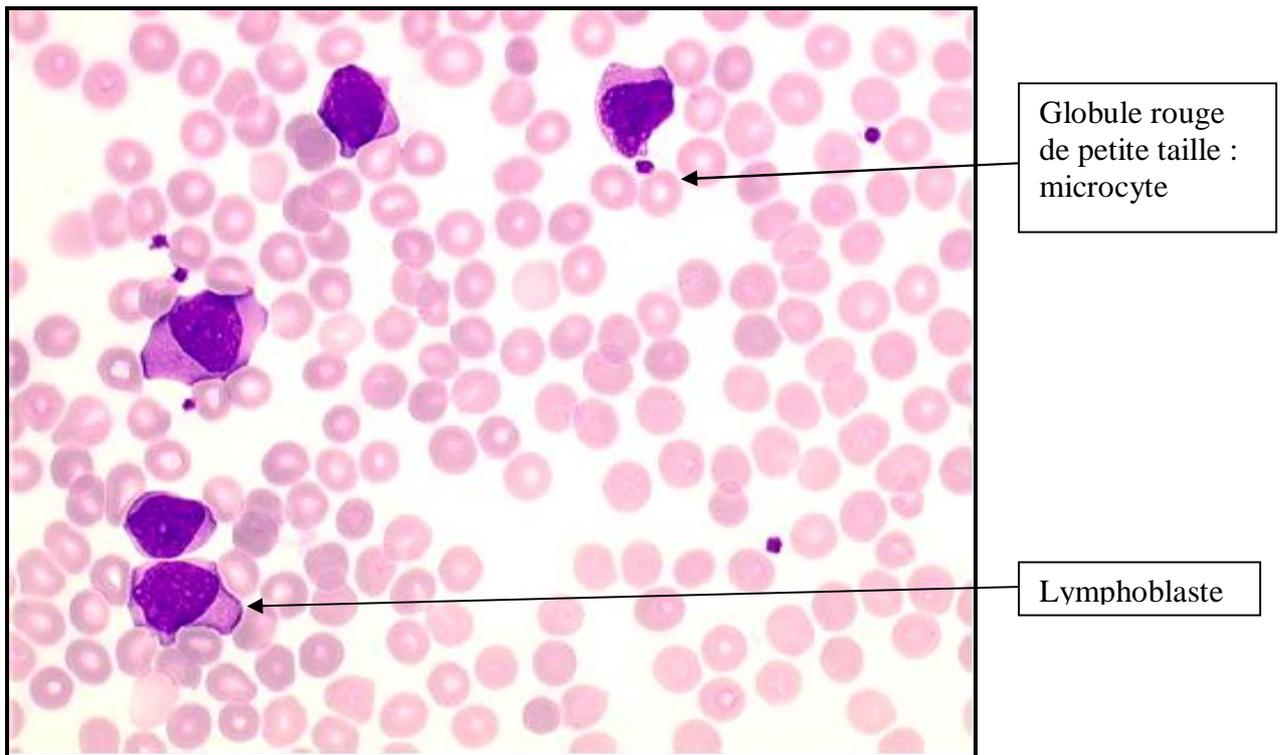


Figure 5 : Frottis sanguin d'une LAL (grossissement X 10).

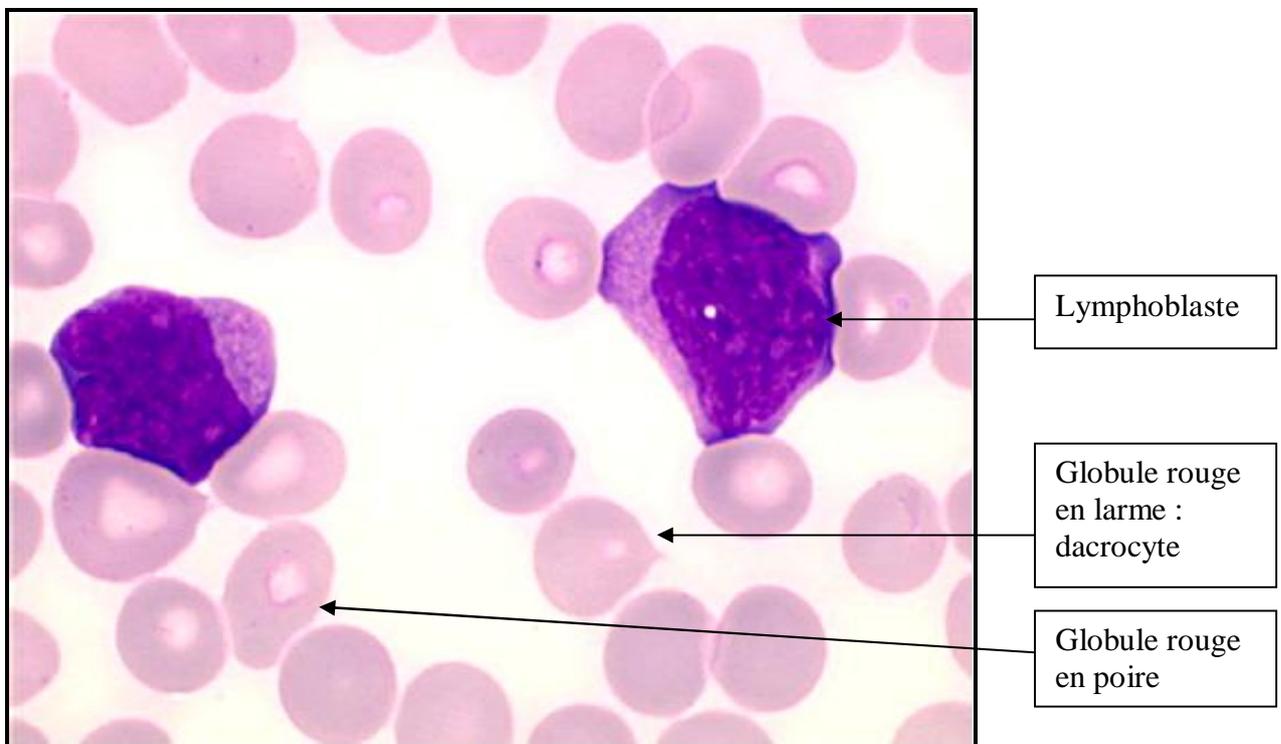


Figure 6 : Frottis sanguin d'une LAL (grossissement X 100).

Observations :

Sur un frottis sanguin peu riche, on note la présence de lymphoblastes dispersés, de petites tailles, avec un contour nucléaire irrégulier, un cytoplasme peu basophile et une chromatine d'aspect homogène, mais qui est assez compacte avec quelques nucléoles visibles.

Les globules rouges sont de petites tailles définissant une microcytose assez homogène. Les autres lignées sont absentes : PNN, PNE, PNB et monocytes.

En résumé :

La présence de lymphoblastes sur le frottis sanguin confirme le diagnostic d'une LAL, leurs aspects morphologiques est du type L 1.

Deux faits troublants :

- L'absence de cellules de la lignée granuleuse alors que le taux des PNN est normal (en valeur absolue).
- La faible richesse du frottis comparée à la concentration très importante des leucocytes indiquée par l'hémogramme ($120 \times 10^9/l$).

Ceci pourrait être due à une hémodilution.

L'aspect des blastes est suffisant pour affirmer le diagnostic posé par l'hémogramme : il s'agit d'une LAL L 1.

Cas N° : 4

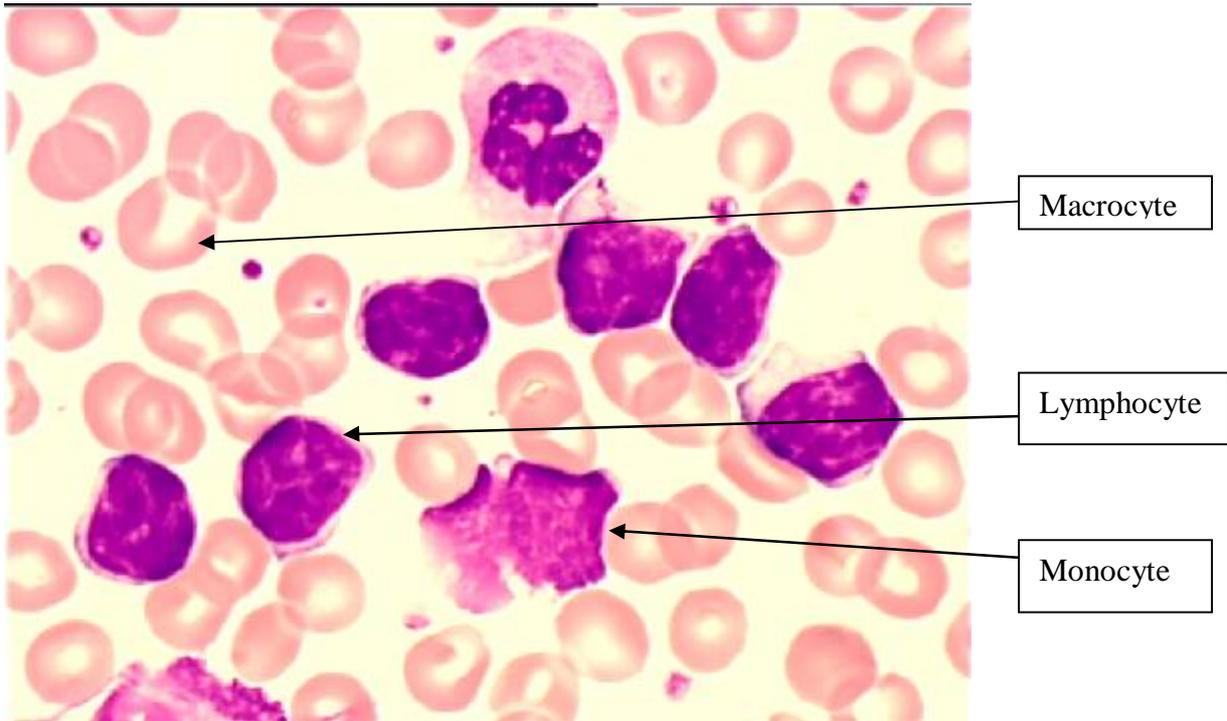


Figure 7 : Frottis sanguin d'une LLC (grossissement X 100).

Observations :

L'étude du frottis sanguin permet de révéler l'existence de cellules lymphocytaires matures, cytoplasme peu développé, noyau à chromatine mottée. Des noyaux presque nus donc un rapport nucléocytoplasmique très important (ombres de Gumprecht) sont fréquemment observés, ces lymphocytes forment une population homogène.

La population de globule rouge est assez homogène avec peu de variations de forme ou de coloration.

On observe la présence d'un monocyte et la présence d'une seule cellule granuleuse (PNN).

En résumé :

Le frottis sanguin montre la présence de lymphocytes matures et une agranulocytose total. Cette observation est suffisante pour affirmer le diagnostic d'une LLC.

4-3- Aspect cytogénétique :

4-3-1- Cultures cellulaires :

Cas N° : 1

- Aspect anormal du prélèvement avec 3 phases.
- La 1^{ière} culture réalisée avec la technique standard (voir matériel et méthodes) était stérile : présence de nombreux petits noyaux mais aucune mitose (index mitotique presque nul).
- On a réalisé, après ce résultat, une dilution du prélèvement dans l'eau physiologique : habituellement on met dans le milieu de culture 200 µl du sang, l'équivalent de 6 gouttes. 4 cultures séparées avec respectivement 2 de 3 et 2 de 1,5 gouttes, avec et sans stimulation par le mitogène (la PHA). De meilleurs résultats ont été obtenus avec 1,5 gouttes et sans PHA, ces derniers sont présentés ci-dessous.

Conclusion : comme les myélocytes possèdent un pouvoir prolifératif élevé, il faudra adapter la quantité de sang en fonction de la myélémie.

Cas N° : 2

- Aspect anormal du prélèvement avec 3 phases, et présentant une coloration très foncée.
- La 1^{ière} culture réalisée était stérile : présence d'une masse très dense de petits noyaux mais aucune mitose (index mitotique nul).
- On a réalisé, après ce résultat, une dilution du prélèvement dans l'eau physiologique :

Comme précédemment, 4 cultures séparées avec respectivement 2 de 3 (dilution de $\frac{1}{2}$) et 2 de 1,5 (dilution de $\frac{1}{4}$) gouttes, avec et sans stimulation par un le mitogène : Le même résultat.

- On a effectué ensuite une diminution de la durée de culture de 72 h à 48 h.

- Les meilleurs résultats ont été obtenus avec 1,5 gouttes de sang, sans PHA, et pour une durée de 48 h ; ces derniers sont présentés ci-dessous.

Conclusion : comme les blastes (dans ce cas érythroblastes et myéloblastes) possèdent un pouvoir prolifératif très important, il faudra adapter la quantité du sang en fonction de la blastémie, ceci en tenant compte de 3 paramètres :

- La durée de la culture cellulaire.
- La présence d'une stimulation par la PHA.
- La quantité du sang.

Cas N° : 3

- Aspect anormal du prélèvement avec 3 phases, et présentant une coloration assez légère.

- Les meilleurs résultats ont été obtenus avec 1,5 gouttes (dilution de $\frac{1}{4}$) de sang, sans PHA, et pour une durée de 48 h ; ces derniers sont présentés ci-dessous.

Cas N° : 4

- Aspect anormal du prélèvement.

- La technique standard a donné des cultures stériles, 3 essais différents avec chaque fois une variation d'un paramètre : temps de culture, volume de l'échantillon et stimulation par l'agent mitogène.

- On a essayé de réaliser la technique sur un culot lymphocytaire après leurs isolements.

- Dans un premier temps, les lymphocytes sont récupérés par un lymphoprep à partir du sang d'une patiente atteinte de LLC. Dix millilitres de sang total sont centrifugés 10 mn à 1200 rpm et à 10° C. La phase supérieure qui correspond au plasma est éliminée. L'anneau intermédiaire, qui correspond aux globules blancs, est récupéré (1 à 2 ml) et mélangée à 1 volume de sérum physiologique. Ce mélange est déposé sur 3 ml de RPMI et centrifugé 30 mn à 1200 rpm et à 10° C. La phase supérieure est éliminée et l'anneau de lymphocyte est récupéré et lavé dans 5 ml de milieu RPMI. Deux millions de lymphocytes sont ainsi mis en culture pendant 72 h et à 37° C dans 4 ml de milieu RPMI contenant 10 v/v de SVF et en présence de 1 mg/ml de PHA.

4-3-2- L'interprétation du caryotypes :

L'étude des caryotypes se fera sur plusieurs mitoses de lames différentes. Un minimum de 20 mitoses sera observé et 5 classements réalisés pour chaque malade, les meilleurs résultats pour chaque patient seront présentés ci-dessous.

Le caryotype doit tenir compte du type de leucémie (examens cliniques et hématologique) concernant le prélèvement mis en culture afin d'orienter l'investigation sur des anomalies chromosomiques trouvées préférentiellement dans un type donné. La formule chromosomique est établie selon la nomenclature internationale en vigueur (ISCN 95).

Dans un caryotype, pour affirmer qu'une anomalie chromosomique est clonale, on exige :

- 2 mitoses présentant le même gain chromosomique ou la même anomalie de structure.
- 3 mitoses présentant la même perte chromosomique.

En effet, le caryotype nécessite une culture cellulaire, la plus courte possible (1 à 3 j en général). Afin d'éviter que des anomalies se créent au cours de la culture, mais aussi de la technique réalisée par la suite, et qui comporte un choc hypotonique et des fixations qui sont nécessaires, mais qui doivent être " ménagés " afin d'éviter une fragilisation excessive de la membrane cellulaire, ce qui peut entraîner des pertes ou des gains artéfactuels de chromosomes.

Parmi les anomalies clonales, on distingue

- Des anomalies primaires, présentes dans toutes les cellules avec anomalies chromosomiques.
- Des anomalies secondaires, qui leur sont surajoutées, et présentes dans un ou plusieurs sous clones.

On observe dans les leucémies des anomalies de nombres, mais surtout de structures :

Ø **Anomalies de nombre** : Le nombre modal d'une tumeur est le nombre de chromosomes retrouvé dans le plus grand nombre de métaphases anormales ; il correspond donc au clone majoritaire dans la tumeur. Par définition, le caryotype est dit :

- Normal, euploïde ou diploïde, s'il n'existe pas d'anomalies chromosomiques : la formule s'écrit 46, XY ou 46, XX si le patient est de sexe masculin ou féminin respectivement (22 paires d'autosomes et 1 paire de chromosomes sexuels ou gonosomes). On la fait suivre du nombre de métaphases analysées noté entre crochets : 46, XY ;

- Pseudodiploïde si le nombre modal est de 46, mais il existe une ou plusieurs anomalies de nombre ou de structure ;
- Haploïde (n), si le nombre de chromosomes est égale à 23,
- Hypodiploïde, si le nombre de chromosomes est entre 45 et 35 (46 -11);
- Hyperdiploïde, si le nombre de chromosomes est entre 47 et 57(46 + 11);
- Triploïde (3n), si le nombre de chromosomes est égale à 69 (3 x 23) ;
- Tétraploïde (4 n), si le nombre de chromosomes est égale à 92 (4 x 23).

On emploie le terme de :

- Trisomie, quand il y a gain d'un chromosome.
- Monosomie, quand il y a perte d'un chromosome.

S'il existe plusieurs clones au sein de la tumeur, ils seront séparés par un « slash », le clone présentant un caryotype normal sera écrit en dernier.

Ø **Anomalies de structure** : elles peuvent concerner les bras courts (p) ou longs (q) des chromosomes. Ces bras sont divisés par le marquage chromosomique en régions (de 1 à 4 selon la longueur des bras) et en bandes (de 1 à 8 selon la taille de la région). Les cytogénéticiens doivent s'appliquer à identifier les bandes impliquées dans l'anomalie de structure c'est-à-dire la localisation des points de cassure.

Les principales anomalies de structure décrites dans les hémopathies malignes sont les translocations, les inversions et les délétions.

- Translocation : remplacement d'un segment chromosomique terminal (comprenant les télomères) par un autre segment chromosomique terminal provenant d'un autre chromosome ; s'il y a échange de segment terminaux, la translocation est équilibrée.
- Inversion : remplacement d'un segment chromosomique terminal par un autre segment chromosomique terminal provenant du même chromosome.
- Délétion : perte de matériel au sein d'un chromosomique. Elle peut être interstitielle ou terminale.

4-3-3- Présentation des caryotypes :

On va présenter pour chaque cas l'aspect du noyau éclaté sous l'effet du choc hypotonique pour identifier les chromosomes appartenant au noyau et éliminer les autres appartenant à d'autres noyaux adjacents sur lame. Cette observation nous permettra également d'identifier des artefacts, à qui la présence pourrait conduire à une interprétation erronée du caryotype.

Après tout ça, on va demander au logiciel de réaliser un classement qui sera ensuite corrigé.

Cas N° : 1



Figure 8 : Chromosomes métaphasiques d'un noyau cellulaire éclaté et dispersé.
Grossissement 400 (40 X 10).

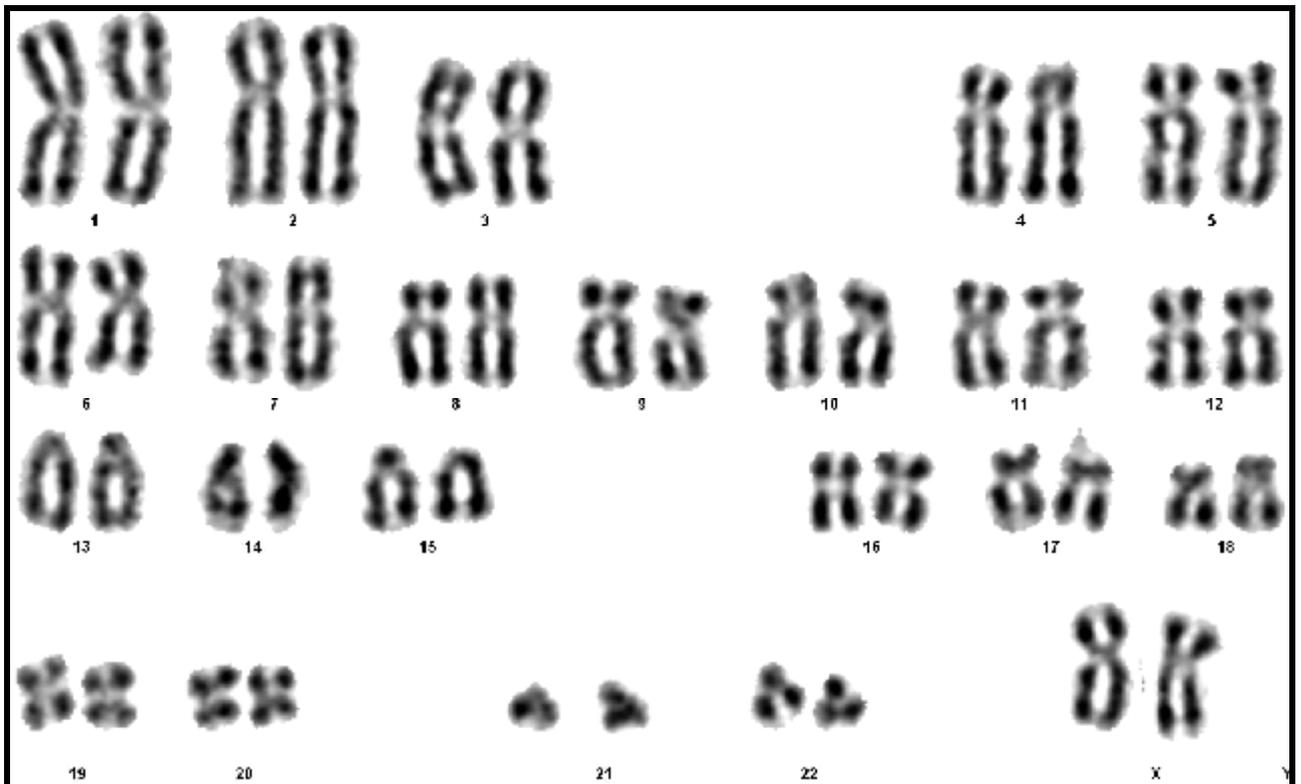


Figure 9 : Caryotype standard d'une patiente atteinte de LMC.

Dans le cas présenté de LMC, on peut dire que le caryotype est normal, sous réserve que la technique du banding n'a pas réussi. Le diagnostic clinique et biologique nous permet d'affirmer qu'il s'agit d'une LMC typique en phase chronique, et donc l'absence du chromosome Philadelphie est la cause de :

- L'existence d'anomalie cryptique non détectable par la cytogénétique standard.
- L'existence du chromosome Philadelphie non détectable par la cytogénétique standard en absence du banding.

Dans notre cas nous penchons plutôt pour la première théorie vue que ce résultat a été rendu après 3 classements et les chromosomes 9 et 22 présentent un aspect normal (taille et indice centromérique).

En conclusion (tirée après étude hématologique, cytologique et cytogénétique) :

- **Le type de leucémie** (selon la classification **FAB** et **OMS**) : LMC (selon la FAB, on n'a pas confirmé la présence du chromosome Philadelphie en absence de banding réussi).
- **La ou les anomalies cytogénétique associées** : caryotype normal.
- **Remarques sur l'étiologie de la maladie** : (habitat : JIJEL)
- **Résultat de l'étude familiale** : en l'absence d'ATCD familiaux il n'est pas nécessaire de réaliser une étude familiale
- **Arbre généalogique** : /

Cas N° : 2



Figure 10 : Chromosomes métaphasiques d'un noyau cellulaire éclaté et dispersé.
Grossissement 400 (40 X 10).

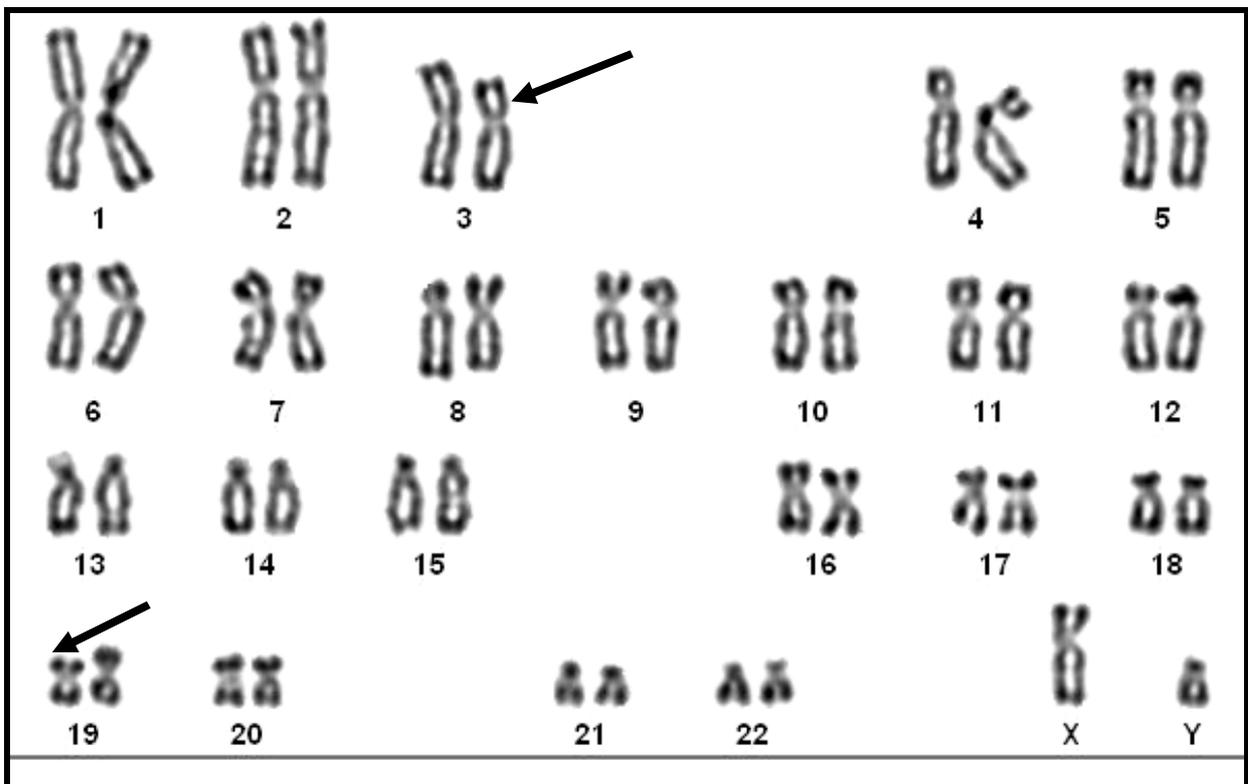


Figure 11 : Caryotype standard d'un patient atteinte de LAM.

Dans le cas présenté de LAM, on peut dire que le caryotype est euploïde, ne présentant aucune anomalie de nombre. On peut également dire que le caryotype présente des anomalies de structure concernant les chromosomes 3 et 19 dont les paires paraissent non homogènes, ce qui pourrait être interprété comme une délétion partielle du chromosomes 3 et d'une addition sur le bras court du chromosomes 19 indépendantes, soit d'une translocation déséquilibrée entre les chromosomes 3 et 19.

Le diagnostic clinique et biologique nous permet d'affirmer qu'il s'agit d'une LAM 6 érythroblastique. Il s'agit d'une forme rare qui représente 3 à 5 % de l'ensemble des LAM. Elle ne présente aucune anomalie cytogénétique caractéristique qui lui est associée avec une grande fréquence.

En bibliographie, aucune translocation associant les chromosomes 3 et 19 n'est décrite. Par contre, elle rapporte une délétion du bras court du chromosome 3 dans 2,5 % des LAM mais aucune addition sur le chromosomes 19.

Sur 5 classements de chromosomes réalisés : 4 présentent le même aspect de ces 2 chromosomes, mais, dans un classement le chromosome 19 était normal.

En conclusion :

- L'anomalie détectée mais non confirmée par le banding du chromosome 3 est en relation avec la leucémie (LAM 6).
- L'anomalie détectée mais non confirmée par le banding du chromosome 19 est indépendante du processus leucémique, soit une anomalie aléatoire non spécifique ce qui est possible dans une leucémie aigue en phase terminale. Ce résultat a été rendu après étude de 15 mitoses et réalisation de 5 classements.

En conclusion :

- **Le type de leucémie** (selon la classification **FAB** et **OMS**) : **LAM 6 (Erythroblastique).**
- **La ou les anomalies cytogénétique associées** : aucune anomalie de nombre. Mais, des anomalies de structure dont une, du chromosome 3 est associé au processus leucémique.
- **Remarques sur l'étiologie de la maladie** : RAS.
- **Résultat de l'étude familiale** : en l'absence d'ATCD familiaux il n'est pas nécessaire de réaliser une étude familiale.
- **Arbre généalogique** : /

Cas N° : 3



Figure 12 : Chromosomes métaphasiques d'un noyau cellulaire éclaté et dispersé.
Grossissement 400 (40 X 10).

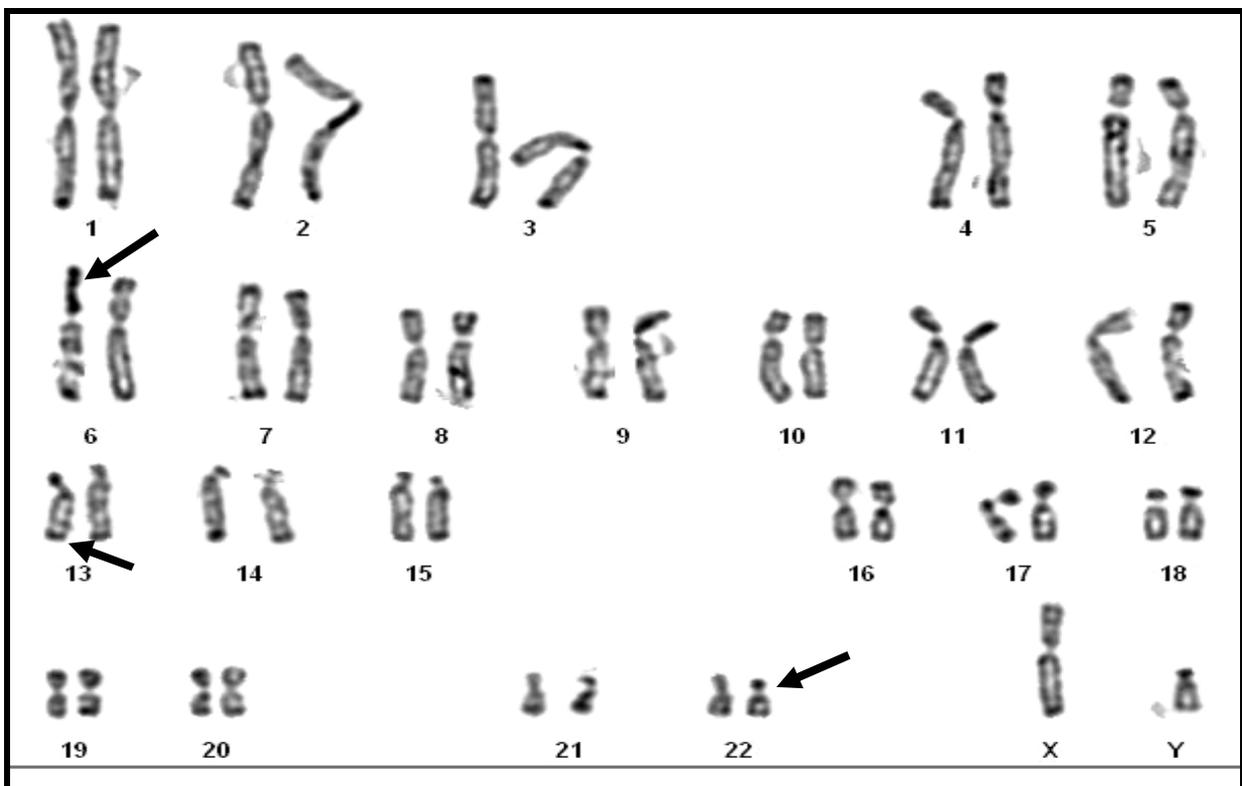


Figure 13 : Caryotype standard avec début de bandes d'un patient atteint de LAL.

Dans le cas présenté de LAL on peut dire que le caryotype est euploïde, ne présentant aucune anomalie de nombre. On peut également dire que le caryotype présente des anomalies de structure concernant les chromosomes 6, 13 et 22 dont les paires paraissent non homogènes ce qui pourrait être interprétée comme des délétions indépendantes des bras courts des chromosomes 13 et 22 et du bras long du chromosome 6, ou de translocation déséquilibrée entre ces chromosomes (translocations 2 à 2 ou complexe impliquant plus que 2 chromosomes).

Le diagnostic clinique et biologique nous permet d'affirmer qu'il s'agit d'une LAL L 1 à prolifération de prolymphocytes B. Il s'agit d'une forme commune qui représente 80 % de l'ensemble des LAL.

Elle présente plusieurs anomalies cytogénétiques caractéristiques qui lui sont associée, essentiellement des translocations. En bibliographie, aucune translocation associant les chromosomes 6, 13 et 22 deux à deux n'est décrits. Par contre, elle rapporte une translocation t(8; 22) (q24; q11) retrouvées essentiellement dans le lymphome de Burkitt et les LAL type Burkitt (c'est à dire les LAL 3 de la classification FAB) avec une fréquence de 54 % mais qui peut exister dans d'autres LAL. Aucune délétion partielle impliquant les chromosomes 6, 13 et 22 n'est à signaler en bibliographie, sauf celle concernant le bras long du chromosome 6.

Sur 4 classements de chromosomes réalisés : 4 présentent le même aspect avec des différences pour le bras court du chromosome 6.

En conclusion :

- les anomalies détectées, mais non confirmées par le banding des chromosomes 6, 13 et 22 sont indépendantes du processus leucémique, ce sont des anomalies aléatoires non spécifiques, ce qui est possible dans une leucémie aigue en phase terminale (caryotype réalisé environ 1 semaine avant le décès du patient).

Résultat rendu après étude de 12 mitoses et réalisation de 4 classements.

En conclusion :

- **Le type de leucémie** (selon la classification FAB et OMS) : **LAL L 1.**

- **La ou les anomalies cytogénétique associées** : aucune anomalie de nombre. Mais, des anomalies de structure dont une, du chromosome 22 est associé au processus leucémique.

- **Remarques sur l'étiologie de la maladie** : RAS.

- **Résultat de l'étude familiale** : en l'absence d'ATCD familiaux il n'est pas nécessaire de réaliser une étude familiale.

- **Arbre généalogique** : /

Cas N° : 4

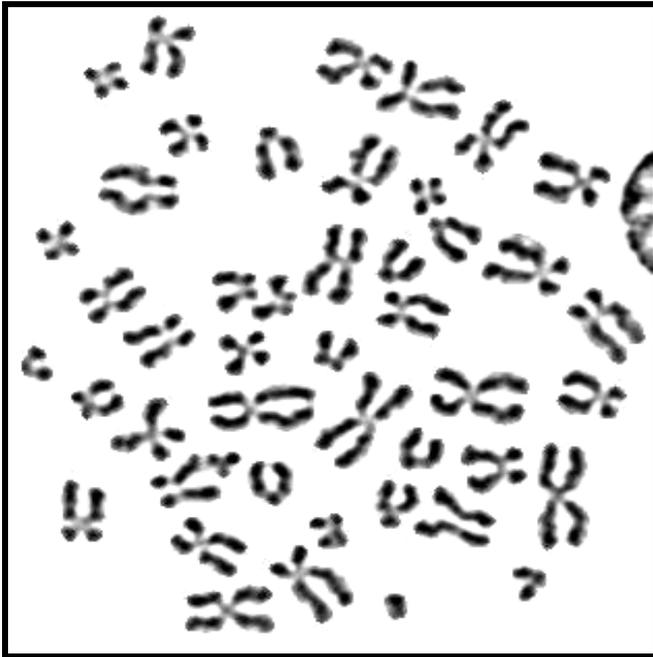


Figure 14 : Chromosomes métaphasiques d'un noyau cellulaire éclaté et dispersés.
Grossissement 400 (40 X 10).

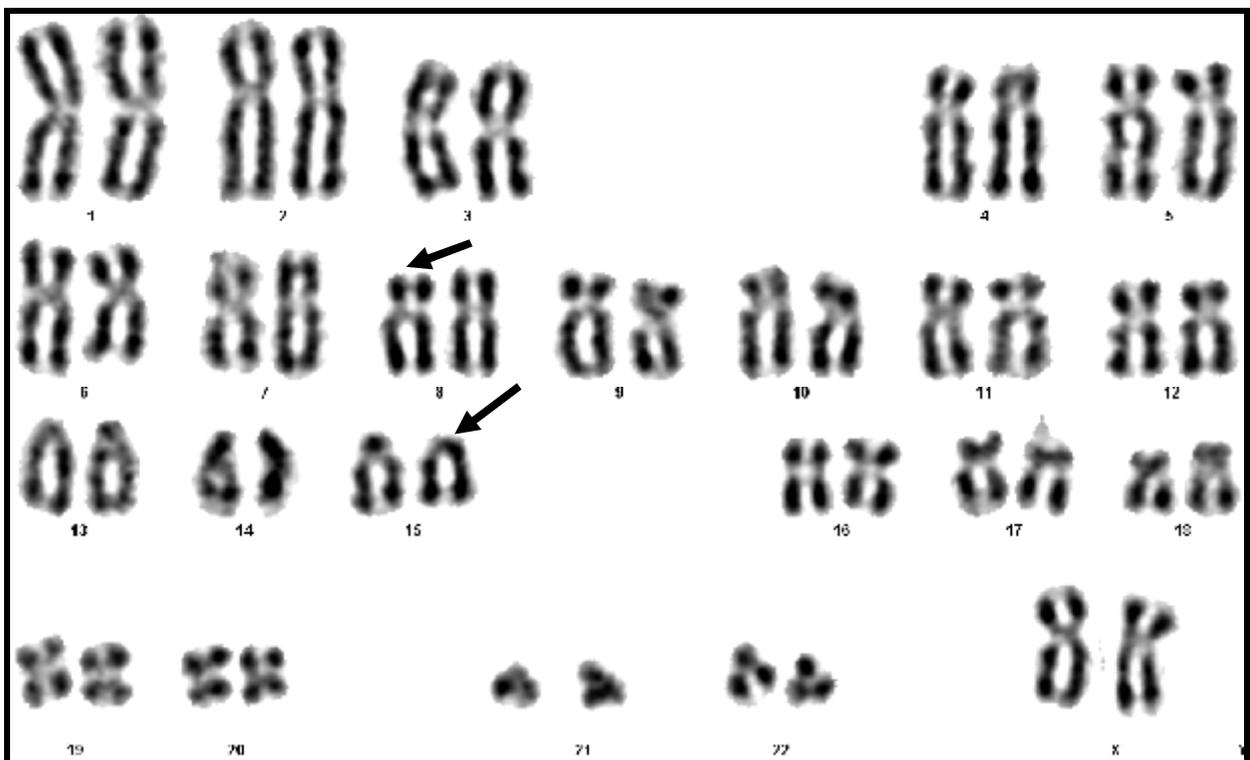


Figure 15 : caryotype standard d'un patient atteinte de LLC.

Dans le cas présenté de LLC, on peut dire que le caryotype est euploïde, ne présentant aucune anomalie de nombre. On peut également dire que le caryotype présente des anomalies de structure concernant les chromosomes 15 et 8, et dont les paires paraissent non homogènes, ce qui pourrait être interprété comme une délétion partielle importante du bras court du chromosomes 15 et d'une délétion partielle sur le bras court du chromosomes 8 indépendantes, soit d'une translocation déséquilibrée ente les chromosomes 15 et 8. Le diagnostic clinique et biologique nous permet d'affirmer qu'il s'agit d'une LLC typique en phase chronique.

Elle ne présente pas de nombreuses anomalies cytogénétiques caractéristiques qui lui sont associé avec une grande fréquence, et sont assez difficiles à mettre en évidence.

En bibliographie, aucune translocation associant les chromosomes 15 et 8 n'est décrite. Elle ne rapporte aucune délétion partielle concernant ces chromosomes.

Sur 5 classements de chromosomes réalisés : 2 présentent le même aspect du chromosome 8, mais, dans les 5 classements le chromosome 15 était anormal où le bras court paraît délété en sa totalité.

En conclusion :

- les anomalie détectées mais non confirmées par le banding des chromosomes 15 et 8 sont indépendante du processus leucémique. L'anomalie du chromosome 8 est soit une anomalie aléatoire non spécifique, soit un artefact car non confirmée sur 2 classements ou plus.
 - l'anomalie du chromosome 15 retrouvée dans 5 classement reste à confirmer par le banding, elle pourrait être aléatoire (rare en ce stade A de la LLC) ou associée a une autre pathologie.
- Ce résultat a été rendu après étude de 12 mitoses et réalisation de 5 classements.

En conclusion :

- **Le type de leucémie** (selon la classification **FAB** et **OMS**) : **LLC**.
- **La ou les anomalies cytogénétique associées** : aucune anomalie de nombre. Mais, des anomalies de structure des chromosomes 15 et 8 indépendante du processus leucémique.
- **Remarques sur l'étiologie de la maladie** : RAS.
- **Résultat de l'étude familiale** : en l'absence d'ATCD familiaux il n'est pas nécessaire de réaliser une étude familiale.
- **Arbre généalogique** : /

4-3- Le R-banding :

La technique d'obtention de bandes R par dénaturation thermique à 87° C, mise au point par Dutilleux et Lejeune, et permettant la révélation de bandes de colorations différentes le long d'un chromosome et créant ainsi un profil d'alternance sombre et clair caractéristique de chaque paire de chromosome homologue normale, due à la dénaturation thermique des protéines du squelette chromosomique.

C'est une étape critique dont la durée doit être mesurée avec une très grande précision, une détermination empirique en fonction de la charge des lames (en cellules) et le temps de vieillissement.

- Un temps de dénaturation très important donnera des chromosomes très pâles " brûlés " .
- Un temps de dénaturation moins de ce qu'il faut donnera des chromosomes très sombres comme ceux obtenus par caryotype standard " au point de départ " .

Ce temps dépend de 2 paramètres, il est proportionnel avec :

- La richesse des lames.
- La durée du vieillissement.

Un autre problème de taille est que le bain marie n'est pas adapté à cette technique. En effet, chaque fois qu'on retire une lame on est obligé d'ouvrir le bain marie, ce qui cause une dissipation de chaleur très importante, en plus, il indique souvent une température différente que celle qui est réellement (+/- 5° C, et mesuré directement par un thermomètre). Dans ces conditions, il est impossible de maintenir une température constante pour une durée déterminée.

Les résultats probants obtenus avec le R-banding étaient :

- Un début de bande sur un caryotype de LMC en phase d'acutisation, suffisamment claire pour trouver une délétion interstitielle en 5q sur 2 mitoses et dont la photo n'a pas pu être sauvegardée pour des raisons techniques liées au logiciel de traitement d'images.
- Un début de bande sur un caryotype de LAL en phase terminal (figure 13), qui n'est pas assez prononcé pour confirmer les anomalies de structures trouvées chez ce patient.

Discussion générale :

Bien qu'il s'agisse d'un examen indispensable, le caryotype fait parfois défaut, et ceci pour plusieurs raisons :

- Prélèvement sur un milieu non adéquat (autre que l'héparine) ou avec un temps de transport prolongé ou stockage à une température trop éloignée de la température ambiante (manipulation de cellules vivantes).

- Prélèvement comportant un nombre insuffisant de cellules malignes : fibrose, aplasie médullaire, hémodilution.

- Cellules tumorales ayant un faible index prolifératif (les lymphocytes dans la LLC).

- Anomalies chromosomiques de trop petite taille (une bande correspond à 5 000 kb environ) ou trop complexes impliquant plus de 2 chromosomes.

Chacun des cas illustré précédemment est représentatif d'un type de leucémie et nécessite un conditionnement différent de la technique de culture cellulaire en fonction de la lignée proliférative et le degré d'envahissement du sang périphérique par des cellules jeunes indifférenciées (progéniteurs et précurseurs d'une ou de plusieurs lignées cellulaires sanguines) indiqué par la myélémie et la blastémie. Des conclusions sur la réalisation de chaque culture sont tirées à part pour l'obtention de cultures riches et de bonne qualité, des cellules sanguines de patients atteints de leucémies. La réussite des cultures cellulaires est la condition *sine qua non* de toute réalisation d'un caryotype réussi et reproductible, ceci passe précisément par une perfection de la culture cellulaire en fonction du type de cellules sur lequel on fait cette analyse.

Dans notre étude, nous avons réalisé tout l'intérêt de la cytogénétique dans la prise en charge des leucémies. Les anomalies sont détectées par des techniques de cytogénétique conventionnelle et moléculaire (FISH) effectuées sur prélèvement médullaire ou du sang blastique dans les leucémies.

Les anomalies observées du caryotype sont des modifications acquises, clonales, primaires ou secondaires, qu'elles soient numériques et/ou de structure, elles ne se font pas au hasard : elles sont non aléatoires, certaines sont étroitement spécifiques d'une entité pathologique.

La découverte des anomalies chromosomiques dans les leucémies est primordiale à double titre :

- Intérêt clinique dans la prise en charge du patient (diagnostic, pronostic et suivi thérapeutique).
- Intérêt scientifique (identification des gènes impliqués dans la leucémogénèse et de certains facteurs étiologiques).

Malheureusement, dans notre pays, ainsi que dans beaucoup d'autres en voie de développement, on continue à utiliser dans les recommandations anciennes de la classification FAB des leucémies établie en 1970 et utilisée depuis 1972. L'intérêt longtemps porté à la classification FAB des leucémies tient à sa relative simplicité basée sur une description morphologique des cellules sanguines et médullaires, après coloration des frottis de sang et de moelle par la méthode de MGG, complétée le plus souvent par des examens cytochimiques (non utilisés au niveau du laboratoire d'hématologie d'accueil du CHUC), accessible à tous les laboratoires. Cette approche reste toujours la base du diagnostic des leucémies en application clinique malgré ses limites.

Sur l'ensemble des cas de leucémies trouvés au niveau du CHUC le diagnostic différentiel s'est révélé parfois difficile dans plusieurs cas et pour diverses raisons :

- Frottis pauvres (aplasie médullaire, hémodilution) ou mal étalés.
- Ponction médullaire difficile à réaliser en cas de myélofibrose pouvant gêner l'aspiration de moelle.
- Présence de blastes morphologiquement indifférenciés (lignée myéloïde et/ou lymphoïde).
- Dans le cas de pathologie cancéreuse lymphoïde où la distinction entre leucémies et lymphomes est très difficile.
- Confirmer le diagnostic des LAL et définir le sous type en fonction de la lignée proliférative (B ou T) par l'immunophénotypage et/ou la cytogénétique.
- Confirmer le type de LAM par la cytogénétique.
- Rechercher une LA biphénotypique et éliminer une LAM indifférenciée (LAM 0).
- Faire le diagnostic différentiel entre la LMC et les autres SMPC.

D'où la nécessité d'utiliser d'autres marqueurs immunologiques et cytogénétiques pour affirmer ou même modifier le diagnostic et aussi mieux cibler les indications thérapeutiques initiées.

C'est la confrontation de l'examen des frottis sanguins (base de la classification FAB des leucémies) d'une part et de l'étude cytogénétique, des molécules membranaires de surface, des chromosomes et même des gènes d'autres part qui permettra un diagnostic dans les cas difficiles.

Dans les cas de leucémies illustrés, on n'a constaté aucune anomalie de nombre. Des anomalies de structures ont été trouvés, mais qui n'ont pas pu être confirmés par le banding.

Dans le cas présenté de LMC, le caryotype était, apparemment, normal. L'évidence du diagnostic clinique et biologique a permis d'affirmer qu'il s'agissait d'une LMC typique en phase chronique et donc l'absence du chromosome Philadelphie est due à l'existence d'anomalie cryptique non détectable par la cytogénétique standard ou à l'absence du banding. L'absence d'autres anomalies additionnelles confirme le caractère chronique de la LMC, mais ne permet pas d'évaluer le taux de la réponse thérapeutique ; la rémission totale de la maladie est définie par l'éradication du chromosome Philadelphie sur 30 mitoses, la rémission majeure par moins de 35 % de mitoses contenant ce même chromosome (68).

En l'absence de bandes facilement identifiables, la mise en évidence du chromosome Philadelphie s'est révélée être particulièrement difficile, car il s'agit de la conséquence d'une translocation équilibrée qui n'affecte que très peu la taille des chromosomes concernés (22q- et 9q+) (69).

Dans le cas présenté de LAM, le caryotype était euploïde. Par contre, il présentait des anomalies de structure concernant des chromosomes 3 et 19. Il s'agissait d'une LAM 6 érythroblastique, relativement rare, et qui représente 3 à 5 % de l'ensemble des LAM (64), mais, qui ne présente aucune anomalie cytogénétique récurrente et spécifique. La bibliographie rapporte une délétion du bras court du chromosome 3 dans 2,5 % des LAM (70), mais aucune addition ou autre anomalie concernant le chromosome 19 n'a été trouvée. Notre résultat rendu après réalisation de 5 classements des chromosomes : 4 présentent le même aspect des chromosomes 3 et 19, mais, dans un classement le chromosome 19 était normal. Ce qui confirme que l'anomalie détectée mais non confirmée par le banding du chromosome 3 est en relation avec la leucémie (LAM 6). L'anomalie concernant le chromosome 19 est indépendante du processus leucémique, sûrement une anomalie aléatoire non spécifique, ce qui est possible dans une LA en phase terminale.

Dans le cas présenté de LLC typique en phase chronique, la présence d'anomalies de structure concernant les chromosomes 15 et 8 est constatée. En bibliographie, aucune translocation associant les chromosomes 15 et 8 n'a été trouvée. Sur 5 classements de chromosomes réalisés : 2 présentent le même aspect du chromosome 8, mais, dans les 5 classements, le chromosome 15 était anormal où le bras court paraît délété en sa totalité. On pourrait dire que l'anomalie du chromosome 8 est aléatoire non spécifique ou un artefact car non confirmé sur plus de 2 classements. Par contre, l'anomalie du chromosome 15 retrouvée dans 5 classements reste à confirmer par le banding pourrait être aléatoire (rare en ce stade A de la LLC) ou associée à une autre pathologie sous jacente.

Dans le cas que nous avons présenté de LAL, des anomalies de structure concernant les chromosomes 6, 13 et 22 ont été retrouvées. Les éléments du diagnostic clinique et biologique nous ont permis d'affirmer qu'il s'agit d'une LAL L 1 à prolifération de prolymphocytes B, forme commune qui représente 80 % de l'ensemble des LAL et qui présente plusieurs anomalies cytogénétiques caractéristiques qui lui sont associées, essentiellement des translocations (64).

La bibliographie rapporte une translocation $t(8;22)(q24;q11)$ retrouvée essentiellement dans le lymphome de Burkitt et les LAL type Burkitt (les LAL L 3 de la classification FAB) avec une fréquence de 54 % mais qui peut exister dans d'autres LAL (fréquence non établie) (71).

Sur 4 classements de chromosomes que nous avons réalisés : 4 présentent le même aspect du bras court du chromosome 6. On peut penser que les anomalies détectées des chromosomes 6, 13 sont indépendantes du processus leucémique, ce sont des anomalies aléatoires non spécifique ce qui est possible dans une LA en phase terminale. L'anomalie du chromosome 6 a été retrouvée sur l'ensemble des classements, mais celle du chromosome 13 sur un seul classement. Avec un tel résultats concernant le chromosome 13 on est soit en présence d'artefact, soit face à l'émergence d'un nouveau clone cellulaire avec cette anomalie additionnelle à celle du chromosome 6, qui est quand à elle bien établie.

Ils semblaient, dès lors, que ces anomalies étaient liées à l'état du malade qui est décédé 6 jours après le prélèvement.

Il aurait été intéressant, de confirmer ce résultat par le banding et éventuellement par la cytogénétique moléculaire.

Ces points de cassures chromosomiques impliqués dans les événements de translocations ou de délétions illustrées ci dessous pourrait être la localisation de certains oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeurs, dont l'altération, est responsable du phénomène cancéreux.

Conclusion :

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

La difficulté souvent rencontrée pour établir un diagnostic fiable dans les cas difficiles de leucémies, particulièrement pour la pathologie lymphoïde, par des examens hématologiques et cytologiques impose l'utilisation des techniques de cytogénétique classique, et éventuellement de la cytogénétique moléculaire pour lever l'ambiguïté rencontrée, et dans le but de confirmer le diagnostic, établir un pronostic, faire un choix et un suivi thérapeutique et par conséquent, la prise en charge des patients au niveau des centres hospitaliers peut être améliorée.

Dans la nouvelle classification OMS en usage depuis 1992, les anomalies cytogénétiques décelées représentent l'un des critères majeurs de classification des leucémies. De même, la biologie moléculaire a fait aujourd'hui son entrée dans l'évaluation des leucémies, notamment pour la mise en évidence des translocations cryptiques et l'analyse des échecs du caryotype et surtout son intérêt majeur pour l'évaluation de la maladie résiduelle.

La diversité des anomalies cytogénétiques associées dans les différents types de leucémies et le caractère aléatoire de ces mutations lors de la phase terminal de ces pathologies peuvent expliquer les remaniements inhabituels trouvés.

A lumière de ce travail, on voit comme perspectives :

- La réalisation de la dénaturation des lames avec la trypsine pour l'obtention de bandes G.
- L'amélioration de la technique du R-banding, surtout en ce qui concerne la reproductibilité.
- L'utilisation de la cytogénétique moléculaire représentée par les techniques de FISH et de CGH, en complément de la cytogénétique classique pour aller au delà des limites imposées par la résolution du banding et de révéler des anomalies cryptiques.
- L'utilisation de la biologie moléculaire, dont essentiellement, la technique de RT-PCR qui étudie le produit même de l'anomalie cytogénétique et place donc la détection à un niveau moléculaire.

References bibliographiques:

- 1- **Piller G**, Leukemia - A brief historical review from ancient times to 1950, *Brit. J. Haemat*, 112: 2828-292, 2001.
- 2- **Nysten P**, « leucocythémie » in Dictionnaire de médecine, chirurgie et pharmacie, J.B. Baillière et fils, Paris, 1858.
- 3- **Dechambre A, ed**, « leucocythémie » in Dictionnaire encyclopédique des sciences médicales, G. Masson, Asselin et Cie, Paris, 1876.
- 4- **Virchow R**. Weisses blut, Froriep's Notizen, 36 : 151-156, 1845 cité Piller G. Leukemia - A brief historical review from ancient times to 1950, *Brit. J. Hemat.*, 112 : 282-292, 2001.
- 5- **Donné A**. Cours de microscopie complémentaire des études médicales, J.B. Baillière, Paris, 1844, p. 135-136.
- 6- **Craigie D**. Case of disease and enlargement of the spleen in which death took place from the presence of purulent matter in the blood, *Edinburgh Medical and Surgical Journal*, 64: 400-413, 1845.
- 7- **Bennett J**. Case of hypertrophy of the spleen and liver in which death took place from suppuration of the blood, *Edinburgh Medical and Surgical Journal*, 64: 413-423, 1845.
- 8- **Rigal C**. Contribution à l'histoire de la recherche médicale : autour des travaux de Jean Bernard et de ses collaborateurs sur la leucémie aiguë, 1940-1970, thèse de doctorat en épistémologie, histoire des sciences et des techniques, université paris 7– denis diderot ufr Géographie, Histoire et Sciences Sociales, 19 décembre 2003.
- 9- **Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galdon DAG, Gralnick HR, Sultan C**. Proposals for the classification of acute leukemias: French-American-British (FAB) cooperative group, *British Journal of Haematology*, 33 : 451, 1976.
- 10- **Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galdon DAG, Gralnick HR, Sultan C**, The morphological classification on acute leukemia ,concordance among observers and clinical correlation. *British Journal of Haematology*, 47: 559, 1981.
- 11- **Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galdon DAG, Gralnick HR, Sultan C**, Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia, *Annals of Internal Medicine* 103 (4) : 626-629, 1985.
- 12- **Imbert M**, Place du biologiste dans le diagnostic et le suivi des leucémies aiguës, *Revue Française des Laboratoires*, 2002, 344 :67–70

- 13- **Flandrin G.** La nouvelle classification OMS des hémopathies malignes : Hémopathies myéloïdes. *Hématologie*, 2001, 7(2):136–41.
- 14- **Lejeune. J et Berger. R. Chromosomes et cancers** ,20e Congrès des Pédiatres de Langue Française. Nancy, 14-15-16 septembre 1965, extrait du tome III : Les maladies humaines par aberrations chromosomatiques, p 221-241.
- 15- **Boveri T**, Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren, 1 vol. in-8° Jena, Fischer, 1914.
- 16- **Winge O**, Zytologische Untersuchungen über die Natur maligner Tumoren. II, Teerkarzinome bei Mäusen. *Z. Zellforsch.* 1930, 10, 683-735.
- 17- **Nowell P, Hungerford D**, A minute chromosome in human granulocytic leukemia, *Science* 132, 1497 (1960).
- 18- **Baikie A, Court W, et al** ,A possible specific chromosome abnormality in human chronic myeloid leukaemia, *Nature*, 1960, 188, 1165-1166.
- 19- **Dutrillaux B, Finaz C, DE GROUCHY J, and. LEJEUNE. J**, Comparison of banding patterns of human chromosomes obtained with heating, fluorescence, and proteolytic, *Cytogenetics*, 1972, 11:113-116.
- 20- **Groffen, J. et al**, Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, BCR, on chromosome 22, *Cell* 36, 1984, 93–99.
- 21- **Fialkow. P**, Genes and Cancer, *nature*, 1984, 215–226.
- 22- **Laurent B.** Mécanismes d'adhérence des leucocytes aux fibres synthétiques ; application à la filtration du sang. Thèse de doctorat en biomécanique, université paris 7– denis diderot. Ufr de physique, 14 décembre 2001.
- 23- **Ferrant A**, hématologie tome 1, Faculté de Médecine Unité d'Hématologie, 2004.
- 24- **Lacombe C.** Les cellules souches hématopoïétiques humaines normales: régulation et méthodes d'exploitation D1 – Hématologie 2005 – 2006.
- 25- **Lacombe C.** Hématopoïèse et signalisation cellulaire : applications cliniques. D1 – Hématologie 2005 – 2006.
- 26- **Berthou C** .L'hématopoïèse et son exploration. 12 octobre 2004.
- 27- **Bouscary D.** Intérêt de l'étude des voies de signalisation en hématologie maligne. D1 – Hématologie 25 Novembre 2005.
- 28- **Debru C.** Les leucémies aiguës : une vue historique des classifications. *médecine/sciences* 1996 ; 12 : 491-5.
- 29- **Löwenberg B, Downing JR, Burnett A.** Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.*1999; 341:1051–62.

- 30- **Burnett AK.** Introduction: Modern management of acute myeloid leukaemia. *Seminars in haematology* 2001; 38:1–2.
- 31- **Fenaux P, Chomienne C, Degos L.** All-trans retinoic acid and chemotherapy in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Seminars in hematology* 2001; 38:13–25.
- 32- **Smaili F.** Abrégé d'hématologie. Office des publications universitaires. P156-180.2003.
- 33- **Hoelzer D, Gökbuget N.** Recent approaches in acute Lymphoblastic leukemia in adults. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 2000; 36: 49–58.
- 34- **Pui CH, Evans WE.** Acute Lymphoblastic leukaemia. *N Engl J Med* .1998;339:605–15.
- 35- **Montserrat E, Rozman C.** Chronic lymphocytic leukemia: Present status. *Ann Oncol.* 1995; 6:219–35.
- 36- **Zwiebel JA, Cheson BD.** Chronic lymphocytic leukemia: staging and prognostic factors. *Semin Oncol.*1998; 25:42.
- 37- **Pettitt AR, Zuzel M, Cawley J.** Hairy cell leukemia: Biology and management. *Brit J Haematol* 1999;106:2–6.
- 38- **Jaffe E, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (eds).** Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues: World Health Organization Classification of Tumours. *Lyon: IARC Press;* 2001.
- 39- **N. Braham Jmili, A. Ben Abdelaziz, M. Nagara, T. Mahjoub, H. Ghannem et M. Kortas.** Aspects cytologiques des leucémies aiguës : à propos de 193 cas colligés dans la région centrale de la Tunisie. *La Revue de Santé de la Méditerranée orientale.* Vol. 10, No 4/5, 2004.
- 40- **Hammouda, Ait Hamadouche, M. Aoun, D, et al.** Registre des tumeurs d'Alger, année 2003.en ligne.
- 41- **L. Remontet, A. Buemi, M. Velten, E. Jouglu, J. Estève.** Évolution de l'incidence et de la mortalité par cancer en France de 1978 à 2000. Département maladies chroniques et traumatismes. septembre 2002.
- 42- **Bergerat -J-P.** Cancérogenèse et développement tumoral. Faculté de Médecine – U.L.P.- Strasbourg – France Enseignement 2003.
- 43- **Blanchar J-M.** Oncogènes et Régulateurs du cycle cellulaire. Laboratoire : IGMM : Institut de Génétique Moléculaire.
- 44- **Ridgway.P ,Almouzni.G et al.** Hémopathies malignes. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology.2004.

- 45- **European Group for the Immunological Characterization of Leukemia (EGIL): Bene MC, Gastoldi G, Knapp W, et al.** Proposals for the immunologic classification of acute leukemias. *Leukemia*. 1995; 9: 1783–6.
- 46- **Löwenberg B.** Prognostic factors in acute myeloid leukaemia: Best Practice & Research Clinical. *Haematology* 2001; 14:65–75.
- 47- **Laport GF, Larson RA.** Treatment of adult acute Lymphoblastic leukemia. *Semin Oncol* 1997; 24: 70–82.
- 48- **Zwiebel JA, Cheson BD.** Chronic lymphocytic leukemia: staging and prognostic factors. *Semin Oncol* 1998; 25:42.
- 49- **Petit J. M, Maftah. D, Julien R.** Biologie cellulaire. Edition Dumod Paris. 2002.
- 50- **Griffith, Celbart, Miller, Lewontin.** Analyse génétique moderne .De Boeck, Université s.a 171 rue de renes. F-75006. Paris.2001.
- 51- **Blanchard J-M.** Des oncogènes aux régulateurs de la mitose: un changement de perspective dans notre vision des processus cancéreux, Institut de Génétique Moléculaire, Cnrs UMR 5535, IFR24, Équipe labellisée La Ligue, 1919, route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France. *MEDECINE/SCIENCES* 2003 ; 19 : 187-99.
- 52- **Peng. H et al.** Clonality analysis of defined cell populations in paraffin-embedded tissue sections by RT-PCR amplification of X-linked G6PD gene. *JPathol.* 191, 313-7.2000.
- 53- **Baillet.** Cancérologie DCEM3, Université PARIS-VI Pierre et Marie Curie. SFPO, Monaco, 16 au 18 octobre 2003.
- 54- **Blanchard J-M.** Oncogènes et Régulateurs du cycle cellulaire. *En ligne.* Laboratoire. IGMM : Institut de Génétique Moléculaire . Mise à jour : 6 janvier 2004.
- 55- **Yves P, Kurt W. Kohn.** Cycle cellulaire et points de contrôle en oncologie : nouvelles cibles Thérapeutiques, Laboratoire de pharmacologie moléculaire, Center for Cancer Research, National Cancer Institute, Bldg 37, Room 5068, NIH, Bethesda, MD 20892-4255, États-Unis. *MEDECINE/SCIENCES.* 2003. 19: 173-86.
- 56- **Sinclair PB, Nacheva EP, Leversha M, Telford N, Reid A, et al.** Large deletions at the t(9;22) breakpoint an and may identify a pour prognosis subgroup of patients with myeloid leukemia. *Blood.* 2001.95:738-43.
- 57- **Cheung KL, O'Brieni N, et al.** Cross-species colour banding in 10 cases malignancies with complex karyoyypes. *Genes Chromosomes.* 2001.30:15-24.
- 58- **Wiegant I, Bezrookove V, Rosenberg C, Tanke HJ, hang H, et al.** Differentially painting human chromosome combined binary radio labelling fluorescence in situ hybridization. *Genorne.* 2000.10:861-5.

- 59- **Lichter P, zoos S, Bentz M, Lampel S.** Comparative hybridization: uses and limitations. *Semin Hemato.* 2000.
- 60- **Bastard.C,** Biologie moléculaire : généralité. *Revue pathologie/biologie.* 2003 ;51 :6.
- 61- **Hafraoui.K, Humblet.S, Baron.F, Beguin. Y, Fillet. G.** Comment je traite ... la leucémie myéloïde chronique (LMC). *Rev Med Liege.* 2003; 58: 1: 7-12.
- 62- **Deininger MW, Goldman JM, Melo JV.** The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2000; 96, 3343-3356.
- 63- **Goldman. JM, Druker. BJ.** Chronic myeloid leukemia: current treatment options. *Blood,* 2001, 98, 2039-2042.
- 64- **Reinhard. Z, Caroline. Z, Max. S, Martin.F. Tobler, F A.** Leucémies aiguës de l'adulte. *Forum Med Suisse* .No 29/30 .23 juillet 2003.
- 65- **Mugneret.F, Callier.P, Favre.B** Anomalies chromosomiques dans les LAM. *Pathologie/Biologie.*2003. 51 ; 314-328.
- 66- **Lafage.M, C.Charrin.** Anomalies cytogénétiques dans les LAL. *Pathologie/Biologie.*2003. 51 ; 329-336.
- 67- **Leroux.D, Lefebvre.C, Callanan.M.** Anomalies génétiques des les LLC. *Pathologie/Biologie.*2003. 51 ; 366-374.
- 68- **GFCH.** Recommandations pour la prise en charge cytogénétique de la LMC établit par le GFCH. *Pathologie/Biologie.*2004. 52 ; 238-240.
- 69- **Goldman M.** Management of chronic myeloid Leukemia. *Seminar in haematology.* 2003.40 (1):1-103.
- 70- **Johansson B, Billstrom R.** Deletion of chromosome arm 3 in haematological malignancies. *Leukemia* .1997. Aug; 11(8):1207-1213.
- 71- **GFCH.** Collaborative study of karyotypes in childhood acute lymphoblastic Leukemia. *Lancet oncology* .1993.7:10-9.

ANNEXES :

Tableau I : La population des cellules sanguines.

(Berthou C. L'hématopoïèse et son exploration. 12 octobre 2004).

Types de cellules	Fonction	Concentration (cellule/litre)	Durée de vie sanguine (jours)
Globules rouges	Transport O ₂ /CO ₂	5 x 10 ¹²	120
Plaquettes	Hémostase	3 x 10 ¹¹	7
Poly Neutrophile	Phagocytose, bactéricidie	4 x 10 ⁹	1
Monocytes	- Activation des lymphocytes - Précurseur des macrophages impliqués dans la phagocytose des micro-organismes et cellules sénescents	5 x 10 ⁸	1
Lymphocytes T	- Immunité cellulaire - Régulation de activité des cellules leucocytaires	8 x 10 ⁸	>1
Lymphocytes B	Production d'anticorps	10 ⁸	>1

Tableau II : Valeurs normales de l'hémogramme chez l'homme, la femme et l'enfant

(Berthou C. L'hématopoïèse et son exploration. 12 octobre 2004).

	HOMME	FEMME	ENFANT
Leucocytes	4 à 10 x 10 ⁹ /l	4 à 10 x 10 ⁹ /l	5 à 15 x 10 ⁹ /l
Hématies	4,5 à 6 x 10 ¹² /l	4 à 5,5 x 10 ¹² /l	4 à 6 x 10 ¹² /l
Hémoglobine	13 à 17 g/dl	11,5 à 15 g/dl	12 à 14 g/dl
Hématocrite	0,40 à 0,54	0,37 à 0,47	0,36 à 0,44
VGM	80 à 100 fl	80 à 100 fl	80 à 100 fl
TCMH	27 à 32 pg	27 à 32 pg	27 à 32 pg
CCMH	30 à 36 g/dl	30 à 36 g/dl	30 à 36 g/dl
Réticulocytes	20 à 120 x 10 ⁹ /l	20 à 120 x 10 ⁹ /l	20 à 120 x 10 ⁹ /l
Plaquettes	140 à 400 x 10 ⁹ /l	140 à 400 x 10 ⁹ /l	140 à 400 x 10 ⁹ /l
PN	2 à 7,5 x 10 ⁹ /l	2 à 7,5 x 10 ⁹ /l	2 à 7,5 x 10 ⁹ /l
PE	0,04 à 0,5 x 10 ⁹ /l	0,04 à 0,5 x 10 ⁹ /l	0,04 à 0,5 x 10 ⁹ /l
PB	0,01 à 0,1 x 10 ⁹ /l	0,01 à 0,1 x 10 ⁹ /l	0,01 à 0,1 x 10 ⁹ /l
Lympho	1,5 à 4 x 10 ⁹ /l	1,5 à 4 x 10 ⁹ /l	3 à 6 x 10 ⁹ /l
Mono	0,2 à 1 x 10 ⁹ /l	0,2 à 11 x 10 ⁹ /l	0,2 à 1 x 10 ⁹ /l

Tableau III : Les valeurs normales du myélogramme.

(Berthou C .L'hématopoïèse et son exploration. 12 octobre 2004).

Cellules souches indifférenciées	< 2%
Lignée Granuleuse	50 à 70 %
Neutrophiles	
- Myéloblastes	<3%
- Promyélocytes	< 5%
- Myélocytes	5 à 20 %
- Métamyélocytes	5 à 20 %
- Polynucléaires	10 à 25 %
Eosinophiles et basophiles	< 4%
Lignée Erythroblastique	10 à 30 %
Proérythroblastes	0 à 2%
Erythroblastes basophiles	2 à 4 %
Erythroblastes polychromatophiles	4 à 8 %
Erythroblastes acidophiles	3 à 6 %
Lignée Mégacaryocytaire	Présents
Mégacaryocytes	
Eléments non myéloïdes	< 25 %
Lymphocytes	< 20 %
Plasmocytes	< 4 %
Monocytes et cell histiocytaires	< 2 %

Tableau IV : La classification FAB des leucémies aiguës.

(Ferrant. A, hématologie tome 1, Faculté de Médecine Unité d'Hématologie, 2004).

Type de leucémie	Sous type	Caractéristiques
Leucémie aiguë myéloblastique	LAM 0	Les blastes ne sont pas classables sur les seuls critères morphologiques et la MPO est négative. Seul, le phénotype permet de classer les blastes dans cette catégorie en montrant, en l'absence de marqueurs lymphoïdes, la présence de marqueurs myéloïdes.
	LAM 1	Blastose médullaire de type myéloblastique avec moins de 10 % de la maturation granuleuse.
	LAM 2	Blastose médullaire de type myéloblastique avec plus de 10 % de maturation granuleuse présentant ou non des signes de dysgranulopoïèse.
	LAM 3	Leucémie aiguë promyélocytaire. -Forme classique : Les blastes sont de taille variable avec un noyau réniforme. Le cytoplasme est basophile et comporte soit de nombreuses granulations azurophiles, soit de volumineuses granulations foncées soit de nombreux corps d'Auer en fagots. -Forme variante : Les blastes sont peu ou agranulaires à noyau en bissac ; quelques blastes à corps d'Auer ou à grosses granulations sont présents en nombre variable.
	LAM 4	Elle se définit par la présence conjointe de blastes appartenant à la lignée granuleuse et à la lignée monocytaire (> 20 % de blastes). Il existe comme dans la LAM2 une maturation granuleuse de plus de 10 % de morphologie normale ou dysplasique. LAM4 éosino : se caractérise par une maturation granuleuse constituée par des éosinophiles anormaux ; elle est corrélée à l'existence d'une anomalie cytogénétique caractéristique.
	LAM 5	Plus de 90 % des blastes appartiennent à la lignée monocytaire. Ce sont soit des éléments peu différenciés dans LAM5a (monoblastes) soit des éléments plus différenciés dans le LAM5b (promonocytes, monocytes).
	LAM 6	Erythroleucémie : Elle se définit par une hyperplasie érythroblastique dépassant 50 % et la présence d'au moins 30 % de blastes myéloïdes parmi les cellules granuleuses.
	LAM 7	La moelle est souvent hypocellulaire avec des signes de myélofibrose. Les blastes sont parfois identifiables par leur morphologie rappelant la lignée mégacaryocytaire mais souvent, ils présentent un aspect indifférencié ou lymphoïde. Le phénotype est indispensable pour affirmer cette catégorie.
Leucémie aiguë lymphoblastique	LAL L 1	Forme la plus fréquente chez l'enfant, elle représente 80 à 85 % des LAL. Elle est définie par la présence de blastes de petite taille avec un rapport nucléocytoplasmique élevé et une chromatine finement dispersée. Les nucléoles sont peu ou pas visibles.
	LAL L 2	Elle correspond à 15 à 20 % des LAL de l'enfant et est majoritaire chez l'adulte. Elle est définie par la présence de blastes de taille hétérogène à cytoplasme abondant, à noyau le plus souvent irrégulier et comportant un ou plusieurs volumineux nucléoles.
	LAL L 3	La morphologie est identique à celle du lymphome de Burkitt. Les blastes sont de taille moyenne, constituant une population homogène au cytoplasme abondant très basophile, parfois vacuolisé. Un ou plusieurs volumineux nucléoles sont présent

Tableau V : la classification OMS des leucémies aiguës.

(Ferrant.A, hématologie tome 1, Faculté de Médecine Unité d'Hématologie, 2004.)

Type de leucémie	Sous type	
LAM : leucémie aiguë myéloblastique	LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes	LAM avec t (8; 21) (q22; q22)
		LAM avec t (15 ; 17) (q22 ; q12) et ses variants.
		LAM avec éosinophiles médullaires anormaux et anomalies sur le chromosome 16 : inv (16) (p13q22) ou t (16; 16) (p13; q22)
		LAM avec anomalie chromosomique 11q23
	LAM avec dysplasie multi lignées	Faisant suite à un syndrome myélodysplasique ou un syndrome myéloprolifératif/dysplasique
		Sans antécédent de myélodysplasie
	LAM post chimiothérapie	Liée aux agents alkylants
		Liée aux inhibiteurs de topoisomérase type II (quelques unes pouvant être lymphoïdes)
		Liées à d'autres composants
	LAM sans catégorisation particulière	LAM avec différenciation minimale
		LAM sans maturation
		LAM avec maturation
		LA myélomonocytaire
		LA monoblastique ou monocytaire
		LA érythroïde
		LA mégacaryoblastique
LAM à composante basophile		
LA avec myélofibrose		
Sarcome granulocytaire		
LAL : leucémie aiguë lymphoblastique	Leucémie aiguë lymphoblastique à précurseurs B / lymphome lymphoblastique B	
	Leucémie aiguë lymphoblastique à précurseurs T / lymphome lymphoblastique T	

Tableau VI : La classification OMS des lymphomes.

(Ferrant. A, hématologie tome 1, Faculté de Médecine Unité d'Hématologie, 2004.)

Néoplasmes de cellules B	Néoplasme des précurseurs des cellules B.	leucémie lymphoblastique pré B
		lymphome lymphoblastique
	Néoplasmes B matures	Leucémie lymphoïde chronique B/ leucémie à polylmphocytes/ lymphome lymphocytaire
		Lymphome lymphoplasmocytoïde/ immunocytome
		Lymphome du manteau
		Lymphome folliculaire (à petites cellules, mixte à petites et grandes cellules, à grandes cellules), lymphome de la zone marginale B Extra nodal, lymphome de type MALT Nodal, lymphome monocytoïde
		Lymphome splénique de la zone marginale (+/- lymphocytes villeux)
		La leucémie à tricholeucocytes
		Plasmocytome/ myélome
		Lymphome diffus à grandes cellules B Sous-classe: lymphome médiastinal à cellules B
Lymphome de Burkitt		
Lymphome B de haut degré de malignité, Burkitt-like		
Lymphomes T et néoplasies de la cellule NK	Lymphome lymphoblastique ou leucémie à précurseurs T	Lymphome lymphoblastique ou leucémie à précurseurs T
	Néoplasmes matures T et NK	<ol style="list-style-type: none"> 1. Leucémie lymphoïde chronique T, leucémie à polylmphocytes T 2. Leucémie à grands lymphocytes granuleux, de type T ou de type NK 3. Mycosis fungoïde/ syndrome de Sézary 4. Lymphomes périphériques à cellules T (à cellules de taille moyenne, mixte à cellules de taille moyenne et de grande taille, à cellules de grande taille, à cellules lymphoépithélioïdes, lymphome hépatosplénique à cellules T gamma-delta et lymphome T sous-cutané panniculitique). 5. Lymphome T angioimmunoblastique 6. Lymphome angiocentrique 7. Lymphome T intestinal (avec ou sans entéropathie) 8. «Adult T-cell lymphoma/leukemia (ATL/L), HTLV-1 + » 9. Lymphome anaplasique à grandes cellules, CD30+, types cellulaires T. 10. Lymphome anaplasique à grandes cellules, «Hodgkin's like». 11. Lymphome anaplasique primitif à grandes cellules. 12. Lymphome T sous-cutané, « panniculite-like ». 13. Lymphome à cellules T de type entéropathique.

Tableau VII : La classification FAB et OMS des SMPC

(Ferrant, A, Hématologie tome 1, Faculté de Médecine Unité d'Hématologie, 2004.)

Classification FAB des SMPC	La leucémie myéloïde chronique (LMC)	
	La polyglobulie essentielle ou maladie de Vaquez (PE)	
	La myélofibrose avec splénomégalie myéloïde	
	La thrombocytémie essentielle	
Classification OMS des SMPC	Les SMPC Philadelphie (+)	La leucémie myéloïde chronique (LMC)
	Les SMPC Philadelphie (-)	La leucémie myéloïde chronique (LMC)
		La polyglobulie essentielle ou maladie de Vaquez (PE)
		La myélofibrose avec splénomégalie myéloïde
		La thrombocytémie essentielle
		La leucémie neutrophilique chronique
		La leucémie éosinophilique chronique
		Le syndrome hyperéosinophilique
Les SMPC non classés		

Tableau VIII : L'immunophénotypage des hémopathies malignes.

(Ferrant. A, Hématologie tome 1, Faculté de Médecine Unité d'Hématologie, 2004.)

Marqueur	Activité	Pathologie
CD3	Lymphocytes T	Hémopathie lymphoïde T
CD4	Lymphocytes T sécréteurs de cytokines	Hémopathie lymphoïde T
CD5	Lymphocytes T normaux, Lymphocytes B de la LLC	LLC LNH du manteau
CD7	Lymphocytes T	Hémopathie lymphoïde T
CD8	Lymphocytes T cytotoxiques (= destruction cellulaire)	Hémopathie lymphoïde T Cytotoxique et T/NK
CD10	Lymphoblastes pré-B => Lymphocytes B folliculaires =>	=> LAL pré-B => LNH folliculaire
CD16	Polynucléaires, macrophages, Lymphocytes NK	LAM dont LAM4, LAM5 Hémopathie lymphoïde NK
CD 19	Lymphocytes B	Hémopathie lymphoïde B
CD 20	Lymphocytes B	Hémopathie lymphoïde B
CD 23	Lymphocytes B	LLC -B
CD30 (ancien Ki-1)	Lymphocytes activés (non retrouvés dans les lymphocytes normaux)	Maladie de Hodgkin Lymphome anaplasique Certains lymphomes cutanés
CD45	Cellules hématopoïétiques sauf érythroblastes	Tumeurs hématopoïétiques
CD56	Lymphocytes NK	Hémopathie lymphoïde NK
Alk = Anaplastic Lymphoma Kinase	Marqueur de la translocation t(2 ;5) impliquant le gène alk	Lymphome anaplasique à grandes cellules
Bcl2	Inhibiteur d'apoptose (= mort cellulaire programmée)	LNH folliculaire LNH du manteau
Ki-67	Cellules en cycle	Indice de prolifération
Cycline D1	Cellules en cycle	LNH du manteau
Perforine	Marqueurs de cytotoxicité (= destruction cellulaire) : - lymphocytes T cytotoxiques - lymphocytes NK	Hémopathies lymphoïdes T cytotoxique et NK
Granzyme B		
Antigène T intra-cellulaire (TIA-1)		

Tableau IX : Les anomalies cytogénétiques des leucémies ayant pour conséquence la surexpression d'une protéine oncogénique.

(Gisselbrecht S. Oncogènes et leucémies : historique et perspectives. *MEDECINE /SCIENCES*. 2003 ; 19 : 201-10).

A. SUREXPRESSION DE PROTÉINES ONCOGÉNIQUES					
Type de gène	Fonction	Gène	Translocation	Régions régulatrices	Type de leucémie
Facteurs de transcription et régulateurs transcriptionnels	Protéine de type bHLH	<i>MYC</i> (8q34)	t(8;14)(q24;q11)	TCR α	LAL T
			t(8;14)(q24;q32) t(2;8)(p12;q24) t(8;22)(q24;q11)	IgH, IgL	Lymphomes et leucémie de Burkitt, leucémies lymphoïdes chroniques
		<i>TAL 1</i> (1p32)	t(1;14)(p32;q11)	TCR α	LAL T
		<i>LYL 1</i> (19p13)	t(7;19)(q35;p13)	TCR β	LAL T
	Protéine à homéodomaine	<i>HOX11</i> (10q24)	t(10;14)(q24;q11) t(7;10)(q35;q24)	TCR α , TCR β	LAL T
		<i>HOX11L2</i> (5q35)	t(5;14)(q35;q32)	gène: <i>CTIP2</i>	LAL T
	Protéine à domaine LIM	<i>LMO1</i> (11p15)	t(11;14)(p15;q11)	TCR δ	LAL T
		<i>LMO2</i> (11p13)	t(11;14)(p13;q11) t(7;11)(q35;p13)	TCR δ , TCR α , TCR β	LAL T
	Protéine à doigts de zinc	<i>EVI 1</i> (3;q26)	t(3;3)(q21;q26) inv (3)(q21;q26)	gène: <i>ribophorine</i>	LAM
		<i>LAZ 3/BCL6</i> (3q27)	t(3;14)(q27;q32) t(3;22)(q27;q11) t(3;4)(q27;p11)	IgH, IgL	Lymphomes non hodgkiniens
			gène: <i>ITF</i>		
Autres	Tyrosine kinase	<i>LCK</i> (1p34)	t(1;7)(p34;q34)	TCR β	LAL T
	Activateur d'AKT	<i>TCL1</i> (14q32)	t(14;14)(q11;q32) inv (14)(q11;q32)	TCR α	Leucémies polymphocytaires T
		<i>MTCPI</i> (Xq28)	t(X;14)(q28;q11)	TCR α	Leucémies polymphocytaires T
	Récepteur de la famille Notch (forme tronquée)	<i>TANI</i> (9q34)	t(7;9)(q34;q34)	TCR β	LAL T
	Interleukine-3	<i>IL-3</i> (5q31)	t(5;14)(q31;q32)	IgH	LAL pré-B
	Cycline D1	<i>BCL1</i> (11q13)	t(11;14)(q13;q32)	IgH	Leucémies lymphoïdes chroniques et lymphome du manteau
	Protéine anti-apoptotique	<i>BCL-2</i> (18q21)	t(14;18)(q32;q21)	IgH	Lymphomes folliculaire:

Tableau X : Les anomalies cytogénétiques des leucémies ayant pour conséquence la production d'une protéine de fusion. (Gisselbrecht S. Oncogènes et leucémies: historique et perspectives. *MEDECINE /SCIENCES*. 2003 ; 19 : 201-10).

B. PRODUCTION DE PROTÉINES DE FUSION				
Type de gène	Translocation	Gènes affectés	Fonction	Type de leucémie
Facteurs de transcription et régulateurs transcriptionnels	t(12;21)(p13;q22)	<i>TEL</i> (12p13) <i>AML1</i> (21q22)	Facteur ETS Sous-unité du CBF ou CBF α fixant l'ADN (domaine runt)	LAL pro-B
	t(8;21)(q22;q22)	<i>AML1</i> (21q22) <i>ETO</i> (8q22)	Sous-unité CBF α du CBF Protéine nucléaire à doigts de zinc	LAM
	t(3;21)(q26;q22)	<i>AML1</i> (21q22) <i>EVI1</i> (3q26)	Sous-unité CBF α du CBF Protéine nucléaire à doigts de zinc	LAM secondaires
	Inv(16)(p13;q22)	<i>CBFβ</i> (16q22) <i>SMMHC</i> (16p13)	Sous-unité CBF β du CBF Chaîne lourde des chaînes de myosine du muscle lisse	LAM à éosinophiles
	t(1;19)(q23;p13)	<i>E2A</i> (19p13) <i>PBX1</i> (1q23)	Facteur de transcription de type bHLH Facteur de transcription à homéodomaine	LAL pré-B
	t(17;19)(q22;p13)	<i>E2A</i> (19p13) <i>HLF</i> (17q22)	Facteur de transcription de type bHLH Facteur de transcription à <i>leucine zipper</i>	LAL pro-B
	t(15;17)(q21;q12)	<i>PML</i> (15q21)	Protéine à doigts de zinc de type <i>ring</i> (corps nucléaires)	Leucémies aiguës promyélocyaires (LAP)
	t(11;17)(q23;q12)	<i>RARα</i> (17q12) <i>PLZF</i> (11q23)	Récepteur α de l'acide rétinoïque Protéine nucléaire à doigts de zinc	apparenté aux LAP
	t(11;17)(q13;q12)	<i>RARα</i> (17q12) <i>NuMA</i> (11q13)	Récepteur α de l'acide rétinoïque Protéine de la matrice nucléaire	apparenté aux LAP
	t(5;17)(q35;q12)	<i>RARα</i> (17q12) <i>NPM</i> (5q35)	Récepteur α de l'acide rétinoïque Nucléophosmine (protéine nucléolaire)	apparenté aux LAP
	t(17;17)(q11;q12)	<i>STAT5B</i> (17q11) <i>RARα</i> (17q12)	Récepteur α de l'acide rétinoïque Facteur de transcription de la famille STAT	apparenté aux LAP
	t(4;11)(q21;q23)	<i>MLL</i> (11q23) <i>AF4</i> (4q21)	Orthologue du gène <i>Trithorax</i> Activateur transcriptionnel	Leucémies bi-phénotypiques de l'enfant
	t(6;11)(q27;q23)	<i>MLL</i> (11q23) <i>AF6</i> (6q27)	Orthologue du gène <i>Trithorax</i> Fonction mal connue	LAM myélo-monocytaires et monoblastique
	t(9;11)(p22;q23)	<i>MLL</i> (11q23) <i>AF9</i> (9p22)	Orthologue du gène <i>Trithorax</i> Activateur transcriptionnel	LAM myélo-monocytaires et monoblastique Leucémies secondaires
	t(11;19)(q23;p13)	<i>MLL</i> (11q23)	Orthologue du gène <i>Trithorax</i>	(inhibiteurs de topo-isomérase II) LAM, LAL B et leucémies bi-phénotypiques de l'enfant
	t(7;11)(p15;p15)	<i>ENL</i> (19p13) <i>NUP98</i> (11p15)	Activateur transcriptionnel Nucléoporine (protéine associée au pore nucléaire)	LAM secondaires
	t(6;9)(p23;q34)	<i>HOXA9</i> (7p15) <i>DEK</i> (6p23) <i>CAN</i> (9q34)	Facteur de transcription à homéodomaine Facteur de transcription NUP214 (protéine associée au pore nucléaire)	LAM à basophiles
	t(1;22)(p13;q13)	<i>OTT</i> (1p13)	Protéine nucléaire de la famille Spen	Leucémies aiguës mégacaryocytiques de l'enfant
	t(16;21)(p11;q22)	<i>MAL</i> (22q13) <i>FUS</i> (16p11) <i>ERG</i> (21q22)	Co-activateur du facteur SRF Protéine se liant à l'ARN Facteur de transcription famille ETS	LAM
	Tyrosine kinases	t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR</i> (22q11)	Ser/Thr kinase, facteur d'échange de Rho, GAP de Rac
t(9;12)(q34;p13)		<i>ABL</i> (9q34) <i>TEL</i> (12p13)	Tyrosine kinase intracellulaire Facteur ETS	apparenté à la LMC
t(9;12)(p24;p13)		<i>ABL</i> (9q34) <i>TEL</i> (12p13)	Tyrosine kinase intracellulaire Facteur ETS	LAL B, LAL T, LMC
t(5;12)(q33;p13)		<i>JAK2</i> (9p24) <i>TEL</i> (12p13)	Tyrosine kinase intracellulaire Facteur ETS	Leucémies myélonocytaires chroniques
t(5;7)(q33;q11)		<i>PDGFRβ</i> (5q33) <i>HIP1</i> (7q11)	Récepteur β du PDGF Protéine interagissant avec la protéine de Huntington	Leucémies myélonocytaires chroniques
t(5;17)(q33;p13)		<i>PDGFRβ</i> (5q33) <i>Rabaptine</i> (17p13)	Récepteur β du PDGF Protéine impliquée dans l'endocytose (interagit avec rab 4 et 5)	Leucémies myélonocytaires chroniques
t(6;8)(q27;p12)		<i>PDGFRβ</i> (5q33) <i>FOP</i> (6;q27)	Récepteur β du PDGF Fonction inconnue	Syndromes myéloprolifératifs atypiques
t(8;9)(p12;q33)		<i>FGFR1</i> (8p12) <i>CEP110</i> (9q33)	Récepteur 1 du FGF Protéine associée au centrosome	Syndromes myéloprolifératifs atypiques
t(8;13)(p12;q12)		<i>FGFR1</i> (8p12) <i>FIM</i> (13q12)	Récepteur 1 du FGF Protéine à doigts de zinc	Syndromes myéloprolifératifs atypiques
t(8;13)(p12;q12)		<i>FGFR1</i> (8p12)	Récepteur 1 du FGF	Syndromes myéloprolifératifs atypiques

Questionnaire

Patient N° :

FICHE DE RENSEGNEMENT

Nom :

Prénom :

Sexe :

Age :

Poids et taille :

Adresse :

Profession :

Type de leucémie :

Date du diagnostic et motif d'hospitalisation :

Traitement :

Durée du traitement :

Etat du patient :

 Rémission complète :

 Poursuite évolutive :

 Rechute, date de rechute :

Si autre cancer :

 Diagnostiqué le :

 Siège:

Si patient décédé :

 Date :

 Cause du décès (en clair) :

Présence de cancers dans la famille:

 Leucémie :

 Autre cancer :

 Type de cancer :

Présence de maladie génétique dans la famille :

 Impliquant des anomalies cytogénétiques :

 Ne présentant pas d'anomalie cytogénétiques :

 Type de maladie génétique :

SYMPTOMATOLOGIE CLINIQUE				
Signes d'insuffisance médullaire	Signes anémiques	Pâleur		
		Asthénie		
		Tachycardie		
		Dyspnée d'effort		
	Signes infectieux	Fièvres (en rapport avec la neutropénie)		
		Foyers infectieux	Bucco pharyngées	
			Génitaux	
			Anaux	
			Autres	
	Fièvre leucémique			
	Signes hémorragiques	Purpura ecchymotiques		
		Purpura pétéchial		
Hémorragie des muqueuses				
Hémorragie viscérales				
Signes tumoraux	Adénopathie	Adénopathies superficielles		
		Adénopathies médiastinales		
		Adénopathies retro-peritoniales		
	Douleurs	Douleurs osseuses		
		Douleurs ostéoarticulaires		
	Splénomégalie	Splénomégalie modérée		
		Splénomégalie importante		
	Hépatomégalie	hépatomégalie modérée (stade 1, 2,3)		
		hépatomégalie importante (stade 4,5)		
	Hypertrophie ganglionnaire diffuse			
	Hypertrophie amygdalienne			
	Hypertrophie des glandes salivaires			
Méningites				
Atteinte des testicules				

Autres remarques :

ANALYSES BIOLOGIQUES

Examen	Type cellulaire	Valeurs normales	observation	
Hémogramme	Polynucléaires neutrophiles	2 à 7,5 x 10 ⁹ /l (45-70%)		
	Polynucléaires éosinophiles	0,04 à 0,5 x 10 ⁹ /l (1-3%)		
	Polynucléaires basophiles	0,01 à 0,1 x 10 ⁹ /l (0-0,8%)		
	Lymphocyte	1,5 à 4 x 10 ⁹ /l (20-40%)		
	Monocyte	0,2 à 1 x 10 ⁹ /l (2-10%)		
	Plaquettes	200000 à 500000 /ml		
	MYELEMIE			
	BLASTOSE			
	Type de myélémie			
	Type de blastose			
Medullogramme	Myéloblastes	0,1 à 3,5 %		
	Promyélocytes	0,5 à 5 %		
	Myélocytes Neutrophiles	5 à 20 %		
	Myélocytes éosinophiles	0,1 à 3 %		
	Myélocytes basophiles	0 à 0,05 %		
	Métamyélocytes	10 à 30 %		
	Polynucléaires neutrophiles	7 à 25 %		
	Polynucléaires éosinophiles	0,2 à 3 %		
	Polynucléaires basophiles	0 à 0,5 %		
	Proérythroblastes	0,5 à 3 %		
	Erythroblastes basophiles	10 à 30 %		
	Erythroblastes polychromatophiles	10 à 30 %		
	Erythroblastes acidophiles	10 à 30 %		
	Lymphocytes	5 à 30 %		
	Plasmocytes	0,1 à 3,5 %		
	Monocytes	0 à 3 %		
	Mégacaryocytes	++		
	Conclusion			
Cytologie	Lignée proliférative			
	Rapport nucléo-cytoplasmique			
	Chromatine	Fine		
		Condensé (en motte)		
	Nucléole	Nombre		
		Aspect		
	Contour nucléaire	Régulier		
		Irrégulier		
	Basophilie cytoplasmique	Modérée		
		Importante		
	Vacuole cytoplasmique	Présente		
		Absentes		
		Nombre		
	Granulations lymphocytaires			
	Granulations azurophile			
	Coloration PAS			
	Bâtonnet d'AUER			
	Peroxydase			
	Noir de soudan			
	Ombre de Gumprecht			
	Analyses biochimiques	Uricémie	0,2-0,4 g/l	
		Hémoglobine	13-17 g/l	
Phosphatase alcaline leucocytaire		40-150 UI/ml		

	Vitamine B 12	160-900 mg/l	
	gammaglobuline		
	LDH	240 UI/l	
	Glycémie	0,6-0,9 g/l	
	Bilirubine	<10 mg/l	
	Créatinine	5-10 mg/l	
	Albumine	36-45 g/l	
	Protéine sérique	61-76 g/l	
	CPK	< 70 UI/l	
	Na ⁺ / K ⁺	3,15-3,47 mg/l / 0,15-0,21 mg/l	
	Acide urique	40-60 mg/l	
	TGO/TGP	< 40UI /ml / < 45UI /ml.	
Analyse hématologique	Vitesse de sédimentation	5-15 mm/h	
	Hématocrite	0,38 – 0,50 (38 à 50 %)	
	WBC	4000-10000 mm ³	
	RBC	4-5,5 million /ml	
	MCV	85-95 μ ³	
	MCH	28-32 pg	
	MCHC	32-43 %	
	Microcytose/macrocytose		
	Normochromie/hypochromie		
Bilans préthérapeutiques	Système ABO		
	Rhésus		
	Bilan cardiaque		
	Bilan hépatique		
	Uricémie		
	T. Quick (Tx Prothrombine)	> 65 ± 5 %	
	T. Céphaline	/	

Compte rendu clinique et biologique :

Cytologie :

Cytogénétique :

Conclusion générale :

الملخص:

ابيضاض الدم يمثل فوج لا متجانس لأمراض الدم الورمية و هو معرف بانقسام خلوي غير منتظم لخلية استنساخية و مكتسبة من الخلية المولدة للدم أو من بادئة لسلالة الخلايا النخاعية و/أو اللمفاوية. هي عبارة عن مرض سرطاني خطير على الصحة العامة و يعرف عموما بسرطان الدم.

تشخيص هذه الأمراض يمر من خلال دراسة دموية و خلوية و بيوكيميائية أساس تقسيم FAB لابيضاض الدم. مع تطور المعلومات في مجال الوراثة الخلوية أساس تقسيم OMS لابيضاض الدم أمكن التقرييق الجيد ما بين العناصر المرضية بفضل الأبحاث في الوراثة الخلوية و أين الهدف يكون مزدوج :

- هدف تطبيقي من أجل التكفل بهذه الأمراض من خلال التشخيص التنبؤ اختيار و متابعة العلاج.
- أما الهدف العلمي فهو من أجل فهم الآليات الجزيئية المسببة لهذه الأمراض

في عملنا هذا تطرقنا لدراسة ابيضاض الدم من خلال البحث. أولا في علم الدم و الخلية التي أكملت بعد ذلك بدراسة للوراثة الخلوية و الصنف النووي من خلال الأشربة الكروموزومية لإظهار تشوهات الوراثة الخلوية المشتركة في طريقة ابيضاض الدم و ذلك بشكل خاص.

في جميع الحالات المدروسة لم يلاحظ أي تشوه في عدد الكروموزومات. على العكس تشوهات في البنية الكروموزومية تم توضيحها في حالة LAM (كروموزوم 9 و 3) في حالة LAL (كروموزوم 6, 13, و 22) حالة LLC (كروموزوم 8 و 15) . مطابقة نتائج التحاليل التقليدية المستعملة على مستوى المراكز الاستشفائية و الوراثة الخلوية أظهرت أهمية هذه الأخيرة خاصة في حالة تعريف طريق ابيضاض الدم المدروس.

في الختام : النتائج المحصل عليها بينت تشوهات لعدة كروموزومات نوعية لصنف ابيضاض الدم.

Abstract:

Leukemia's represent a very heterogeneous group of malignant neoplasms defined by an anarchistic, clonally and acquired proliferation of the haematopoietic stem cells or of a precursor already engaged in the myeloid and/or lymphoid line. It is a very harmful cancerous disease, which represents a problem of public health. It is indicated in the running language by "cancer of the blood".

The diagnosis of these pathologies passes by a haematological, cytological and biochemical studies, bases of leukemia's FAB classification. With the development of knowledge in the field of the cytogenetics, base of leukemia's WHO classification, a better distinction between these pathological entities is now possible with investigations of a cytogenetics nature whose importance is twice: a practises interest for the best dealing with these pathologies in the diagnosis, the prognosis, the choice and the therapeutic follow-up of patient. A scientific interest for the comprehension of the molecular mechanisms in question and, perhaps a possibility, for the identification of etiologic factors.

In our work, we undertook the study of leukemia's by the realization, initially, of an haematological and cytological investigations, supplemented then by a traditional cytogenetic study of the standard karyotyping and banding, in order to the revelation of associated cytogenetics anomalies with particular leukaemic processes.

On all the studied case, none of them presents any number anomaly's. On the other hand, many structural anomaly's were found, in one case of AML (Acute Myeloid Leukemia) (chromosomes 3 and 19), a case of ALL (Acute Lymphoid Leukemia) (chromosomes 6, 13 and 22) and a case of CLL (chromosomes 8 and 15).

The confrontation of the traditional examinations used on hospital complexes laboratory and the cytogenetics results let emerge the importance of the latter one, particularly in cases where the identification of the involved leukemic process was difficult.

In conclusion: Our results highlight structural anomalies of many chromosomes associated with specific types of leukaemias.

Key words: Leukemia, Cytogenetics, Karyotyping.

Résumé :

Les leucémies représentent un groupe très hétérogène d'hémopathies malignes défini par une prolifération anarchique, clonale et acquise de la cellule souche hématopoïétique ou d'un précurseur déjà engagé dans la lignée myéloïde et/ou lymphoïde.

C'est une maladie cancéreuse grave qui représente un problème de santé publique. Elle est désignée dans le langage courant de " cancer du sang ".

Le diagnostic de ces pathologies passe par une étude hématologique, cytologique et biochimique, base de la classification FAB des leucémies. Avec le développement des connaissances dans le domaine de la cytogénétique, base de la classification OMS des leucémies, une meilleure distinction entre ces entités pathologiques est maintenant possible grâce à des investigations d'ordre cytogénétique dont l'intérêt est double : pratique pour une meilleure prise en charge de ces pathologies dans le diagnostic, le pronostic, le choix et le suivi thérapeutique. Scientifique pour la compréhension des mécanismes moléculaires en cause et éventuellement, pour l'identification de certains facteurs d'ordres étiologiques.

Dans notre travail, nous avons entrepris l'étude des leucémies par la réalisation en premier lieu, d'une investigation hématologique et cytologique, complétée ensuite par une étude cytogénétique classique du caryotype standard et du banding pour la révélation d'anomalies cytogénétiques associées à un processus leucémique particulier.

Sur tout les cas étudié, aucun d'eux ne présentait d'anomalies de nombre. Par contre, des anomalies de structures ont été retrouvées dans un cas de LAM (chromosomes 3 et 19), un cas de LAL (chromosomes 6, 13 et 22) et un cas de LLC (chromosomes 8 et 15). La confrontation des examens classiques utilisés au niveau des centres hospitaliers et de la cytogénétique a fait surgir l'importance de cette dernière, surtout devant des cas où l'identification du processus leucémique en question était difficile.

En conclusion : Nos résultats mettent en évidence des anomalies structurales de certains chromosomes spécifiques du type de leucémie.

Mots clés : Leucémies, Cytogénétique, Caryotype.

Année universitaire : 2005/2006.

Présenté par : Rezgoune Mohamed Larbi

Contribution à l'étude cytogénétique des leucémies.

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Magistère en Génétique Moléculaire.

Résumé :

Les leucémies représentent un groupe très hétérogène d'hémopathies malignes défini par une prolifération anarchique, clonale et acquise de la cellule souche hématopoïétique ou d'un précurseur déjà engagé dans la lignée myéloïde et/ou lymphoïde.

C'est une maladie cancéreuse grave qui représente un problème de santé publique. Elle est désignée dans le langage courant de « cancer du sang ».

Le diagnostic de ces pathologies passe par une étude hématologique, cytologique et biochimique, base de la classification FAB des leucémies. Avec le développement des connaissances dans le domaine de la cytogénétique, base de la classification OMS des leucémies, une meilleure distinction entre ces entités pathologiques est maintenant possible grâce à des investigations d'ordre cytogénétique dont l'intérêt est double : pratique pour une meilleure prise en charge de ces pathologies dans le diagnostic, le pronostic, le choix et le suivi thérapeutique. Scientifique pour la compréhension des mécanismes moléculaires en cause et éventuellement, pour l'identification de certains facteurs d'ordres étiologiques.

Dans notre travail, nous avons entrepris l'étude des leucémies par la réalisation en premier lieu, d'une investigation hématologique et cytologique, complétée ensuite par une étude cytogénétique classique du caryotype standard et du banding pour la révélation d'anomalies cytogénétiques associées à un processus leucémique particulier.

Sur tout les cas étudié, aucun d'eux ne présentait d'anomalies de nombre. Par contre, des anomalies de structures ont été retrouvées dans un cas de LAM (chromosomes 3 et 19), un cas de LAL (chromosomes 6, 13 et 22) et un cas de LLC (chromosomes 8 et 15). La confrontation des examens classiques utilisés au niveau des centres hospitaliers et de la cytogénétique a fait surgir l'importance de cette dernière, surtout devant des cas où l'identification du processus leucémique en question était difficile.

En conclusion : Nos résultats mettent en évidence des anomalies structurales de certains chromosomes spécifiques du type de leucémie.

Mots clés : Leucémies, Cytogénétique, Caryotype.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de biologie génétique du CHUC.

Les membres du jury :

Président : ABADI N. : *Professeur de la faculté de médecine, Constantine.*

Rapporteur : SATTAD. : *Professeur de l'université de Mentouri, Constantine.*

Examineurs :

NAIMI D. : *Professeur de l'université de Mentouri, Constantine.*

ROUABAH L. : *Maître de conférence de l'université de Mentouri, Constantine.*

BENDJEDDOU D. : *Maître de conférence de l'université de Guelma*

Date de soutenance : le 27 /09/2006.