

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Animale

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة والحياة  
قسم بيولوجيا الحيوان

Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de Docteur en Science  
3<sup>ème</sup> cycle LMD

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie  
Filière : Sciences Biologiques  
Spécialité : *Génétique Moléculaire*

N° d'ordre : 17/D3C/2019  
N° de série : 04/BA/2019

Intitulé :

---

**Aspects biologiques et génétiques des leucémies aiguës  
Implication des gènes *FLT3* et *NPM1* dans la réponse au traitement**

---

Présentée et soutenue par : AYACHI Ouarda Sariyah

Jury d'évaluation :

**Président :** ROUABAH Abdelkader- Professeur- Université des Frères Mentouri, Constantine 1

**Directrice :** SATTA Dalila - Professeur - Université des Frères Mentouri, Constantine 1.

**Examineurs :**

SIDI MANSOUR Noureddine- Professeur – Université Bounider Salah-Constantine 3,  
REZGOUN Mohamed Larbi - MC-A - Université des Frères Mentouri, Constantine1.

**Année universitaire  
2018 – 2019**

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Animale

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة والحياة  
قسم بيولوجيا الحيوان

Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de Docteur en Science  
3<sup>ème</sup> cycle LMD

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie  
Filière : Sciences Biologiques  
Spécialité : *Génétique Moléculaire*

N° d'ordre : 17/D3C/2019  
N° de série : 04/BA/2019

Intitulé :

---

**Aspects biologiques et génétiques des leucémies aiguës  
Implication des gènes *FLT3* et *NPM1* dans la réponse au traitement**

---

Présentée et soutenue par : AYACHI Ouarda Sariyah

Jury d'évaluation :

**Président :** ROUABAH Abdelkader- Professeur- Université des Frères Mentouri, Constantine 1

**Directrice :** SATTA Dalila - Professeur - Université des Frères Mentouri, Constantine 1.

**Examineurs :**

SIDI MANSOUR Noureddine- Professeur - Université des Frères Mentouri, Constantine 3,

REZGOUN Mohamed Larbi - MC-A - Université des Frères Mentouri, Constantine1.

**Année universitaire  
2018 – 2019**



*« A l'issue de la rédaction de cette thèse, je remercie Dieu tout puissant de m'avoir donné le courage, la persévérance et l'endurance pour arriver au bout de ce travail. »*

*Aux malades et à leurs familles, qu'ils trouvent ici mes vifs remerciements et reconnaissance pour leur participation à ce travail de thèse.*

# *Remerciements*

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements au professeur **SATTA Dalila** qui fut pour moi une directrice de thèse attentive et disponible malgré ses nombreuses charges. Sa compétence et sa rigueur scientifique m'ont beaucoup appris. Je vous remercie également pour vos conseils éclairés, et vos directives qui m'ont permis de mener à terme ce travail.

## **À notre honorable jury :**

Au professeur **ROUABEH Abdelkader**, Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse. Je vous remercie de votre confiance et de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à mon travail et vous prie d'accepter mes considérations respectueuses.

Je souhaite également remercier fortement le professeur **SIDI Mansour Noureddine**, le docteur **REZGOUNE Mohamed Larbi**. Vous me faites l'honneur de prendre part au jury de soutenance en acceptant d'examiner ma thèse, je vous témoigne ici ma sincère reconnaissance.

Je remercie tous les membres de l'équipe de recherche du laboratoire de médecine expérimentale et de génétique moléculaire à Istanbul, Turquie à savoir le Pr. **Muge Sayitoglu**, **Dr. Yucel Erbilgin** et **Didem Altirnek** pour leur attention, leur respect et leur professionnalisme à mon égard ainsi que tous les moyens qui ont mis en œuvre pour que mon stage se déroule dans les meilleures conditions possibles.

Je tiens également à remercier le Pr. **Abadi Noureddine** de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire durant ma thèse et pour m'avoir donné la possibilité de travailler et acquérir de nombreuses connaissances et compétences utiles pour mon futur professionnel.

Et encore un grand merci pour le Pr. **Sidi Mansour** qui m'a ouvert les portes du service d'hématologie au CHU Constantine ainsi que le personnel de ce service ; médecins et

infirmiers pour leur collaboration ayant permis la réalisation de mon travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude.

À **Madame Yasmina** la technicienne du laboratoire de biologie et de génétique moléculaire pour son aide techniques, toutes ces heures à m'écouter et bien plus encore !

Et enfin je tiens à remercier ma colocataire docteur **Memnu** qui m'était d'une grande aide et une source d'inspiration durant mon séjour à Istanbul.

# *Dédicaces*

*À la mémoire des personnes qui nous ont quittés  
avant que ce travail voit le jour.*

# *Dédicaces*

Ma thèse a été une expérience riche et passionnante qui a commencé à l'université des Frères Mentouri- Constantine<sup>1</sup> et s'est poursuivie à l'université d'Istanbul pour finir à Constantine.

Je voudrais dédier ce travail, à ma petite famille ainsi que ma grande famille, un énorme merci pour leurs encouragements tout au long de ces années, pour m'avoir soutenue dans les moments difficiles, et il y en a eus !! Merci à toute personne qui a cru en moi et m'a donnée la force pour arriver jusqu'au bout de ce travail. Sans eux ça aurait pu être beaucoup plus difficile.

Avant de terminer, je dédie ce travail à tous mes amis et à toute personne qui a pu de loin ou de près aider pour la réalisation de ce projet. Cette réussite je la dois à toute personne qui m'a aidé, m'a écoutée, m'a conseillée ou m'a encouragée. Encore un grand merci à tout le monde.

# Abréviations

% : Pourcentage.

**ABL** : Abelson Murine Leukemia.

**ADN** : Acide Désoxyribonucléiques.

**AGM** : Aorte Gonade-Mésonephros.

**AML1'**: Acute Myelogenous Leukemia Factor1

**BCR**: Breakpoint Cluster Region.

**BFU-E**: Burst-Forming Unit-Erythroid.

**CBF $\beta$**  : Core Binding Factor.

**CD**: Cluster de Differentiation.

**CEBPA**: CCAAT/Enhancer-Binding Protein.

**CFU-Bas**: Colony Forming Units –Basophile.

**CFU-E**: Colony Forming Units-Erythroïdes.

**CFU-Eo** : Colony Forming Units – Éosinophile.

**CFU-GM**: Colony Forming Units –Granulocyte-Macrophage.

**CFU-Meg**: Colony Forming Units- Mégacaryocytaire.

**CH** : Cellules Hématopoïétiques.

**CIVD** : Coagulation Intra-Vasculaire.

**CLP** : Progéniteurs Lymphoïdes Communs.

**CMF** : Cytométrie en Flux.

**CMP** : Progéniteurs Myéloïdes Communs.

**c-Myb**: Myeloblastosis.

**CSF**: Colony Stimulating Factor.

**CSH** : Cellules Souches Hématopoïétiques.

**CSL** : Cellules Souches Leucémiques.

**DNMT**: DNA-Méthyltransférases.

**EGIL**: European Group of Immunology.

**Epo**: Érythroprotéine.

**EZH2**: Enhancer of Zest Homolog 2.

**FAB**: Franco-Américano-britannique.

**FLK2** : Fetal Liver Kinase 2.

**FLT3** : Fetal Liver Kinase-3.

**GAPD** : Glyceraldéhyde-3-phosphate dehydrogenase

**GRB2**: Growth Factor Receptor-Bound protein.

**HDAC** : Histones-Déacétylases.

**IDH** : Isocitrate Dehydrogenase.

**Ig**: immunoglobuline.

**IL** : Interleukine.

**LAL** : Leucémie Aigue Lymphoïde.

**LAM** : leucémie aigue myéloïde

**LMO2**: LIM Domain Only 2.

**MLL**: Mixed-Lineage Leukemia.

**MPP** : Progéniteurs Hématopoïétiques Multipotents.

**N** : Nombre.

**NK** : Natural Killer.

**NPM1**: Nucleophosmine 1

**OMS** : Organisation Mondiale de Santé.  
**PBX**: Pre-B-Cell Leukemia Homeobox.  
**PCR** : Polymerase Chain Reaction.  
**PDGFR** (*platelet-derived growth factor receptor*)  
**PLT** : Plaquettes.  
**PME**: Progéniteur Mégacaryo- Erythroïde.  
**RUNX1**: Runt-related transcription factor 1.  
**SCF**: Stem Cell Factor.  
**SCL**: Stem Cell Leukemia.  
**STK1**: Stem Cell Tyrosine Kinase 1.  
**TAL-1**: T Cell Acute Leukemia.  
**TET**: Tet Eleven Translocation.  
**TPO**: Thrombopoïétine.  
**VEGF**: Vascular Endothelial Growth Factor.  
**WHO**: World Health Organization

# Table des matières

<b>Introduction</b> .....	01
<b>Partie bibliographique</b>	
<b>Chapitre 01 : Système hématopoïétique</b>	
I- Ontogénèse du système hématopoïétique.....	03
1- L'hématopoïèse primitive.....	03
2- L'hématopoïèse définitive.....	03
II- Anatomie de la moelle osseuse.....	04
III- L'hématopoïèse.....	05
1- Organisation du tissu hématopoïétique.....	06
2- Le microenvironnement.....	09
3- La régulation de l'hématopoïèse.....	09
<b>Chapitre 02 : Leucémies aiguës</b>	
I- Définition .....	15
II- La leucémogénèse.....	15
III- La classification des leucémies aiguës.....	16
1- Leucémies aiguës myéloïdes.....	16
2- Leucémies aiguës lymphoïdes.....	17
IV- Etiologie.....	18
1- Facteurs génétiques.....	18
2- Aberrations cytogénétiques.....	19
3- Agents physico-chimiques.....	19
4- Facteurs viraux.....	19
V- Epidémiologie.....	19
<b>Chapitre 03 : diagnostic et pronostique des leucémies aiguës</b>	
I- Diagnostic clinique.....	21
1- Insuffisance médullaire.....	21
2- Syndrome tumoral.....	21
3- Autre signe .....	21
II- Diagnostic biologique.....	22
III- Pronostic .....	22
IV- Place de la cytogénétique.....	23
<b>Chapitre 04 : gènes d'intérêt</b>	
I- Le récepteur FLT3.....	26
1- Généralités .....	26
2- Structure .....	26

3-Activation .....	27
4-Fonction .....	27
5- Le gène <i>FLT3</i> .....	29
6- <i>FLT3</i> et leucémies.....	29
<b>II- La protéine NPM1 .....</b>	<b>29</b>
1- Généralités.....	30
2- Structure .....	30
3- Fonction de la NPM1.....	31
4- Le gène NPM1.....	33
5- NPM1 et hémopathies malignes.....	33

## **Partie pratique**

### **Patients et méthodes**

<b>I- Patients .....</b>	<b>36</b>
<b>II- Méthodologie .....</b>	<b>36</b>
1- Analyse hématologique.....	36
2- Analyse cytogénétique .....	37
3- Analyse génétique .....	37
3-1- Extraction d'ADN .....	37
3-2- Mesure de la concentration d'ADN .....	38
3-3- Analyse moléculaire du <i>FLT3</i> .....	39
3-4- Séquençage de l'exon 12 du gène NPM1 .....	44
<b>III- Traitement et critères de réponse .....</b>	<b>49</b>
<b>IV- Analyses statistiques .....</b>	<b>51</b>

### **Résultats et discussions**

<b>I- Analyse descriptive de la cohorte.....</b>	<b>53</b>
<b>II- Résultat de l'analyse moléculaire.....</b>	<b>72</b>
<b>III- Réponse au traitement et survie des patients LAM .....</b>	<b>86</b>

<b>Discussion générale .....</b>	<b>99</b>
----------------------------------	-----------

<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>102</b>
---	------------

<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>104</b>
--	------------

### **Annexes**

# Liste des figures

<b>Figure 01 :</b>	Schéma représentatif de l'anatomie de la moelle osseuse .....	05
<b>02 :</b>	Observation de la moelle osseuse/ photographie électronique .....	05
<b>03 :</b>	Principes de la division asymétrique et symétrique des cellules souches.....	07
<b>04 :</b>	Processus de l'hématopoïèse.....	08
<b>05 :</b>	Schéma de la hiérarchie des progéniteurs hématopoïétiques et indication des étapes cibles des facteurs de croissance.....	11
<b>06 :</b>	Schéma de la hiérarchie des progéniteurs hématopoïétiques et indication des étapes cibles des facteurs de transcription .....	14
<b>07 :</b>	Structure du récepteur FLT3.....	27
<b>08 :</b>	Principales voies de signalisation activés par la liaison FLT3 ligand et son récepteurs FLT3.....	28
<b>09 :</b>	Locus du gène <i>FLT3</i> .....	29
<b>10 :</b>	Organisation structurelle et fonctionnelle des domaines constituant la protéine NPM1.....	31
<b>11 :</b>	Locus du gène NPM1 et les variants transcrits.....	33
<b>12 :</b>	Configuration du gène NPM1 non muté et les différentes mutations rencontrées dans les LAM et leur conséquence sur la protéine.....	35
<b>13 :</b>	Les profils attendus de la PCR du FLT3-ITD.....	41
<b>14 :</b>	Profil de restriction de la FLT3-TKD.....	43
<b>15 :</b>	Séquences de nucléotides et d'acides aminés dans le cas sauvage et muté du gène <i>FLT3</i> (D835Y) .....	44
<b>15 :</b>	Prévalence des LAM et les LAL.....	52
<b>16 :</b>	Répartition des patients selon les tranches d'âge et le type de leucémie aigue.	53
<b>17 :</b>	Répartition des types de leucémies selon les tranches d'âge.....	54
<b>18 :</b>	Répartition des patients selon le sexe et le type de leucémie .....	55
<b>19 :</b>	Répartition des patients suivant leur taux de blastose.....	59
<b>20 :</b>	Représentation de la classification des LAL selon l'EGIL.....	59

<b>21 :</b>	Frottis médullaire d'un patient atteint de LAM2.....	62
<b>22 :</b>	Frottis médullaire d'un patient atteint de LAL2.....	61
<b>23 :</b>	Frottis médullaire d'un patient atteint de LAM5.....	62
<b>24 :</b>	Classification FAB des patients LAM .....	63
<b>25 :</b>	Résultat d'un caryotype standard d'un patient LAM ne présentant aucune anomalie chromosomique .....	63
<b>26 :</b>	Détection de la duplication en tandem du gène <i>FLT3</i> par amplification PCR..	71
<b>27 :</b>	Profil de la restriction de l' <i>EcoRV</i> des produits de PCR de la TKD. ....	75
<b>28 :</b>	Mutations dans l'exon12 de <i>NPM1</i> .....	79
<b>29 :</b>	Schéma de la mutagenèse de la nouvelle mutation décrite avec suppression de 5 pb et une insertion de 9 pb.....	80
<b>30 :</b>	Survie globale de la population.....	86
<b>31 :</b>	Courbe de la survie sans maladie de la population d'étude.....	86
<b>32 :</b>	Courbe de survie selon le groupe à risque (1).....	88
<b>33 :</b>	Courbe de survie selon le groupe à risque (2).....	89
<b>34 :</b>	Courbes de survie globale et l'EFS selon la présence ou l'absence des mutations <i>FLT3</i> .....	91
<b>35 :</b>	Courbes de survie globale et l'EFS selon le statut des mutations <i>NPM1</i> .....	94
<b>36 :</b>	courbes de survie globale et l'EFS selon le statut <i>FLT3</i> et <i>NPM1</i> .....	95

# Liste des tableaux

<b>Tableau 01 :</b>	Stratification des patients LAM selon les anomalies génétiques .....	00
<b>02 :</b>	Les amorces (F) et (R) utilisées d'exons 14-15 du gène <i>FLT3</i> .....	41
<b>03 :</b>	Composition du milieu réactionnel de PCR pour l'amplification des exons 14 et 15 du gène <i>FLT3</i> .....	42
<b>04 :</b>	Programme du thermocycleur pour l'amplification de l'exon 14-15 du gène <i>FLT3</i> .....	42
<b>05 :</b>	Les amorces (F) et (R) utilisées pour l'amplification de l'exon 20 du gène <i>FLT3</i> .....	43
<b>06 :</b>	Composition du milieu réactionnel de PCR pour l'amplification de l'exon 20 du gène <i>FLT3</i> .....	44
<b>07 :</b>	Programme du thermocycleur pour l'amplification de l'exon 20 du gène <i>FLT3</i> .....	44
<b>08 :</b>	Composition du milieu réactionnel pour la digestion avec l' <i>EcoRV</i> 1 .....	45
<b>09 :</b>	Les amorces (F) et (R) utilisées pour l'amplification de l'exon 12 du gène <i>NPM1</i> .....	46
<b>10 :</b>	Composition du milieu réactionnel de la PCR pour l'amplification de l'exon 12 de la <i>NPM1</i> .....	47
<b>11 :</b>	Programme du thermocycleur pour l'amplification de l'exon 12 du gène <i>NPM1</i> .....	47
<b>12 :</b>	Composition du milieu réactionnel pour le séquençage de l'exon12 du gène <i>NPM1</i> .....	49
<b>13 :</b>	Programme du thermocycleur pour la réaction de séquençage .....	49
<b>14 :</b>	Critères de définitions des événements .....	51
<b>15 :</b>	Répartition globale des patients selon les tranches d'âge .....	55
<b>16 :</b>	Répartition géographique en fonction de la province .....	58
<b>17 :</b>	Résultats de leucocytose de tous les patients.....	59
<b>18 :</b>	Les résultats de cytogénétique des patients .....	65

<b>19 :</b>	Caractéristiques biologiques et cliniques des patients <i>NPM1</i> <sup>+</sup> et <i>NPM1</i> <sup>-</sup> .....	83
<b>20 :</b>	Réponse au traitement (3+7) des patients LAM.....	85
<b>21 :</b>	Les facteurs biologiques de pronostique.....	87
<b>22 :</b>	Réponse au traitement des patients <i>FLT3</i> <sup>+</sup> et <i>FLT3</i> <sup>-</sup> .....	91
<b>23 :</b>	Réponse au traitement des patients <i>NPM1</i> <sup>+</sup> et <i>NPM1</i> <sup>-</sup> .....	93
<b>24 :</b>	Etats final des patients en fonction des deux mutations .....	95

# Introduction

La première description d'une leucémie a été publiée en 1827 par l'anatomiste français **Alfred Armand Louis Marie Velpeau** à la suite de l'examen du cadavre d'un homme âgé de 63 ans décédé suite à une maladie qui a duré 2 ans [1].

La découverte de la fonction hématopoïétique de la moelle osseuse par **Ernst Neumann** en 1869 a conduit au concept de leucémie myélogène et à une classification en trois formes : myélogène pure, splénique et lymphatique avec trouble de la moelle.

**Otto Naegeli** a permis par la suite d'identifier les « myéloblastes » précurseurs des myélocytes et les a distingués des « lymphocytes » et a décrit « la leucémie myéloblastique »; une entité qui se substituait naturellement au diagnostic du mélange de deux leucémies [2].

La classification des leucémies en une série de variétés distinctes s'est imposée du simple fait de leurs diversités cytomorphologiques, ce qui a été le résultat de la réunion d'un groupe d'hématologistes français, américains et britanniques en 1974, leurs travaux ont conduit à la publication en 1976 de la classification Franco-Américano-Britannique « FAB » qui a permis de dissocier les leucémies myéloïdes des leucémies non myéloïdes « lymphoblastiques » [3].

Par définition, les leucémies correspondent à une prolifération clonale et maligne des cellules hématopoïétiques immatures bloquées à un stade précoce de différenciation et ayant ainsi perdu toute capacité de maturation terminale. Ces blastes, prolifèrent au détriment des autres types de cellules hématopoïétiques au sein de la moelle osseuse où elles s'accumulent et répriment ainsi l'hématopoïèse normale. Ces leucémies sont dites aiguës lorsque plus de 20% de la moelle osseuse est envahie.

Les leucémies aiguës comprennent la leucémie aiguë lymphoïde (LAL) et la leucémie aiguë myéloïde (LAM). Les LAL sont principalement des hémopathies pédiatriques alors que les LAM surviennent principalement chez les personnes âgées.

Les leucémies aiguës constituent une urgence à la fois diagnostique et thérapeutique. Elles nécessitent d'effectuer, en parallèle et très rapidement, la recherche et la prise en charge de complications ainsi que l'identification de la maladie en vue d'adapter le traitement au patient et au type de leucémie. Ce sont des maladies qui peuvent rapidement engager le pronostic vital si elles ne sont pas traitées. Actuellement, environ 80% des enfants atteints de LAL sont guéris, cependant, les résultats pour le devenir des patients atteints de LAM reste médiocres et des stratégies de traitement pour y remédier sont nécessaires.

Dans les LAL comme les LAM, les anomalies cytogénétiques récurrentes ont une signification pronostique, cependant, un caryotype normal peut être observé dans 40% des cas. L'analyse moléculaire des patients atteints de LAM de caryotype normal révèle des mutations

moléculaires récurrentes dans les gènes : *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA*, *IDH1*, *IDH2* et *DNMT3A*, qui ont un pronostic supplémentaire et une valeur thérapeutique possible du fait qu'elles peuvent être informatives sur le type de traitement adopté.

Bien que le traitement de base des Leucémies aiguës reste la chimiothérapie avec une greffe de cellules souches allogéniques supplémentaires pour la consolidation des patients à risque défavorable, la découverte de nouvelles mutations moléculaires pourrait éventuellement conduire à une thérapie personnalisée.

Les objectifs de cette étude sont:

- La réalisation d'une étude transversale sur des patients adultes atteints de leucémie aigue myéloïde et lymphoïde et la description de leurs caractéristiques biologiques et cliniques.
- L'investigation des variations moléculaires des deux gènes d'intérêt à savoir le *FLT3* et le *NPM1* chez les patients adultes LAM.
- La mise en évidence des facteurs pronostiques cliniques et moléculaire et l'évaluation de leur impact sur la réponse au traitement et la survie des patients LAM.

Partie  
bibliographique

Chapitre I  
Système  
hématopoïétique

**I. Ontogénèse du système hématopoïétique :**

Le développement du système hématopoïétique chez les mammifères se fait dans deux phases distinctes : la phase primitive et la phase définitive [4]. L'hématopoïèse primitive assure la production d'un nombre réduit de types de cellules sanguines tandis que, l'hématopoïèse définitive a pour rôle de générer les progéniteurs hématopoïétiques responsables de la production des différentes cellules sanguines matures et fonctionnelles.

**1. L'hématopoïèse primitive :**

Elle est transitoire et se développe entre la 2<sup>ème</sup> et la 9<sup>ème</sup> semaine, durant cette période elle va assurer l'apport de l'oxygène aux tissus pendant que l'embryon subit un développement intense et rapide [5]. Elle apparaît au niveau des îlots sanguins du sac vitellin et donne naissance à des érythroblastes primitifs, des macrophages, des mastocytes et des hémangioblastes qui sont des précurseurs communs à potentiel mixte hématopoïétique et hémangioblastiques, cependant, il n'y pas de production de lymphocytes et des cellules souches hématopoïétiques (CSHs).

A partir du mésoderme spalncopleural, l'hémangioblaste est à l'origine de deux différents types de cellules qui sont les cellules endothéliales et les cellules hématopoïétiques qui comprennent à ce niveau là les cellules érythrocytes primitifs et les macrophages fœtaux. Un amas d'hémangioblastes va se former au niveau du sac vitellin extra-embryonnaire et donner des îlots sanguins au sein desquels les cellules centrales se différencient en érythrocytes nucléés et les cellules périphériques forment les premières cellules endothéliales [6].

**2. L'hématopoïèse définitive :**

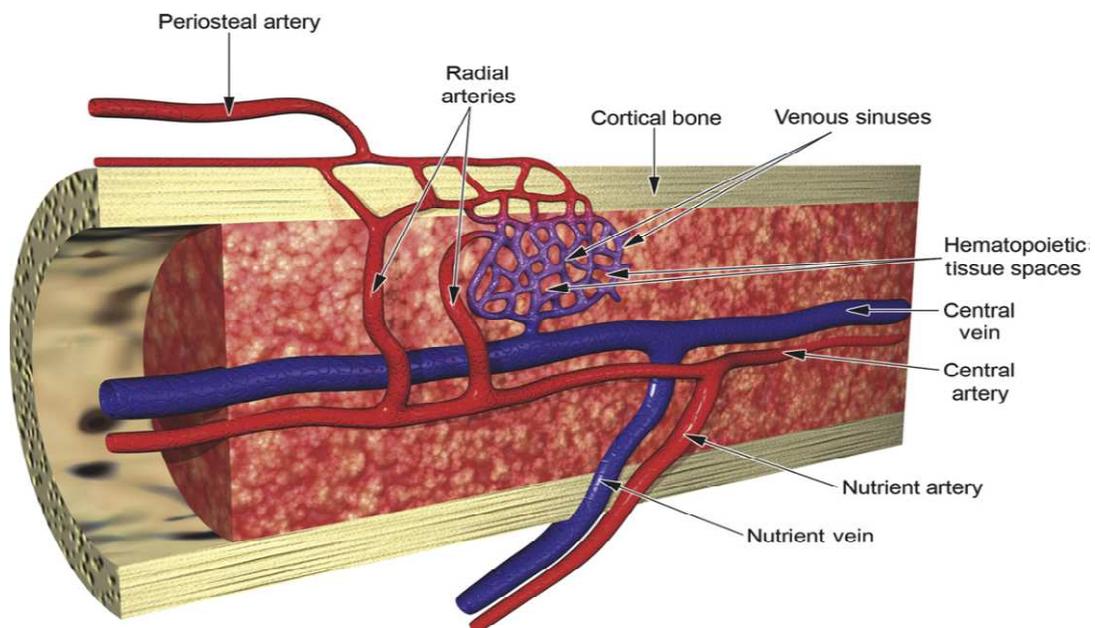
Elle apparaît après la 5<sup>ème</sup> semaine du développement embryonnaire et débute au niveau de l'AGM (aorte-gonade-mésonephros) où il y'a apparition des premières CSHs, ainsi que toutes les lignées hématopoïétiques. Ces cellules vont ensuite coloniser le foie à partir de la 7<sup>ème</sup> semaine et puis migrer vers la moelle osseuse à partir du 4<sup>ème</sup> mois de grossesse pour constituer l'hématopoïèse adulte [7].

Les précurseurs hématopoïétiques originaires des compartiments extra- et intra-embryonnaires présentent des différences importantes au niveau de leur potentiel de différenciation et de maintenance : les cellules hématopoïétiques d'origine extra-embryonnaire appartiennent exclusivement au lignage érythromyéloïde, alors que celles produites

ultérieurement dans le compartiment intra-embryonnaire sont multipotentes et pourvues de l'activité de reconstitution à long terme.

## II. Anatomie et structure de la moelle osseuse :

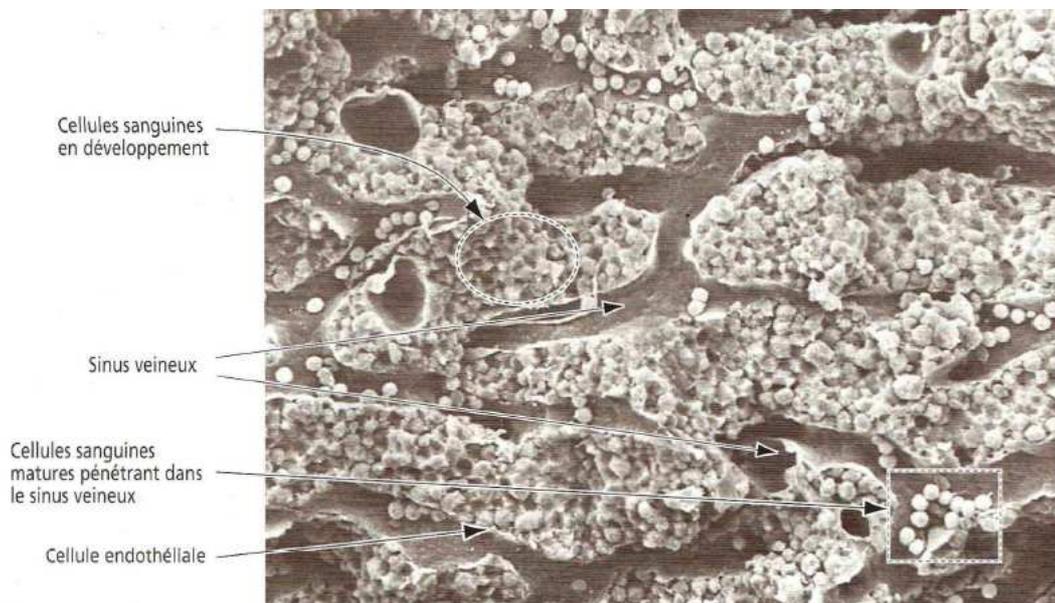
L'anatomie et l'histologie de la moelle sont dominées par sa fonction essentielle qui est l'hématopoïèse et sa richesse cellulaire varie avec l'âge et avec la topographie osseuse. La moelle osseuse peut être rouge, du fait de la présence des progéniteurs myéloïdes, ou jaune du fait de la prédominance de graisse. À la naissance, et jusqu'à l'âge de 4 ans, la moelle de la totalité des cavités osseuses, à l'exception des phalanges terminales, est rouge et active, car les espaces médullaires chez le nouveau-né sont réduits en raison de l'abondance du cartilage et de l'épaisseur des travées de l'os spongieux. Après 4 ans, il apparaît une involution adipeuse de nombreux territoires médullaires, liée à un accroissement trop important du volume des cavités osseuses par rapport à celui des cellules de la moelle hématopoïétique. Cette involution est centripète, débutant dans les extrémités des membres et s'accroissant à partir de l'âge de 7 ans. Chez l'adulte, la moelle hématopoïétique n'est présente que dans certains os seulement : vertèbres, sacrum, os iliaque, côtes, sternum, os du crâne, extrémités supérieures du fémur et de l'humérus [8,9].



**Figure1:** schéma représentatif de l'anatomie de la moelle osseuse [10]

Les vaisseaux sanguins et les nerfs atteignent la moelle en perçant la corticale osseuse. L'artère nourricière pénètre au niveau de la partie médiane d'un os long et se ramifie en artères centrales longitudinales qui communiquent avec les sinus veineux.

La moelle hématopoïétique peut être interprétée comme la juxtaposition d'unités élémentaires, centrées sur un groupe de sinusoides anastomosés, structurées par un réseau de cellules stromales et disposées de manière adjacente, en cordons, autour d'une artériole et entourées par des sinus. Les ponctions-aspirations de la moelle osseuse hématopoïétique humaine montrent ces unités élémentaires sous forme de grains, amas cellulaires cohésifs correspondant chacun à un groupe de cellules hématopoïétiques en cours de différenciation, adhérant à un réseau de cellules du tissu de soutien. Ces unités structurelles élémentaires restent plus difficiles à mettre en évidence sur les coupes histologiques, mais l'analyse morphométrique de coupes de biopsies médullaires montre que la moelle hématopoïétique humaine a une structure de type fractal, la taille de chaque unité structurelle élémentaire étant déterminée par la dimension de l'espace de diffusion locale des facteurs de croissance nécessaires à l'hématopoïèse [11,12]



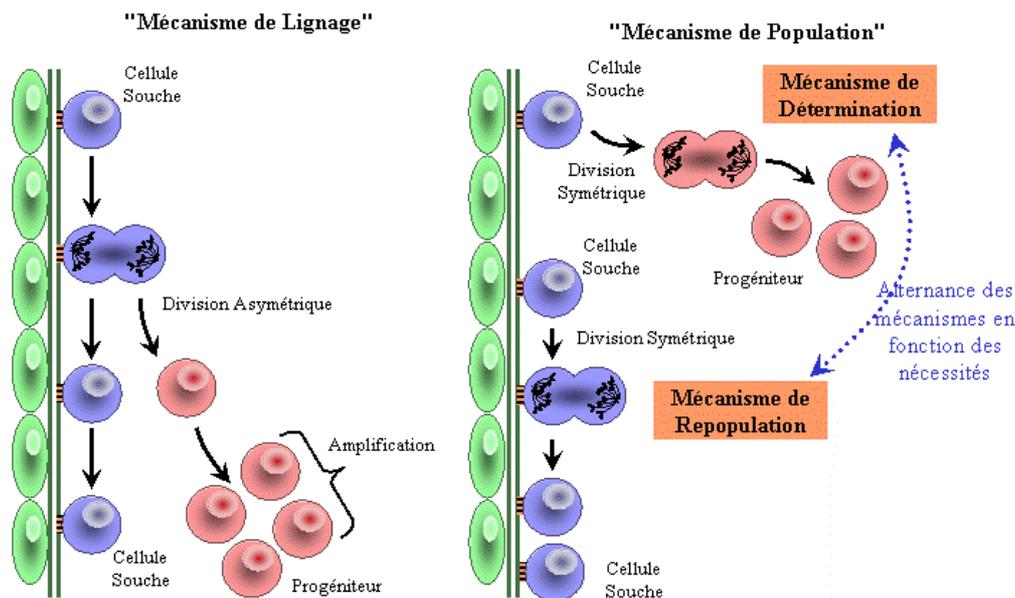
**Figure2** : Observation de la moelle osseuse/ photographie électronique [13]

### III. L'hématopoïèse :

Le système hématopoïétique est l'un des systèmes les plus étendus et le plus importants dans l'organisme. Il est organisé comme une hiérarchie contenant plusieurs types

cellulaires qui diffèrent dans leur capacité d'auto-renouvellement, leur prolifération et leur différenciation.

Le sommet de cette hiérarchie est présenté par les CSHs qui ont la capacité de maintenir la production des cellules sanguines en générant des lignées différentes de cellules matures et différenciées [14]. La connaissance des différents facteurs impliqués dans la régulation de l'hématopoïèse est croissante, cependant leurs rôles respectifs dans l'auto-renouvellement et la différenciation des CSHs restent encore à préciser.



**Figure3** : Principes de la division asymétrique et symétrique des cellules souches [15].

### 1. Organisation du tissu hématopoïétique

La moelle osseuse est composée de cellules hématopoïétiques et de leurs précurseurs, ainsi qu'un tissu de soutien composé de cellules stromales dont les cellules endothéliales, les fibroblastes, les adipocytes, les cellules ostéocompétentes (ostéoblastes et ostéoclastes) et de plusieurs molécules comme les collagènes, l'ensemble au sein de la matrice extracellulaire [16].

Schématiquement, on définit trois grands compartiments constitués d'un ensemble de cellules avec différents niveaux de maturation:

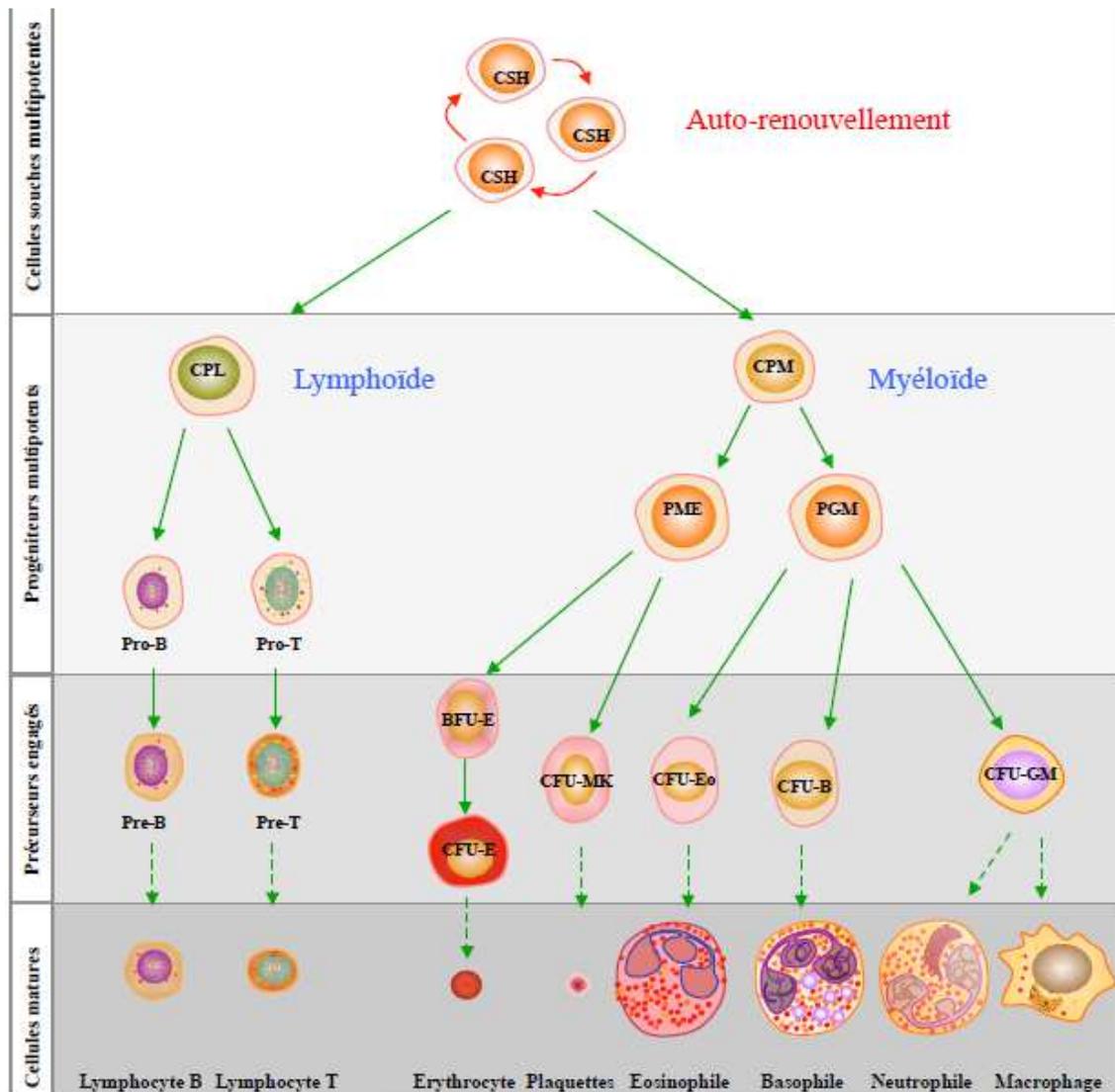
**1.1.** Le compartiment des **cellules souches hématopoïétiques**, situé au sommet de la pyramide, représente un pool de cellules capables de se différencier vers les différentes lignées hématopoïétiques myéloïdes et lymphoïdes B et T. Ces cellules sont douées d'un

potentiel d'auto-renouvellement et sont majoritairement quiescentes, bien que présentant une grande capacité de prolifération.

Deux modèles ont été proposés pour expliquer l'équilibre entre l'auto-renouvellement et la détermination des CSHs [17]. Le premier modèle, dit "de lignage", est celui de division asymétrique des cellules souches. Les cellules souches, en se divisant, donnent naissance à deux cellules filles dont la destinée est différente. L'une des cellules filles conserve le caractère souche en maintenant le contact à la niche, alors que la seconde, se détermine vers une voie de différenciation. Le second modèle, dit "de population", propose une division symétrique des cellules souches par lequel une cellule souche en se divisant donnera naissance soit à deux cellules souches soit à deux cellules filles déterminées. Seul ce mécanisme peut expliquer l'amplification du compartiment des cellules souches observée dans des situations de stress à la suite d'agression de l'organisme. Ces deux modèles coexistent au sein d'un même compartiment de cellules souches.

**1.2.** Le compartiment des **progéniteurs hématopoïétiques multipotents (MPP)** comprend les cellules issues de la prolifération et de la différenciation des cellules souches. On y distingue des progéniteurs primitifs, capables d'une prolifération importante et de différenciation vers plusieurs lignages hématopoïétiques et des progéniteurs plus matures, déterminés ou engagés vers une, au plus de deux lignées distinctes. Ces cellules ne possèdent plus la capacité d'auto-renouvellement mais donnent naissance aux progéniteurs myéloïdes communs (CMP) et progéniteurs lymphoïdes communs (CLP).

**1.3.** Les cellules du compartiment des précurseurs hématopoïétiques engendrent **les cellules matures**, morphologiquement reconnaissables sur frottis cellulaire et qui ne se divisent plus. Les progéniteurs myéloïdes communs (CMP) donnent naissance à 5 types de précurseurs (Colony Forming Units) : le progéniteur érythroïde (CFU-E) qui produit les érythrocytes, le progéniteur mégacaryocytaire (CFU-Meg) qui produit les plaquettes, le progéniteur basophile (CFU-Bas), le progéniteur éosinophile (CFU-Eo), qui donnent respectivement les basophiles et les éosinophiles et enfin, le progéniteur granulocyte-macrophage (CFU-GM), dont dérivent les monocytes, et les granulocytes basophiles. Tandis que les et progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) sont responsables de la production des lignées lymphoïdes qui sont les cellules B et T et les natural killer (NK).



**Figure4** : processus de l'hématopoïèse [5].

CPM : cellules progénitrices myéloïdes. CPL : cellules progénitrices lymphoïdes. Pro-T : pro-lymphoblastes T. Pro-B pro-lymphoblastes. PME: progéniteur mégacaryo-érythroïde. PGM: progéniteur granulocyte-monocyte. BFU : burst forming unit. CFU : colony forming unit. GM : granulocyte-monocyte. E : érythroïde. Eo : éosinophile. MK : mégacaryocyte.

A la fin de ce processus de maturation médullaire, les cellules hématopoïétiques traversent la barrière endothéliale, quittent la moelle et migrent dans la circulation sanguine [18].

La diversité des cellules hématopoïétiques est importante vis-à-vis le rôle que chacune d'elles remplis, les mégacaryocytes qui donnent les plaquettes responsables de homéostasie et la coagulation normale du sang, les érythrocytes qui sont responsables de la respiration et l'apport de l'O<sub>2</sub> aux différents tissus de l'organisme, les macrophages et les granulocytes sont des cellules phagocytaires qui avec les cellules NK jouent un rôle dans l'immunité innée et à

médiation cellulaire et enfin les cellules lymphocytaires B et T qui sont responsables de l'immunité adaptative.

## **2. Le microenvironnement :**

Les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cellules de soutien produisent des facteurs de croissance hématopoïétiques et des cytokines qui régulent la production des cellules sanguines. Les cellules endothéliales forment une barrière empêchant les cellules hématopoïétiques immatures de quitter la moelle et permettant aux cellules matures de passer dans le sang. Les adipocytes constituent une source d'énergie tout en produisant des facteurs de croissance. Les macrophages médullaire éliminent les cellules apoptotiques et empêchent les cellules étrangères de pénétrer dans la moelle, les ostéoblastes et les ostéoclastes assurent le maintien et le remodelage de l'os spongieux entourant le tissu médullaire [19].

Ce microenvironnement médullaire complexe est appelé niche hématopoïétique et a pour rôle à la fois de soutenir physiquement l'hématopoïèse mais aussi de réguler l'auto-renouvellement, la survie et la différenciation des cellules hématopoïétiques [20].

## **3. La régulation de l'hématopoïèse :**

La différenciation des CSHs en précurseurs lymphoïdes ou myéloïdes puis l'engagement des cellules au sein de chacun de ces lignages sont finement régulés, notamment par l'expression coordonnée dans le temps, d'une part de facteurs de croissance solubles, transmembranaires, ou adsorbés aux protéines de la matrice extracellulaire, qui agissent par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques exprimés par les CSHs, d'autre part de facteurs de transcription qui activent ou répriment spécifiquement l'expression de gènes cibles. Il faut également signaler que les CSHs interagissent avec les cellules endothéliales de l'arbre vasculaire et les cellules stromales tissulaires environnantes, ces interactions contrôlent à leur tour les récepteurs et les ligands d'adhérence, ainsi que les chimiokines et leurs récepteurs [16].

### **3.1. Les facteurs de croissance :**

Les facteurs de croissances hématopoïétiques secrétées principalement en mode paracrine par les cellules du stroma médullaire agissent comme des "hormones hématopoïétiques". En se fixant sur leurs récepteurs spécifiques, ils stimulent la survie, la prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques. (**Annexe1**)

### 3.1.1 Facteurs de promotion :

Ces facteurs jouent un rôle prépondérant, aux premières étapes du développement embryonnaire dans l'expansion initiale de précurseurs mésodermiques communs aux lignées endothéliale et hématopoïétique et dans leur migration vers les premiers sites de production hématopoïétique extra- et intra-embryonnaires. Ils sont principalement : Le **VEGF** (vascular endothelial growth factor) et son récepteur le VEGFR-2 [21], **SCF** (Stem Cell Factor), **IL-1** (interleukine), **IL-6**, **LIF**, **FLT3** (fetal liver kinase-3) ligand, et même la **TPO** (la thrombopoïétine) [22,23]

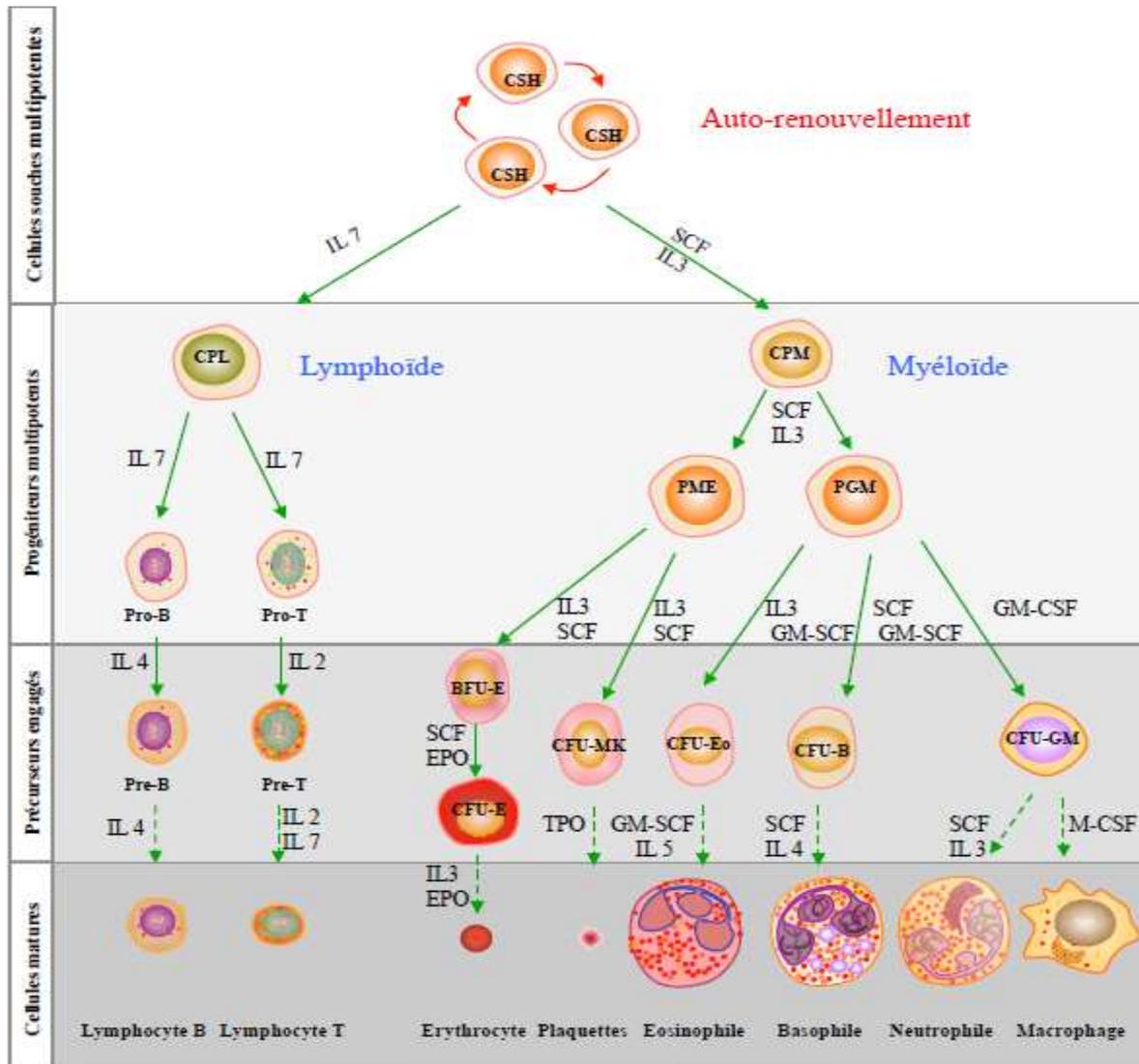
### 3.1.2. Facteurs multipotents :

Ils sont impliqués dans la différenciation des cellules hématopoïétiques et stimulent la croissance et/ou la survie de progéniteurs hématopoïétiques déjà commis vers les différentes voies de maturation. Ce sont principalement les : **IL-3** et **GM-CSF**. Les **IL-3** dont la synthèse est extra-médullaire (Lymphocyte T, mastocytes et cellules gliales), agissent sur toutes les lignées hématopoïétiques ; ils induisent une prolifération des progéniteurs et favorisent une différenciation de toutes les lignées sauf érythroblastiques. Le **GM-CSF** est produit par plusieurs types cellulaires tels que les lymphocytes T, les monocytes, les cellules endothéliales, les fibroblastes ou les ostéoblastes. Il agit principalement sur la prolifération et la différenciation des lignées granulocytaires et macrophagiques, mais est aussi capable d'induire la différenciation des mégacaryocytes, des éosinophiles et en présence d'érythropoïétine, des érythrocytes [24].

### 3.1.3. Facteurs restreints : [24–26]

Ils induisent des signaux uniques et agissent sur les cellules souches engagées et favorisent la multiplication cellulaire et la maturation des précurseurs. Ce sont principalement les :

- **G-CSF** : assurent la différenciation et l'activation des granulocytes.
- **M-CSF** : sont inactifs seuls, dépendant du GM-CSF, assurent l'activation et la survie des monocytes et macrophages.
- **Epo** : agissent tardivement sur la différenciation érythroblastique.
- **TPO** : jouent un rôle dans la maturation des mégacaryocytes, la libération et production des plaquettes.
- **IL-5** : assurent la différenciation des éosinophiles.



**Figure 5 :** Schéma de la hiérarchie des progéniteurs hématopoïétiques et indication des étapes cibles des facteurs de croissance. [5].

**3.2. Facteurs de transcription :**

Les facteurs de transcription jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'hématopoïèse [5]. Le mécanisme d'action de ces facteurs nécessite un domaine de liaison à l'ADN leur permettant de se fixer à une séquence spécifique située sur le promoteur des gènes-cibles à transcrire et un domaine transactivateur qui permet le recrutement de co-régulateurs transcriptionnels pouvant être activateurs ou répresseurs. Ces co-régulateurs peuvent agir directement sur la transcription en recrutant la machinerie transcriptionnelle sur les promoteurs, ou agir sur l'état de condensation de la chromatine en acétylant ou désacétylant spécifiquement certains résidus lysines des histones. L'acétylation ou la désacétylation des résidus aura respectivement, un effet activateur ou répresseur sur la transcription. Ces facteurs ayant un rôle important dans l'hématopoïèse (**Annexe2**) sont:

### 3.2.1. **SCL** (stem Cell Leukemia) :

Le facteur de transcription SCL également connu sous le nom de TAL-1 (T Cell Acute Leukemia) a été initialement découvert à travers son implication dans le réarrangement chromosomique dans les leucémies aiguës lymphoblastiques [27]. En effet, les embryons de souris SCL<sup>-/-</sup> sont totalement dépourvus d'érythrocytes primitifs et meurent d'anémie [28]. De plus, les cellules embryonnaires de souris SCL<sup>-/-</sup> ne participent à la formation d'aucune des lignées hématopoïétiques, que ce soit *in vitro* ou dans les souris chimériques, témoignant de l'absence totale de cellules souches de la lignée définitive. La délétion du gène a révélé son importance dans la genèse de l'hématopoïèse primitive et définitive, et son expression continue s'est avérée nécessaire dans le maintien du stock des CSHs dans la moelle osseuse chez l'adulte [29].

### 3.2.2. **LMO2** (LIM Domain Only 2) :

Connu comme étant le partenaire du gène *SCL*, le gène *LMO2* est exprimé d'une façon très importante dans les blastes leucémiques et apparaît être une cible dans les réarrangements chromosomiques dans les leucémies lymphoblastiques aiguës [30]. Les embryons de souris qui ont un déficit dans l'expression de ce gène meurent à cause de l'arrêt de la formation des érythrocytes lors de l'hématopoïèse primitive. Et comme pour le gène *SCL* les cellules LMO<sup>-/-</sup> ne contribuent pas à la formation des lignées lymphoïdes ou myéloïdes lors de l'hématopoïèse définitive [31].

### 3.2.3. **RUNX1** (Runt-related transcription factor 1):

Également connu sous le nom de 'AML1' (*Acute Myelogenous Leukemia Factor1*) a été décrit comme l'un des régulateurs critiques du développement de l'hématopoïèse définitive durant la vie embryonnaire. La perturbation de son expression en résulte la mort des embryons de souris avec l'absence de la mise en place de l'hématopoïèse définitive [32]. Fortement exprimés pendant la différenciation mégacaryocytaire des PME (Progéniteur Mégacaryo- Erythroïde) et son expression diminue pendant les phases précoces de l'érythropoïèse. Ce facteur de transcription interagit également avec GATA-1 lors de l'activation des promoteurs de gènes impliqués dans la mégacaryopoïèse. L'absence d'expression de RUNX1 a un effet important sur la différenciation mégacaryocytaire terminale entraînant ainsi la formation des plaquettes *in vivo* [33].

### 3.2.4. CBF $\beta$ (Core Binding Factor) :

Cofacteur de RUNX1, il fait partie des facteurs de transcription impliqués uniquement dans la différenciation des cellules de l'hématopoïèse définitive. Cette protéine hétérodimérique intervient au niveau du compartiment des cellules souches pluripotentes. En effet, l'absence d'expression des sous unités  $\beta$  et  $\alpha 2$ /AML-1 du facteur CBF entraîne un déficit sélectif de tous les compartiments hématopoïétiques de la lignée définitive alors que l'érythropoïèse primitive se déroule normalement [34].

### 3.2.5. GATA-2:

Les facteurs de transcription de la famille GATA, ont émergé comme des régulateurs de l'expression des gènes dans les cellules hématopoïétiques. Les protéines GATA ont été divisées en deux sous-familles : Les facteurs GATA-1, 2, et 3 sont exprimés dans les cellules hématopoïétiques alors que GATA-4, 5 et 6 sont exprimés dans des différents tissus dérivés du mésoderme et de l'endoderme, tels que le cœur, le foie, le poumon et l'intestin [35].

Le facteur de transcription GATA-2 est exprimé par les progéniteurs hématopoïétiques. Outre son rôle dans la régulation des voies de différenciation, GATA-2 est exprimé précocement dans les CSHs où il joue un rôle important dans l'activation de la prolifération cellulaire, son surexpression entraîne la différenciation mégacaryocytaire des cellules au détriment de la différenciation érythroïde [36]. Dans les cellules érythroïdes matures, l'expression de GATA-2 est rapidement diminuée par l'activation de GATA-1, alors que dans le cas des progéniteurs immatures, le facteur de transcription GATA-2 est exprimé au détriment de l'expression de GATA-1 qui dans ce cas sera inhibée [37].

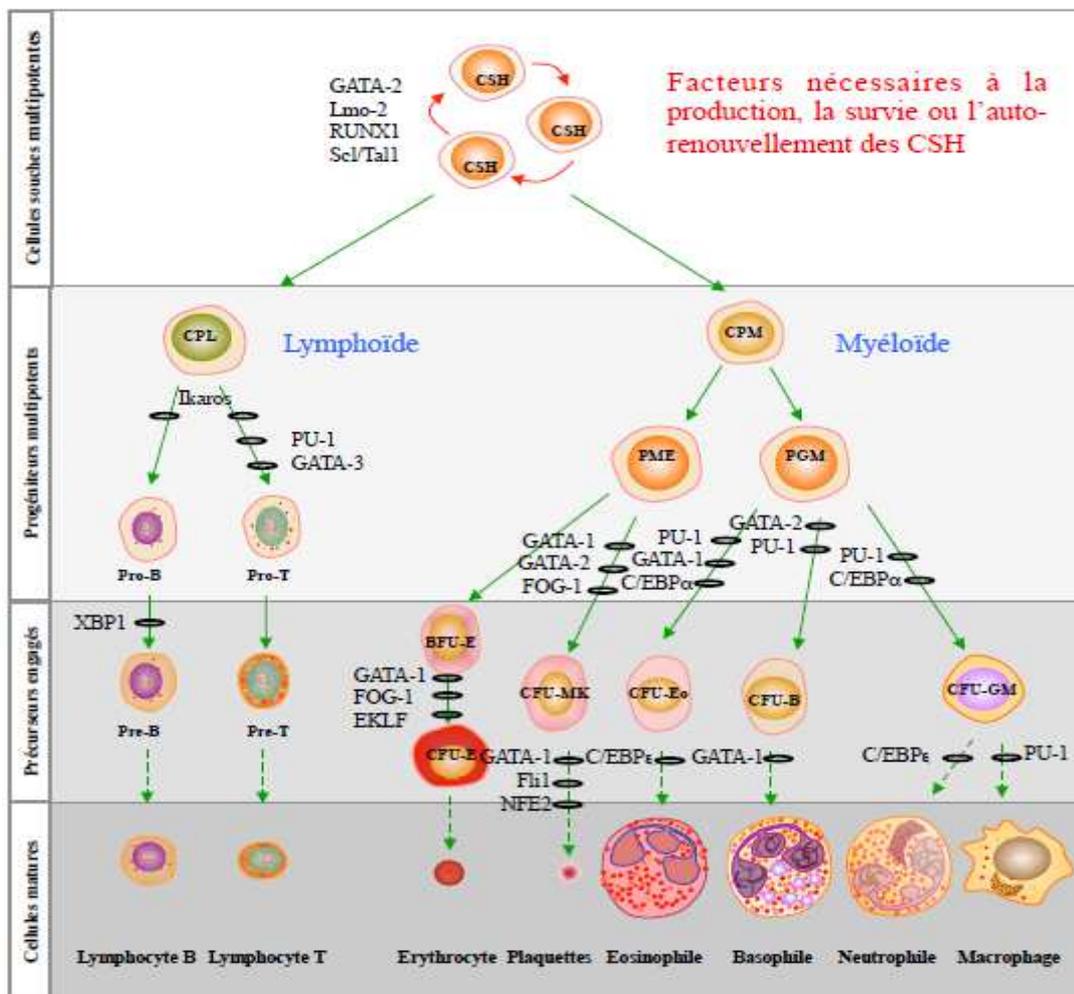
### 3.2.6. c-Myb (myeloblastosis) :

Le proto-oncogène c-Myb est un régulateur essentiel de l'hématopoïèse, qui agit sur la croissance, la survie, la prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques. C-Myb joue un rôle essentiel dans l'engagement des cellules souches vers la voie mégacaryocytaire ou érythrocytaire. c-Myb et GATA-1 interagissent afin d'assurer une différenciation mégacaryocytaire correcte. Le facteur c-Myb influence également les progéniteurs vers cette voie de différenciation, mais à la différence de GATA-1, il n'a pas d'effet sur le processus de différenciation terminale [38]. Concernant la différenciation érythroïde, c-Myb intervient au niveau des stades précoces de l'érythropoïèse. Son expression est élevée dans les CFU-E et dans les érythroblastes. Dans les cellules érythroleucémiques,

qui sont bloquées au stade CFU-E, c-Myb peut agir comme un inhibiteur de la différenciation érythroïde terminale [39].

**3.2.7. PU.1 :**

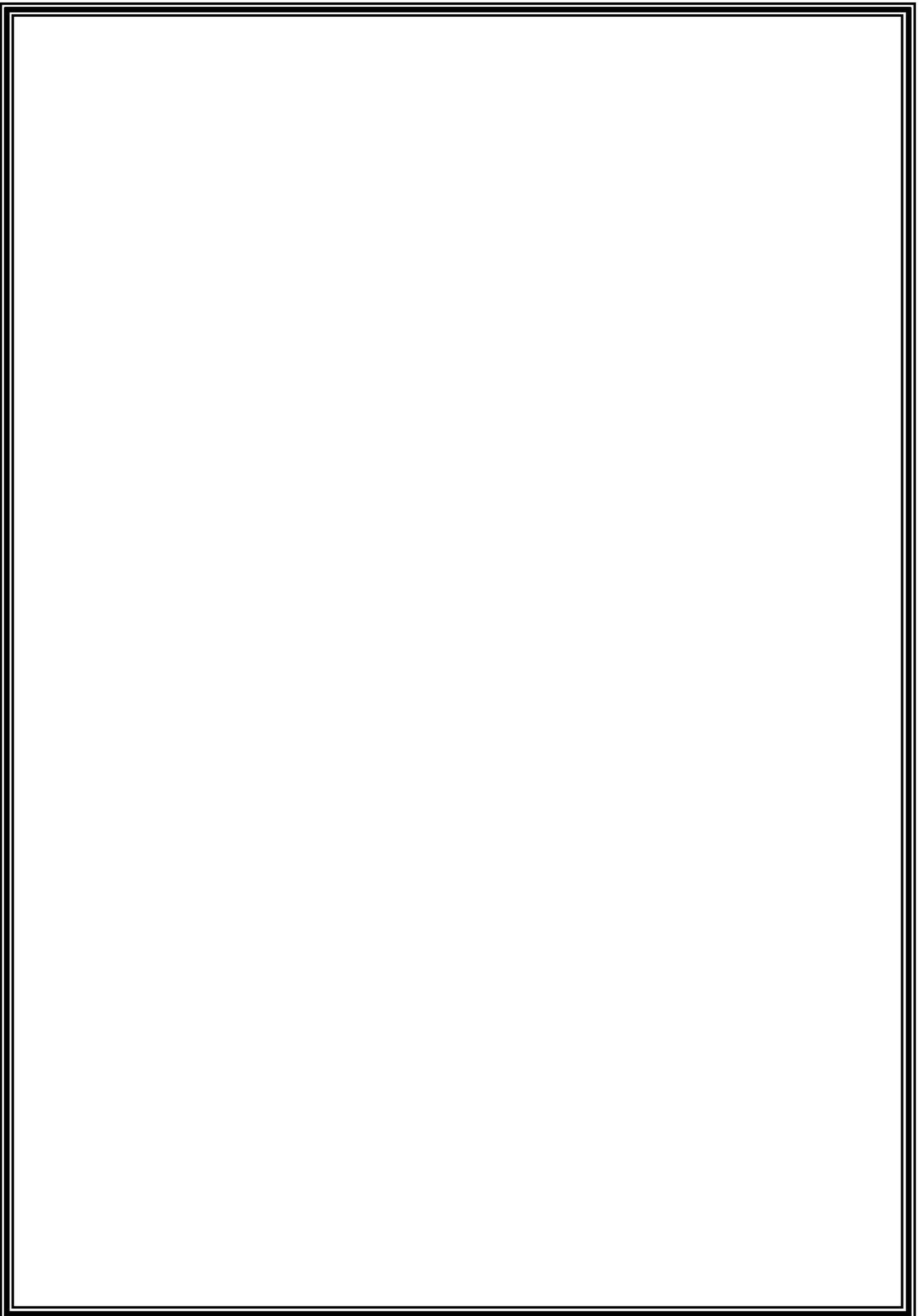
C'est l'un des principaux régulateurs hématopoïétiques, ayant un rôle particulier lors de la différenciation myéloïde et lymphoïde. Son niveau d'expression varie de manière dynamique au cours de l'hématopoïèse afin d'orienter les CSHs vers l'une ou l'autre des voies de différenciation hématopoïétique. PU.1 est surexprimé dans les macrophages et les lymphocytes B alors qu'il est exprimé à des niveaux plus faibles dans les cellules érythroïdes matures, les mégacaryocytes et dans les cellules T. L'expression inappropriée de PU.1, dans les cellules hématopoïétiques spécifiques, peut conduire à une transformation leucémique, comme dans le cas des lymphomes à cellules T ou des érythroleucémies [40]. Des travaux ont montré que GATA-1 et PU.1 peuvent interagir physiquement et s'inhiber mutuellement [41].



**Figure6 :** Schéma de la hiérarchie des progéniteurs hématopoïétiques et indication des étapes cibles des facteurs de transcription.[5]

# Chapitre II

## Leucémies Aigues



### I. Définition :

Les leucémies sont des hémopathies malignes résultant d'anomalies de la balance physiologique entre prolifération, différenciation et apoptose touchant une cellule hématopoïétique, responsable de l'accumulation de cellules anormales, clonales et malignes. Selon le lignage, le stade de maturation, la localisation préférentielle de la cellule primitivement atteinte et selon le type de cellules qui s'accumulent, les tableaux physiopathologiques, cliniques et évolutifs de ces hémopathies sont très divers.

### II. La leucémogénèse :

La leucémie est un ensemble de processus hématopoïétiques aberrants prenant origine dans des Cellules Souches Leucémiques (CSLs) rares ayant accumulé des mutations et/ou des changements épigénétiques. Ces altérations permettent à la cellule de maintenir ou de réacquérir la capacité d'auto-renouvellement et de prolifération clonale indéfinie [42].

L'existence de CSLs a été mise en évidence dans les années 90, quand des études de transfection de cellules primaires de leucémies aiguës myéloïdes dans des souris chimériques ont montré que seule une sous-population rare de cellules, marquées CD34+CD38-, était capable d'initier et de maintenir la prolifération du clone leucémique [43]. L'origine de la CSL a été discutée dans la littérature : une première hypothèse soutenue par **Bonnet *et al.*** propose l'existence des CSLs capables d'initier, de maintenir et de réinitier la leucémie. Cette théorie définit l'existence d'une organisation hiérarchique des leucémies où comme dans l'hématopoïèse normale, une sous population de CSL peut à la fois s'auto-renouveler et s'engager dans une voie de différenciation tandis que les cellules leucémiques plus différenciées perdent cette capacité [43,44].

Une deuxième hypothèse « two-hit model » [45,46] postule que la CSL dériverait de progéniteurs engagés ou même différenciés : elle accumulerait des mutations suite à la réacquisition de la capacité d'auto-renouvellement. Des éléments de preuve en faveur de cette hypothèse proviennent d'expériences de transfection dans lesquelles des gènes de fusion leucémiques, tels la fusion *MLL-ENL* de la translocation t(11;19)(q23;p13.3), provoqueraient la leucémie chez les souris. Ces mutations sont mutuellement exclusives :

- Une mutation de classe I conférant un avantage prolifératif et/ou de survie aux cellules leucémiques. Il s'agit typiquement des mutations entraînant l'activation anormale des voies de signalisation médiées par des tyrosines kinases (FLT3 ou RAS).

- Une mutation de classe II bloquant la différenciation myéloïde et conférant une capacité d'auto-renouvellement représentée par les translocations ou les mutations de gènes codant pour les facteurs de transcription (CEBPA (CCAAT/enhancer-binding protein), RUNX1) ou les mutations des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et la mort cellulaire (NPM1 (nucleophosmine 1), p53).

Cependant, d'autres mécanismes interviennent dans la leucémogénèse et sont actuellement en cours d'étude avec en particulier les anomalies épigénétiques.

Comme pour la majorité des cancers, la leucémogénèse impliquerait une interaction entre les gènes et l'environnement. Les expositions à des substances toxiques ou carcinogènes durant la grossesse (exposition directe à des radiations ionisantes ou indirectes par le biais de l'ingestion maternelle) chez la femelle pourraient causer des dommages à l'ADN. Même si plusieurs facteurs, tels que certaines infections, la consommation de drogues et la déficience en folate, sont proposés comme carcinogènes in utero, il n'existe pas d'évidences concluantes au lien entre l'exposition pré-gestationnelle et le cancer [47]. Seules les expositions foetales aux radiations ionisantes et au diethylstilbestrol ont été prouvées carcinogènes. Par ailleurs, suite à l'exposition à des inhibiteurs de topoisomérase II dans un cadre thérapeutique, les réarrangements de *MLL* sont les remaniements les plus fréquents des leucémies secondaires [47,48].

### **III. La classification des leucémies :**

Les cancers hématologiques sont principalement regroupés selon la lignée cellulaire atteinte, à savoir ; myéloïde ou lymphoïde, et la rapidité de leur évolution, qui peut être soit aiguë dont l'évolution est rapide, ou chronique dont l'évolution est plus lente. La première classification FAB des leucémies (1976) [3] se basait essentiellement sur des données morphologiques, immunophénotypiques, cytochimiques et cliniques pour classer les leucémies aiguës. En 2008, une nouvelle classification est apparue ; celle de L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) qui a intégré, pour la première fois les facteurs génétiques dans la classification [49]. Enfin en 2016, il y'a eu une révision de la classification précédente, celle-ci a ajouté des précisions sur les anomalies génétiques caractérisant chaque types et sous-types de leucémie [50].

#### **1. Leucémie aiguë myéloïde :**

Les LAM sont une forme de cancer qui touche les cellules myéloïdes. Dans les

LAM, les précurseurs des polynucléaires ou des monocytes prolifèrent de façon anarchique, sans maturation et l'accumulation de ces cellules immatures ou blastiques empêche la production des autres types cellulaires, ce qui conduit à une anémie, une neutropénie et une thrombocytopenie plus ou moins prononcées.

### **1.1. Classification FAB : (Annexe 3)**

La classification FAB reposait exclusivement sur des critères cytologiques. Une LAM était définie sur la mise en évidence de plus de 30% de blastes dans la moelle osseuse. Cette classification distinguait une entité, parmi les syndromes myélodysplasiques, de type anémie réfractaire avec excès de blaste en transformation dont la blastose médullaire était comprise entre 20 et 30% [3]. La classification FAB distinguait huit entités (LAM 0 à 7) en regroupant les LAM selon la lignée d'origine de la population blastique, et le niveau de blocage de la maturation myéloïde résiduelle [3]. Cependant cette classification n'a pas de caractère pronostique hormis les entités les plus rares (LAM6, LAM7), de pronostic défavorable, et le pronostic devenu très favorable des leucémies aiguës promyélocyaires (LAM3 ou LAP) avec l'introduction de l'association de l'acide tout *trans*-rétinoïque à la chimiothérapie intensive.

### **1.2. Classification OMS :**

En 2008, l'OMS a de nouveau modifié la classification. L'objectif était d'ajouter les nouvelles données apparues depuis 2001 et d'harmoniser les critères définissant les pathologies myéloïdes sur le plan international. Un effort particulier a été porté sur la distinction entre les néoplasmes myéloïdes et les LAM. L'OMS a confirmé certaines entités nouvellement décrites dans sa révision 2016 [49,50].

## **2. Leucémie aiguë lymphoblastique:**

La leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) est une affection médullaire caractérisée par une prolifération clonale de lymphoblastes malins. On distingue les LAL de la lignée B et celles de la lignée T (**Annexe 4**).

### **2.1. Classification FAB :**

Les LAL peuvent être classées, suivant les recommandations du groupe FAB, en trois types, LAL1, LAL2, LAL3, en fonction de l'aspect du noyau et des nucléoles, du rapport nucléo-cytoplasmique, de la basophilie du cytoplasme et de la présence des vacuoles

cytoplasmique ; généralement les nucléoles ne sont pas visibles La catégorie L3, LAL à cellules de type Burkitt, est désormais considérée comme une phase leucémique du lymphome de Burkitt [3,49].

### **2.2. Classification OMS :**

En 2008, l'OMS apporte plusieurs entités spécifiques chez les patients présentant une leucémie aiguë lymphoblastique de type B définies par l'existence d'anomalies chromosomiques associées notamment avec des caractéristiques phénotypiques et pronostique. Ils comprennent la t (9;22), t (v;11q23), t (12;21), LAL B avec hyperdiploïdie, LAL B avec hypodiploïdie, t (5;14) et t (1;19). [51].

Les anomalies de bon pronostic sont l'hyperdiploïdie chromosomiques et la translocation (12; 21) (p13; q22) qui juxtapose les gènes TEL et AML-1. Elles sont celles qui sont le plus largement retrouvées puisque présentes dans plus de la moitié des cas. Au contraire, une hypodiploïdie, une translocation (9;22) (q34;q11.2) juxtaposant les gènes BCR et ABL, une translocation (4;11) (q21;q23) responsable de la fusion du gène MLL et du gène AF4 ou une translocation (1;19) (q23; p13.3) juxtaposant les gènes E2A et PBX sont des anomalies de mauvais pronostic. D'autres anomalies peuvent être retrouvées qui sont associées à un pronostic intermédiaire [49,50] .

## **IV. Etiologie :**

La leucémogénèse est un processus multi-étapes qui nécessite une susceptibilité des progéniteurs hématopoïétiques à des agents inducteurs à divers stades. Les différents types de leucémies aiguës peuvent avoir chacun un mécanisme causal distinct, suggérant ainsi la présence d'une liaison fonctionnelle entre une aberration moléculaire ou mutation et l'agent causal. Différents facteurs sont étiologiquement impliqués dans l'apparition des LA, non seulement dans les différents types mais aussi entre les individus. Cependant, l'implication de ces facteurs dans l'apparition de la maladie n'a pas été complètement comprise. Ces facteurs peuvent être classés comme en :

**1. Facteurs génétiques**: tels que les syndromes de Down, Klinefelter, Li-Fraumeni et Bloom, ainsi que la neurofibromatose [52,53]. Pour les LAM pédiatrique, une étude a montré qu'il y'a d'autres facteurs de risque lié à l'ethnicité, l'âge du père lors de la conception et la période entre laquelle la mère a donné deux naissances. En effet, les enfants asiatiques ont un risque plus élevé que celui des enfants caucasiens, les enfants dont le père est âgé de plus de

35 ans lors de leur conception ont un risque plus élevé que de ceux âgés entre 20 et 34 ans et enfin, une longue période entre la conception de deux enfants (au moins 7 ans) semble accroître le risque de leucémie [54].

**2. Aberrations cytogénétiques** : les anomalies somatiques sont très fréquentes dans les leucémies aiguës tels que les aneuploïdies, pseudo-ploïdies, hyper-ploïdies, la translocation *TEL-AML1*, les remaniements du gène *MLL*, délétion du chromosome 5, 7, Y et 9, t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q22;q11), la trisomie 8 et d'autres aberrations qui touchent les chromosomes 9,11 et 16 [52].

**3. Agents physico-chimiques** : plusieurs facteurs chimiques et environnementaux sont associés à l'apparition des leucémies. A titre d'exemple ; l'exposition aux radiations ionisantes, les substances médicales alkylantes, inhibiteurs de la topoisomérase II, chloramphénicol, les pesticides, l'exposition à des engins électriques et magnétiques.

**4. Facteurs viraux** : ces facteurs sont principalement responsables des hémopathies lymphoïdes. La théorie la plus largement acceptée en ce qui concerne la cause des LA est l'infection virale accompagnée d'une diminution de l'efficacité du système immunitaire [55] et en particulier les rétrovirus à ARN qui sont impliqués dans l'apparition de plusieurs néoplasmes dont les leucémies [56].

## V. Epidémiologie :

Le cancer figure parmi les principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde ; on estime qu'en 2013, l'incidence mondiale du cancer est d'environ 18.6 millions et que sa prévalence mondiale est d'environ 33 millions [57].

Selon les statistiques de l'OMS, le nombre de nouveaux cas devrait augmenter de 70% environ au cours des 2 prochaines décennies [58]. Cette maladie a entraîné en 2015, 8.8 millions de décès, soit 17% de l'ensemble des décès [59]. En Algérie, selon une étude faite en 2014, le nombre de cas enregistré dans cette année est 41250 dont 18710 hommes et 22540 femmes, avec un taux d'incidence de 99.2 et 112.7 par 100,000 personnes [60].

Les leucémies sont classés 11<sup>ème</sup> des cancers dans le monde entier, avec environ 352,000 nouveaux cas diagnostiqués en 2012 ce qui représente environ 02% du total des cancers. Les taux d'incidence des leucémies sont plus élevés en Australie/Nouvelle-Zélande et plus faible en Afrique de l'Ouest, mais cela reflète en partie la qualité des données variables dans le monde entier [57] . Bien que les leucémies soient parmi les cancers les plus répandus

chez l'enfant, elles sont rencontrées aussi le plus souvent chez les adultes les plus âgés. La leucémie est légèrement plus fréquente chez les hommes que chez les femmes.

En Amérique, elles présentent 3,7 % de nouveaux cas de cancer, leur prévalence était 387,728, le nombre de nouveaux cas a atteint 13.7 /100,000 personnes en 2014 [61].

Elles sont le 12<sup>ème</sup> cancer le plus fréquent en Europe, avec environ 82 300 nouveaux cas diagnostiqués en 2012. En Europe, le taux le plus élevé d'incidence de leucémies est en Irlande pour les hommes et en Chypre pour les femmes et les taux les plus faibles sont en Bosnie Herzégovine pour les hommes ainsi que pour les femmes [57,62].

Elles sont le 12<sup>ème</sup> cancer le plus fréquent au Royaume-Uni (2014), représentant 3% de tous les nouveaux cas. Chez les hommes, elles sont le 10<sup>ème</sup> cancer le plus fréquent, alors qu'elles sont le 11<sup>ème</sup> chez les femmes [63]. En 2014, il y a eu 9 534 nouveaux cas de leucémie : 5 744 (60%) chez les hommes et 3 790 (40%) chez les femmes. Le taux d'incidence montre qu'il y a 18 nouveaux cas de leucémie pour 100 000 hommes au Royaume-Uni, et 12 pour 100 000 femmes.

En Moyen orient et Afrique du Nord, elles sont le 9<sup>ème</sup> cancer le plus fréquent avec un taux d'incidence de 3.9%, et un taux de mortalité de 5.1% (le 6<sup>ème</sup>). En Algérie, elles sont classées en 6<sup>ème</sup> place avec une incidence estimée à 4.7/100,000 soit 04% des cancers et un taux de mortalité de 5.5% les plaçant en 5<sup>ème</sup> position des causes de décès. Au Maroc, elles ne sont pas classées dans les 10 premiers cancers en incidence, 2.9/100,000, mais classées en 9<sup>ème</sup> position de taux de mortalité (3.5%). En Tunisie, leur incidence est de 3.4%, classées 8<sup>ème</sup> selon le taux d'incidence et de mortalité [64].

Les LAL représentent moins de 1% des cancers de l'adulte et 25% des cancers pédiatriques. Leur incidence mondiale est 1/100.000 personnes par an [65]. En Amérique, elles présentent moins de 0.4% des cancers tous types confondus, 13.6% des leucémies et 29.6% des leucémies lymphoblastiques. D'une manière indépendante de l'âge, les LAL ont une fréquence élevée dans les populations hispaniques, au Canada et en Nouvelle-Zélande. Les faibles fréquences sont retrouvées dans les populations de race Africaines et juives, la Chine et l'Inde [66].

La fréquence des LAM est 25% des leucémies de l'adulte et elle est considérée comme étant le type le plus répandu des leucémies. Les LAM représentent 1% des cancers et 80% des leucémies aigues chez l'adulte dont l'incidence est en constante augmentation [52]. L'incidence annuelle selon les données américaines du programme SEER (Surveillance Epidemiology and End Results) est de 4/100000 habitants dans la population générale et de 18/100000 habitants au-delà de 65 ans [67].

# Chapitre III

Diagnostic et pronostique des  
leucémies aiguës

## I. Diagnostic cliniques :

Les signes cliniques des leucémies peuvent être groupés principalement en deux ; ceux dues à l'insuffisance médullaire et ceux dues au syndrome tumoral proprement dit. Cependant, il se peut que parfois certains signes cliniques de gravité variable peuvent y'être associés [49].

### 1. Insuffisance médullaire :

L'évolution médullaire des leucémies peut générer une insuffisance de l'hématopoïèse normale et des signes cliniques d'insuffisance médullaire plus ou moins associés [68].

a- **Le syndrome anémique :** il est d'origine érythrocytaire et est souvent important et d'apparition rapide, il se traduit par une pâleur cutanéomuqueuse, des manifestations cardio-vasculaires, et une asthénie.

b- **Le syndrome hémorragique :** il est lié à au taux de la thrombopénie, il s'agit habituellement d'un purpura cutané pétéchial ou ecchymotique. Le danger est celui d'une hémorragie cérébro-méningée.

c- **Le syndrome infectieux :** il est lié à l'importance de la neutropénie. La fièvre est présente dans la moitié des cas. Des foyers infectieux doivent être recherchés par l'examen clinique et par des prélèvements bactériologiques.

### 2. Syndrome tumoral :

Il s'agit d'un ensemble des signes cliniques liés à l'envahissement des tissus et organes par les cellules hyperproliférantes d'une hémopathie. Cet envahissement entraîne une augmentation de volume et/ou un retentissement fonctionnel selon la cible. Les deux tissus principalement touchés sont les ganglions lymphatiques et la rate [69,70].

### 3. Autres signes :

a- **Syndrome de lyse cellulaire tumoral :** c'est l'ensemble des complications secondaires à la destruction massive, spontanée ou provoquée, d'une grande quantité de cellules néoplasiques lors d'un traitement anticancéreux, et parfois sans traitement.

b- **Syndrome de CIVD :** la coagulation intra-vasculaire disséminée est liée à un catabolisme excessif du fibrinogène. Cela est dû à une libération massive de substances pro-coagulantes dans l'espace vasculaire, entraînant ainsi une activation excessive du

processus de coagulation et une activation systémique de la thrombine. rencontré principalement dans le cadre du diagnostic des LAM3 et des leucémies aiguës lymphoblastiques de type Burkitt, ce syndrome peut aussi être observé dans les autres types de leucémies [68,69].

## **II. Diagnostic biologique :**

Il repose généralement sur l'hémogramme, le myélogramme et des autres examens complémentaires tels que la cytométrie en flux, cytogénétique standard et moléculaire et la biologie moléculaire. Ces examens aident à identifier le type de la leucémie aiguë.

## **III. Pronostic :**

Plusieurs facteurs pronostiques ont été définis pour les différents types de leucémies : La cytogénétique, l'âge, le fait que la leucémie soit secondaire à une autre hémopathie ou à un traitement cytotoxique pour une autre tumeur, ainsi que la masse tumorale, le traitement entrepris, la rapidité de la réponse et la qualité de celle-ci deviennent essentiels. Le caryotype représente le facteur pronostique le plus important.

Dans le cas des LAM, les critères utilisés pour le pronostic :

- Les deux caractères qui sont constamment associés à un pronostic péjoratif sont : l'âge (plus le patient est âgé de 60 ans plus, le risque d'échec est important) et aussi le caractère secondaire des LAM.
- Une hyperleucocytose initiale > 30 Giga/l ;
- Type cytologique : meilleur pronostic des formes M3 et M4 éosinophiles, plus mauvais pronostic des formes M0 et M7 ;
- Phénotype immunologique : l'expression du marqueur CD34 et/ou de la protéine gp170 est corrélée à un mauvais pronostic ;
- Anomalies cytogénétiques : le pronostic favorable est associé aux anomalies suivantes : t (15;17), t (8;21) et 16(inv16). Celles de mauvais pronostic comportent des pertes chromosomiques tel que : (-q7)/ -7, (-q5)/5, une anomalie sur le chromosome 3 (3q26).
- La forme biphénotypique (Myéloïde et lymphoïde) confère à l'hémopathie un extrême mauvais pronostic.

Dans le cas des LAL, les critères utilisés pour le pronostic :

- L'âge : les patients les plus jeunes ont un pronostic plus favorable que ceux qui sont âgés de plus de 60 ans. Les nourrissons et les enfants d'âge de 10 ans et plus ont tendance à avoir de moins bon résultats
- Les patients diagnostiqués avec une numération leucocytaire inférieure à 50 000 ont tendance à avoir un plus bon pronostic que les patients ayant un nombre plus élevé.
- Le sous type des LAL affecte le pronostic ; ainsi les patients avec des LAL T ont tendance à avoir un meilleur pronostic que ceux avec des LAL B.
- Certaines études indiquent un bon pronostic chez les enfants de sexe féminin que ceux du sexe masculin. Cela est peut être due au risque d'atteinte par le cancer des testicules chez les garçons.
- Les LAL de mauvais pronostic comportent des translocations t (9;22) ou chromosome de Philadelphie, t(1;19) et 11q23 (Translocation du chromosome 11 avec plusieurs autres chromosomes).

#### IV. Place de la cytogénétique dans le diagnostic:

Les anomalies cytogénétiques sont identifiées dans 50-60% des patients leucémies aiguës adultes [53,71]. Certaines anomalies chromosomiques sont récurrentes et sont dans certains cas associées à un type cytologique bien défini. Ce qui rend l'analyse cytogénétique un examen indispensable lors de l'évaluation d'une leucémie aigüe au diagnostic, car ces anomalies détectées constituent l'un des plus puissants facteurs pronostiques indépendants de cette pathologie. Les techniques cytogénétiques contribuant au diagnostic des entités les plus fréquentes, telles les hyperdiploïdies > 50 chromosomes, t(12;21)(p13;q22)/TEL-*AML1*, t(9;22)(q34;q11) /*BCR-ABL*, les réarrangements du gène *MLL* 11q23, t(15;17)(q22;q12-21)/*PML-RAR $\alpha$* , t(8;21)(q22;q22)/ *AML1-ETO* et inv(16)(p13q22)/*CBF $\beta$ -MYH11* sont maintenant intégré dans la pratique quotidienne

Le caryotype fait partie intégrante du choix du traitement dans les essais thérapeutiques et aussi il peut être informatif dans la prédiction d'une rémission complète. En fait, plusieurs données montrent que la persistance, après la chimiothérapie d'induction, d'anomalies cytogénétiques présentes au moment du diagnostic dans les blastes leucémiques détermine un taux élevé de rechute et un résultat clinique moins favorable avec un taux de survie sans maladie et survie globale plus faibles [72].

Parmi les aberrations les plus connues et qui fut la première décrites dans les hémopathies et la translocation  $t(9;22)(q34;q11)$  qui est une translocation réciproque entre les bras longs des chromosomes 9 et 22, identique à celle trouvée dans les leucémies myéloïdes chroniques. Ce remaniement entraîne la fusion de deux gènes au niveau du point de cassure sur le chromosome dérivé 22 (ou chromosome Philadelphie, Ph+) : *BCR* localisé sur le chromosome 22 et le domaine tyrosine kinase du proto-oncogène *ABL1* localisé sur le chromosome 9. Cet oncogène hybride, *BCR-ABL1*, code pour une protéine chimérique à activité tyrosine-kinase constitutionnellement active, responsable de la prolifération cellulaire clonale.

D'un point de vue moléculaire, il existe 3 régions de cassure chromosomique dans le gène *BCR* aboutissant à l'expression de différents transcrits de fusion *BCR-ABL1*. Le point de cassure observé dans les LAL est celui sur le chromosome 9 où les points de cassure du gène *ABL* surviennent pratiquement toujours entre les exons 2 et 1a, tandis que les points de cassure sont moins stéréotypés sur le chromosome 22, survenant soit en M-BCR (*Major Breakpoint Cluster*) et codant alors pour une protéine de 210 kilodaltons (KDa), soit en m-BCR (pour *minor Breakpoint Cluster*) et codant pour une protéine de 190 Kda. Les LAL Ph+ peuvent exprimer p210 avec ou sans co-expression de p190. L'expression de p210 augmente avec l'âge, elle est rare chez l'enfant (10 % des cas), elle est observée dans 25 à 50 % des LAL Ph+ de l'adulte [73]. Cette translocation est notamment associée à d'autres anomalies chromosomiques additionnelles telles que l'hyper diploïdie, la monosomie 7, les anomalies du bras court du chromosome 9, les dernières étant connues pour conférer un plus mauvais pronostic [74].

L'analyse cytogénétique au moment du diagnostic est aujourd'hui le facteur pronostique le plus important dans la prédiction des résultats des patients LAM. La stratification des patients atteints de LAM en fonction de l'évaluation cytogénétique permet d'établir la meilleure thérapie post-rémission pour les patients. En particulier, les patients faisant partie du groupe cytogénétique à risque défavorables sont des candidats potentiels pour une greffe allogénique des CSHs, alors que, les patients du groupe cytogénétique à risque favorable ne recevront qu'une chimiothérapie de consolidation standard [75].

Le tableau suivant résume les critères sur lesquels les LAM sont stratifiées :

Groupe de risque	Anomalies
<b>Favorable</b>	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> <i>NPM1</i> muté sans <i>FLT3-ITD</i> <i>CEBPA</i> muté
<b>Intermédiaire</b>	t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i> anomalies cytogénétiques non classées comme favorable ou défavorable
<b>Défavorable</b>	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> réarrangements du t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21.3q26.2) t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EV11)</i> -5 or del(5q); -7; -17/abn(17p) caryotype complexe <i>FLT3-ITD</i> <i>RUNX1</i> muté <i>TP53</i> muté

**Tableau 1** : stratification des patients LAM selon les anomalies génétiques

**Remarque:** le caryotype normal trouvé chez les patients LAM est classé dans le groupe à risque intermédiaire [75].

# Chapitre IV

## Gènes d'intérêt

## I. Le récepteur FLT3 :

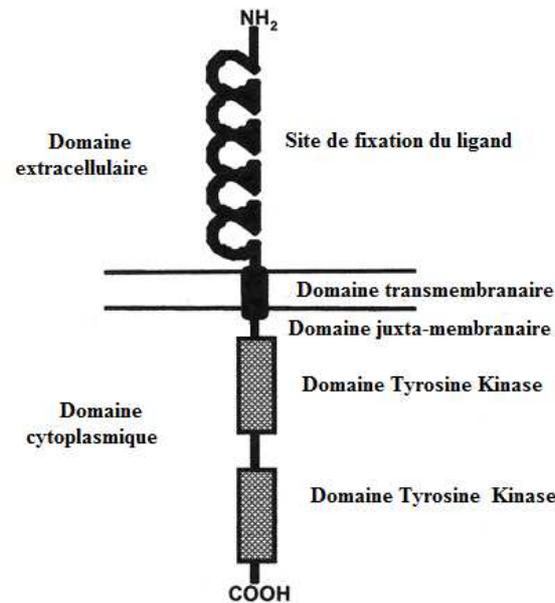
### 1. Généralités :

Le récepteur *FLT3* (*FMS-like tyrosine kinase 3*), ou Flk2 (*fetal liver kinase 2*), aussi appelé chez l'homme STK1 (*Stem cell tyrosine kinase 1*) ou CD13 appartient à une famille de récepteurs à activité tyrosine kinase RTK III comprenant également FMS, c-kit et PDGFR [76].

Le *FLT3* est exprimé dans les organes du système hématopoïétique et du système nerveux, les gonades et le placenta ainsi que dans les cellules hématopoïétiques primitives du foie fœtal [77]. L'expression du *FLT3* est sélective sur les cellules souches hématopoïétiques CD34+ et les progéniteurs hématopoïétiques immatures, y compris les progéniteurs lymphoïdes-B, les précurseurs myéloïdes et les monocytes, mais il est pratiquement absent dans les progéniteurs érythroïdes [78]. Par ailleurs, il a été expérimentalement démontré que les cellules CD34 de la moelle osseuse peuvent produire deux populations cellulaires différentes selon le niveau d'expression du *FLT3* : les GM-CFU qui se caractérisent par une forte expression du récepteur, et les E-CFU dont l'expression du *FLT3* est plus faible, jouant ainsi un rôle important dans le processus de régulation de l'hématopoïèse [79].

### 2. Structure:

La molécule du *FLT3* est constituée de 4 domaines distincts : le premier est la partie extracellulaire N-terminal (541 acides aminés), qui est composé de 5 sous-unités « immunoglobulines-like » dont les 3 domaines distaux sont impliqués dans la fixation du ligand, alors que les deux autres sont impliquées dans la dimérisation du récepteur. La deuxième partie est le domaine transmembranaire (21 acides aminés), et puis le domaine juxta-membranaire et enfin le domaine cytoplasmique (431 acides aminés), cette partie est composé de deux domaines tyrosine kinase TK1 et TK2 liés par un insert kinase (KI) [80].



**Figure7 :** Structure du récepteur FLT3 [81]

### 3. Activation :

La cytokine FLT3-ligand étant produite de façon ubiquitaire dans l'organisme, c'est l'expression restreinte de son récepteur qui gouverne son spectre d'activité. La liaison du ligand à son récepteur conduit à la dimérisation de celui-ci, la juxtaposition des domaines intracytoplasmiques rend alors possible la trans-phosphorylation des domaines cytoplasmiques sur les résidus tyrosines du dimère. Cette phosphorylation constitue un événement crucial initiant l'activité kinase intrinsèque du récepteur. Les résidus tyrosines activés du FLT3 se lient ensuite aux domaines SH2 (Src-homology 2) de protéines cytoplasmiques cibles telles que p85, GRB2, p115 (CBL), p52 (SHC) dont la phosphorylation est impliquée dans la transduction du signal. Le signal est alors transmis soit par la voie des inositol phosphates 3' kinases (PI3K), soit par d'autres voies PI3K indépendantes [82].

### 4. Fonction :

Le FLT3 possède un rôle crucial dans plusieurs processus de régulation des cellules hématopoïétiques, le métabolisme des phospholipides, la transcription, la prolifération et l'apoptose. L'activation du FLT3 par son ligand stimule la croissance des progéniteurs hématopoïétiques et cette stimulation dépend fortement du type cellulaire ainsi que des facteurs de croissances qui agissent sur ces cellules. **Gabbianelli *et al.*** ont montré que la stimulation par le *FLT3* en absence des autres facteurs de croissance induisait la différenciation de progéniteurs hématopoïétiques en cellules monocytaires, tandis qu'une

stimulation avec le *FLT3* combinée à des facteurs de croissances tels que l'IL-3, G-CSF, CSF1, GM-CSF, EPO et KIT ligand produisait une réponse proliférative plus vigoureuse et stimule le développement des GM-CFU[83].

Par ailleurs, une stimulation par le *FLT3* n'a aucun effet sur le développement des lignées érythroïtiques et mégacaryocytaires du fait de l'absence de ce récepteur dans ces lignées. La stimulation par le *FLT3*-IL est aussi importante dans le développement des lignées lymphoïdes ; si elle est associée à IL-7, IL-6, Il-3 cette stimulation induit la croissance des cellules pro-B en les rendant indépendantes des cellules stromales, ainsi que la différenciation des cellules pro-B en cellules pre-B ainsi que la prolifération et la différenciation des cellules T. Une activation de la cellule avec le complexe FLT3-IL peut aussi induire le développement et l'expansion clonales des cellules dendritiques dans la moelle osseuse, la rate et les ganglions lymphatiques, et compte tenu de l'importance de ces cellules dans la réponses immunitaire, il a été déduit que la stimulation par le complexe FLT3-IL joue un rôle important dans la réponse immunitaire [84].

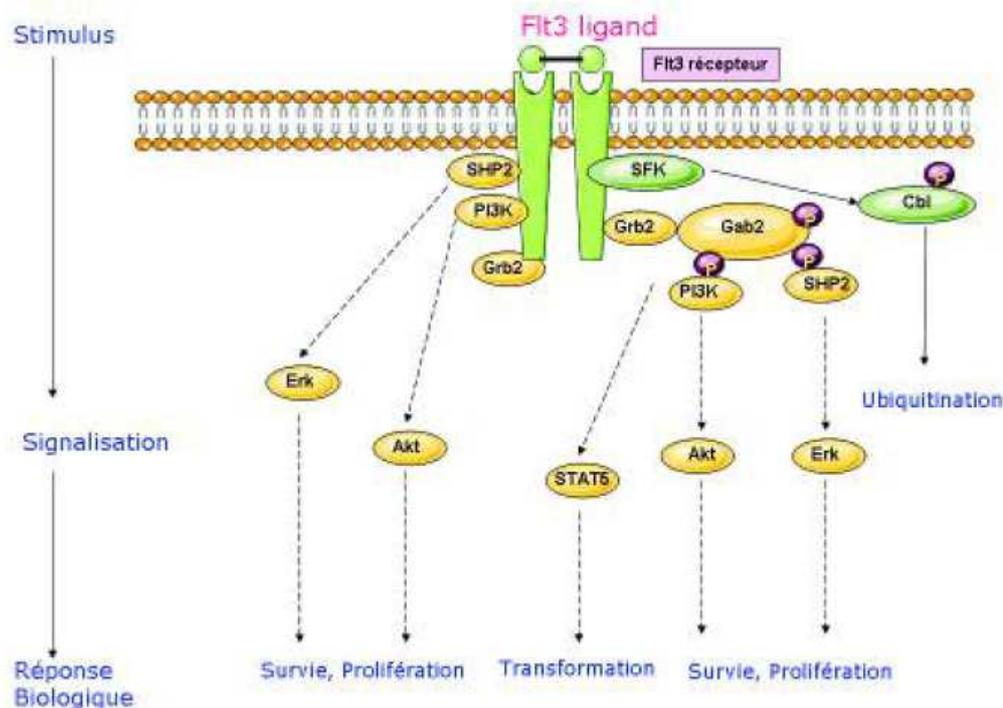


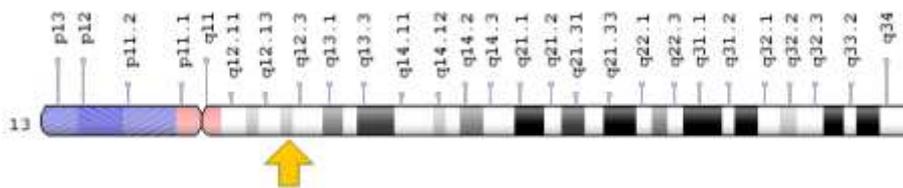
Figure 24 : Principales voies de signalisation activées par la liaison de Flt3 ligand (FL) à son récepteur Flt3

SKF : Src kinase famille.

**Figure 8** : Principales voies de signalisation activées par la liaison FLT3 ligand et son récepteurs FLT3

### 5. Le gène *FLT3*:

Le gène *FLT3* localisé chez l'homme, dans la région 12 du bras long du chromosome 13(13q12) [85]. Ce gène est composé de 24 exons et couvre approximativement 96982 kb qui commence à la position 27,475,753 pb et s'étend jusqu'à 27,572,735 bp (Homo sapiens Annotation Release 109, GRCh38.p12 NCBI). La taille du transcript est de 3.7kb et la protéine produite est un récepteur transmembranaire de 933 acides aminés.



**Figure 9:** Locus du gène *FLT3* (NCBI)

### 6. *FLT3* et leucémies:

Le récepteur *FLT3* est exprimé d'une façon très importante dans différentes hémopathies malignes, suggérant qu'il joue un rôle prépondérant dans la prolifération et la survie des cellules leucémiques. Au cours des dernières années, il a été montré que des mutations activatrices du gène *FLT3* sont les anomalies génétiques les plus communes dans la LAM et elles ont un impact conséquent sur le pronostic [86].

Les altérations génétiques du *FLT3* peuvent causer une activation constitutive, non contrôlée du récepteur tyrosine kinase dans les blastes, caractérisée par la dimérisation du récepteur ligand-indépendant : cette activation est directement impliquée dans la leucémogénèse [87].

Les premières mutations du *FLT3* ont été décrites en 1996 par Nakao *et al* [88]. L'anomalie la plus fréquente est une duplication en tandem (*FLT3*-ITD) de 3 à plus de 400 acides aminés localisés dans les exons 14 et 15 codant pour le domaine juxta-membranaire, elle est la plus fréquente et selon la littérature elle est trouvée à une fréquence de 25-30% chez les patients adultes LAM à caryotype non déterminé et de 28-30% chez les patients à caryotype normal[89].

En 2001, une deuxième mutation est retrouvée dans le récepteur *FLT3* [90], c'est le remplacement d'un résidu acide aminé dans le domaine tyrosine kinase (TKD). Ces substitutions sont causées par des mutations faux-sens au niveau de l'exon 20, impliquent le codon de l'acide aspartique 835. Au moins cinq substitutions différentes ont été identifiées

touchant ce codon : la plus fréquente est la D835Y qui est le résultat d'une substitution GAT >TAT changement de l'acide aspartique (D) en tyrosine (Y), puis la D835H GAT > CAT changement en Histidine (H), la D835V GAT > GTT changement en valine (V), la D835E GAT > GAG changement en glutamate (E) et la D835N GAT > AAT changement en asparagine (N). D'autres mutations dans le codon 835 ont été décrites telles que les délétions mais ces dernières sont très rares [91] FLT3-ITD et FLT3-TKD sont rarement associées. Ces mutations vont entraîner dans la cellule leucémique une phosphorylation constitutive du récepteur et une activation des voies de signalisation en aval notamment des voies Pi3K/AKT et JAK2/STAT5, provoquant une augmentation de la survie et de la prolifération des cellules blastiques. Les mutations du FLT3 sont plus fréquemment retrouvées dans les LAM de novo et les LAM à caryotype normal et sont souvent associées à un mauvais pronostic [89].

## II. La protéine NPM1 :

### 1. Généralités:

La nucleophosmine (*NPM1*), également appelée B23 ou numatrin [92], fait partie de la superfamille des protéines nucléophosmine/nucléoplasmine rencontrées dans tout le règne animal. Cette famille de protéines comporte 4 groupes : *NPM1-NPM2-NPM3* et une forme NPM-like qui est une forme spécifique des invertébrés.

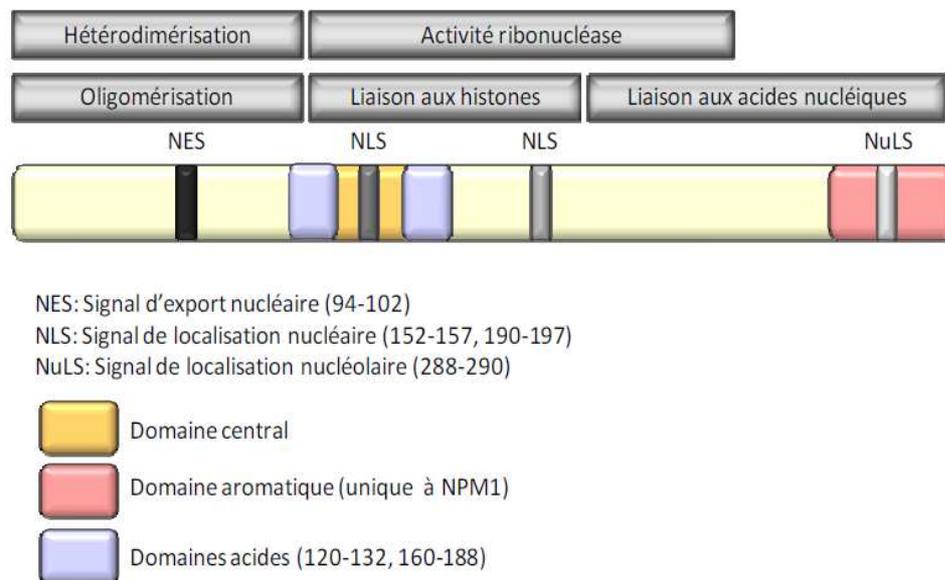
Cette protéine est exprimée de façon ubiquitaire à l'intérieur de la cellule, à la fois dans le nucléole, le noyau et le cytoplasme et possède la capacité de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme [93]. L'isoforme NPM1.1, renommée par la suite NPM1, est la forme la plus abondante et possède une localisation majoritairement nucléolaire. Cette protéine est composée de 294 acides aminés et est d'un poids moléculaire de 35-40 KD [94].

### 2. Structure :

La protéine *NPM1* est une protéine multi-domaines comprenant dans sa région hydrophobe amino-terminale un domaine d'oligomérisation très conservé au cours de l'évolution. Il lui permet de se lier à d'autres protéines par des interactions apolaires, ce qui lui confère des propriétés thermostables, indispensables pour son activité de chaperonne moléculaire. En effet, cette propriété lui permet d'empêcher le repliement et l'agrégation de ces protéines cibles à de fortes températures [95]. Ce domaine contient également un signal d'export nucléaire (NES), riche en leucine, au niveau des acides aminés 42 et 49. Ces résidus vont être la cible du récepteur d'export nucléaire CRM1 (*chromosome maintenance region 1*)

[96]. Ce domaine N-terminal est suivi de régions acides, dans la portion centrale de la protéine, requise pour une liaison aux histones et un assemblage efficace des nucléosomes. Les fonctions biologiques de ces régions acides sont peu connues, mais il semblerait qu'elles aient un rôle crucial dans la neutralisation des charges positives des protéines basiques telles que les histones et les protéines ribosomales du nucléole [97]. De plus, ce domaine central est important dans l'activité ribonucléasique de *NPM1* en synergie avec les segments basiques du domaine carboxy-terminal.

Enfin, il contient la séquence de localisation nucléaire (NLS). Dans la partie C-terminale de la protéine se trouve le domaine de liaison aux acides nucléiques, ainsi que deux résidus tryptophanes en position 288 et 290 qui composent le signal de localisation nucléolaire (NuLS) [98].



**Figure 10 :** Organisation structurale et fonctionnelle des domaines constituant la protéine *NPM1* [99]

### 3. Fonction de la *NPM1* :

*NPM1* exerce un rôle dans l'embryogénèse et plus particulièrement dans le développement du cerveau antérieur et la mise en place de l'hématopoïèse. Il semble que l'absence totale de la *NPM1* engendre la létalité des embryons suite à une déficience de l'organogénèse du cerveau antérieur et des déficiences dans l'approvisionnement sanguin du sac vitellin, permettant la nutrition de l'embryon. Le nombre d'ilots sanguins, sièges du début de l'hématopoïèse, est diminué et la quantité de précurseurs de l'hématopoïèse présents dans ces

ilots est fortement réduite, de même que leurs capacités à se différencier en divers lignages cellulaires [100].

### **3.1. Rôle dans le cycle cellulaire :**

*NPM1* exerce un rôle important dans le déroulement correct du cycle cellulaire, en favorisant la duplication des centrosomes en se fixant sur ces derniers assurant un verrouillage de leurs deux centrioles. Cette duplication doit être coordonnée à la réplication de l'ADN afin de permettre l'établissement correct du fuseau mitotique et le bon alignement des chromosomes au niveau du fuseau [101].

### **3.2. Rôle dans l'organisation de la chromatine et la transcription génique :**

*NPM1* possède également une activité chaperonne d'histone. Elle participe à l'assemblage des nucléosomes et à la relaxation de la chromatine ce qui favorise a terme la transcription génique, elle se lie préférentiellement aux histones H3 et H4 [102].

*NPM1* peut également réguler la transcription génique en interagissant directement avec des facteurs de transcription. Tout d'abord, *NPM1* régule la transcription génique par la liaison au régulateur positif et inhibiteur de l'ARN polymérase II [103]. Ensuite, l'interaction de *NPM1* avec le facteur de transcription c-myc facilite également la transcription génique par l'ARN polymérase II, et permet ainsi l'activation de gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose [104]. Enfin, en fonction des facteurs de transcription avec lesquels elle va interagir, *NPM1* va être soit assimilée a un co-activateur, soit a un corépresseur [105].

### **3.3. Rôle dans la biogénèse des ribosomes :**

*NPM1* possède de nombreuses caractéristiques permettant son implication dans la biogénèse des ribosomes et/ou leur assemblage. En effet, la *NPM1* a les capacités de passage nucléo-cytoplasmique, facilitant la circulation entre les sites de transcription de l'ARN ribosomal et l'assemblage des ribosomes [95]. Ces caractéristiques contribuent à la capacité de traiter des molécules d'ARN, et d'interagir avec la protéine ribosomale L5 pour stimuler l'exportation nucléaire de l'ARN ribosomal 5S et son incorporation dans les sous-unités ribosomiales 60S [106].

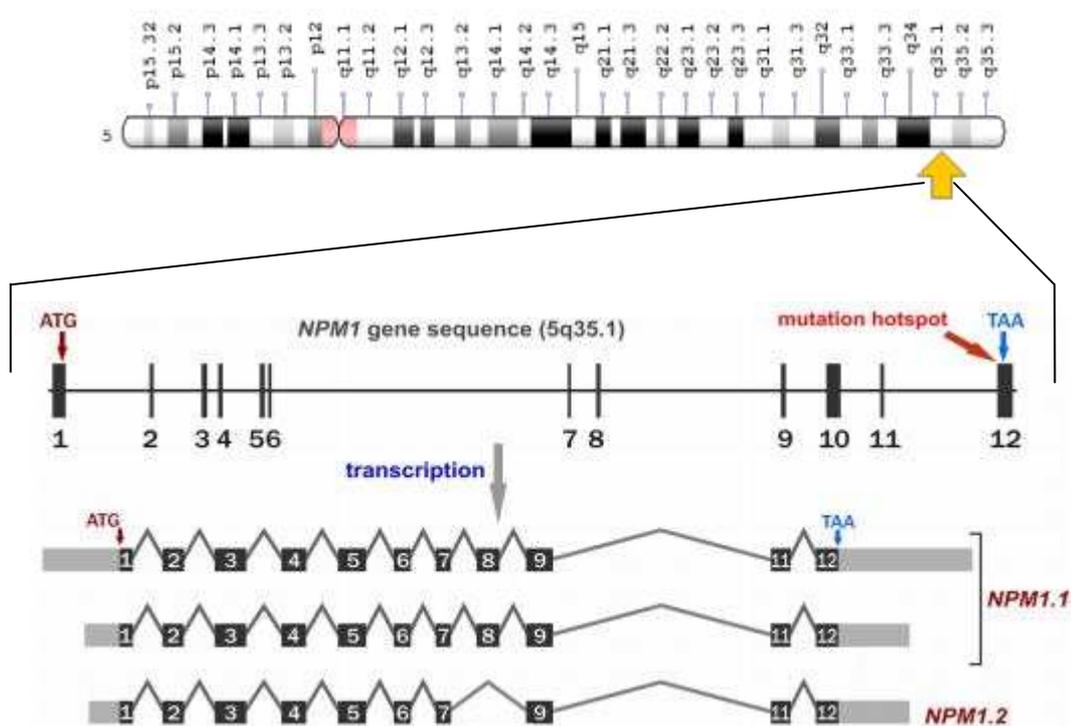
Enfin, la *NPM1* agit comme un chaperon moléculaire, permettant la préservation de l'activité enzymatique au cours de la dénaturation, et l'inhibition de l'agrégation des protéines. Cela donne un rôle important de la *NPM1* dans la coordination de l'assemblage d'un grand

nombre de protéines nécessaires à la biogenèse des ribosomes et de contribuer ainsi à la croissance et à la prolifération des cellules.

#### 4. Le gène *NPM1* :

Chez l'homme, le gène *NPM1* qui code pour la protéine est localisé sur le bras long du chromosome 5 au niveau de la région 35.1 (13q35.1) et composé de 12 exons, le *NPM2* sur le chromosome 8p21.3 et le *NPM3* sur le chromosome 10q24.31 [107,108].

Le gène *NPM1* débute au niveau de 171, 387,116 pb jusqu'à 171,410,884 ((Homo sapiens Annotation Release 109, GRCh38.p12 NCBI).



**Figure 11:** Locus du gène *NPM1* et les variants transcrits (NCBI)

#### 5. *NPM1* et hémopathies malignes :

Les altérations de *NPM1* observées peuvent résulter d'une augmentation de son expression ou encore des modifications de son gène telles que des délétions, des translocations ou des mutations, retrouvées le plus souvent dans les tumeurs hématopoïétiques.

Le chromosome 5, et plus spécifiquement le locus 5q35, qui porte le gène codant pour *NPM1* est le siège de délétions dans le cas de syndromes myélodysplasiques (MSD) *de novo*

et de leucémies. La délétion de la région 5q35 est également retrouvée dans certaines tumeurs solides comme dans le cancer du poumon non à petites cellules [109].

Outre les délétions, les translocations génomiques impliquant le chromosome 5 et entraînant souvent une perte de l'allèle fonctionnel du gène, sont régulièrement associées aux maladies hématopoïétiques comme les lymphomes et les leucémies [110]. La région génique codant pour la partie amino-terminale de la *NPM1* est alors associée à différents gènes partenaires. La translocation la plus retrouvée, dans 75% des lymphomes anaplasiques à grandes cellules (ALCL : *Anaplastic Large Cell Lymphoma*) est la t(2 ;5) (p23 ;q35) qui entraîne la fusion du gène *NPM1* avec le gène *ALK* (*Anaplastic Lymphoma Kinase*) [111]. *NPM1* confère, une activité constitutive à *ALK*, normalement inactif dans les cellules lymphoïdes, ce qui entraîne un rôle oncogénique de *ALK* [112].

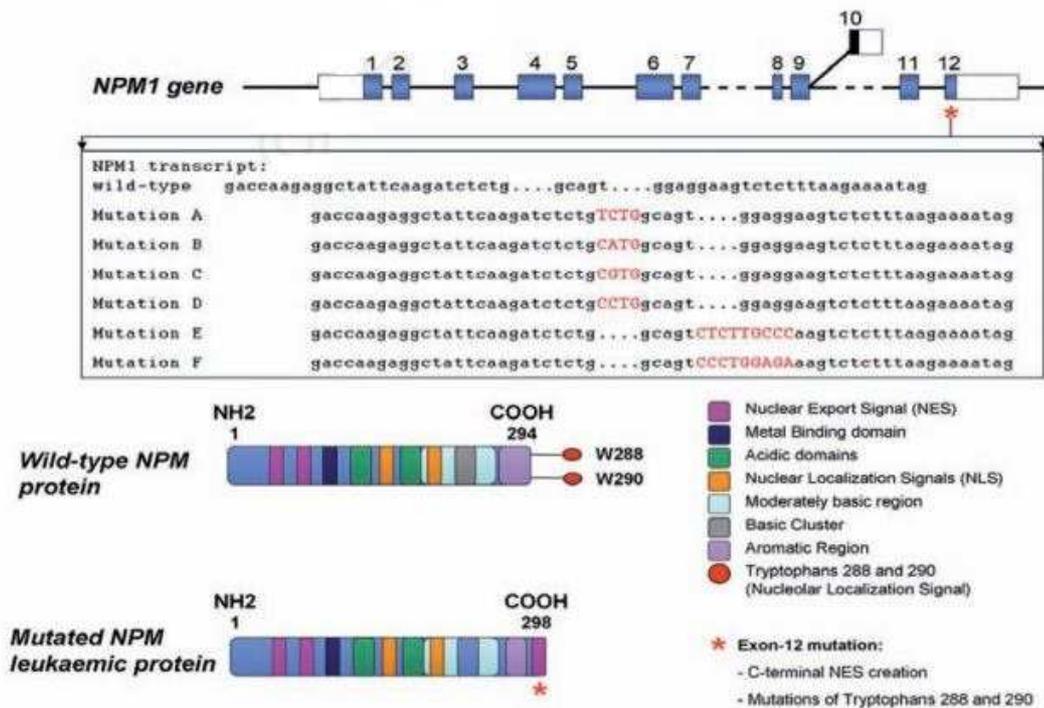
Bien que plus rare, une autre translocation possible de *NPM1* est la t(5 ;17)(q35 ;q12) qui provoque la fusion de *NPM1* avec le récepteur aux acides rétinoïdes (*RAR $\alpha$* ). Cette translocation est retrouvée majoritairement dans les leucémies promyélocyaires aiguës (LAP). Cette fusion altère la différenciation myéloïde au stade promyélocyte. Elle peut également perturber d'autres fonctions biologiques, indépendantes de la fonction transcriptionnelle de *RAR $\alpha$* , l'homo et l'hetero-oligomérisation de *NPM1* entraînant son changement de localisation et pouvant modifier les fonctions de *RAR $\alpha$*  sauvage et endogène [113].

Une autre translocation dans les syndromes myélodysplasiques est la t(3 ;5)(q25 ;q35) conséquence de la fusion du gène *NPM1*, dans sa partie 5', avec le gène *MLF1* (*Myelodysplasia-Myeloid Leukemia Factor 1*). *MLF1*, normalement localisé au niveau du cytoplasme, se retrouve, lors de la fusion *NPM1-MLF1*, localisé dans le noyau et plus fortement dans le nucléole dans les cellules de leucémies myéloïdes. Cette localisation anormale interfère avec l'activité de *MLF1* et altère sa capacité à contrôler l'érythropoïèse et le cycle cellulaire [114].

Dans le cas de cellules normales, *NPM1* peut faire la navette entre les différents compartiments cellulaires afin d'y exercer ses fonctions. Dans des cas de leucémies myéloïdes aiguës, *NPM1* est délocalisé dans le cytoplasme (*NPMc+*) suite à une mutation dans l'exon 12 entraînant un décalage du cadre de lecture dans sa partie carboxy-terminale [115].

Toutes les mutations *NPM1* chez les patients LAM se produisent dans l'exon 12. Jusqu'à présent, plus de 55 mutations uniques ont pu être identifiées et la majorité d'entre elles consistent à une insertion nette de quatre paires de base avec 95 % de mutations qui se produisent entre les nucléotides 960 et 961, cependant, il y a également eu des cas (5 %) qui

se produisent au niveau de 10 nucléotides en amont ou en aval de cette position [116]. Ces mutations entraînent la formation d'un motif NES et consécutivement la perte du motif NuLS. Le résultat de ces altérations est la délocalisation de *NPM1* dans le cytoplasme, la perte de ses interactions avec ses différents partenaires, ainsi que la délocalisation de l'ARF du nucléole ce qui conduit à sa perte d'activité. Ces mutations provoquent aussi la délocalisation des protéines *NPM1* sauvages endogènes dans le cytoplasme par effet trans-dominant positif [117].



**Figure 12:** Configuration du gène NPM1 non muté et les différentes mutations rencontrées dans les LAM et leur conséquence sur la protéine [118]

# Partie pratique

# Patients et méthodes

### **I- Patients :**

Le recrutement des patients s'est fait au sein du CHU (Centre Hospitalo-Universitaire) Ben Badis à Constantine, au niveau du service d'hématologie. Sur une période allant de Janvier 2015 à Décembre 2016.

Notre population d'étude comportait 80 patients atteints de leucémies aiguës. Les critères clinico-biologiques recueillis à l'initiation du traitement étaient le sexe, l'âge, la classification FAB, la classification OMS, la numération formule sanguine (FNS), la blastose médullaire et le caryotype conventionnel en cas de disponibilité.

Dans cette étude, les critères de recrutement des patients étaient les suivant

- Critère d'exclusion : hémopathies malignes autres que les leucémies aiguës.
- Critères d'inclusion : tous nos patients étaient atteints de leucémies aiguës myéloblastiques et lymphoblastiques. Les patients étaient des adultes. Les leucémies étaient primaires.

Tous nos patients ont été soumis à un questionnaire détaillé et chaque prélèvement sanguin requiert un consentement éclairé pour la participation à cette étude, nous autorisant à l'utilisation de leurs données clinico-biologiques et de leur matériel génétique (**annexe 5 et 6**).

### **II- Méthodologie :**

Les analyses hématologiques sont faites au niveau du service d'hématologie, l'analyse cytogénétique au niveau du laboratoire de biologie moléculaire et l'analyse moléculaire au niveau du laboratoire de médecine expérimentale de l'université d'Istanbul.

#### **1- Analyse hématologique :**

##### **1-1- *L'hémogramme :***

L'hémogramme est un examen automatisé qui a pour but d'apporter des informations quantitatives sur les cellules sanguines mais également des informations qualitatives.

##### **1-2- *Le myélogramme :***

C'est une ponction de la moelle osseuse effectuée au niveau du sternum ou des épines iliaques. Indispensable au diagnostic et au suivi des hémopathies, il permet d'analyser quantitativement et qualitativement la nature et le pourcentage des différentes lignées

cellulaires constituant le tissu hématologique. Il est indispensable pour confirmer le diagnostic et de typer la leucémie.

### **1-3- Immunophénotypage :**

L'examen immunologique des blastes par cytométrie de flux permet d'étudier l'expression de divers antigènes membranaires ou intra-cytoplasmiques. Cet examen est indispensable pour déterminer l'appartenance à une lignée donnée et apprécié le stade de différenciation des blastes, mais le plus important c'est le diagnostic et le classement des LAL, et dans quelques cas de LAM très indifférenciées cytologiquement. L'examen est effectué hors le CHU et les résultats nous sont fournis.

### **2- Analyse cytogénétique :**

Elle va permettre d'identifier des anomalies chromosomiques de nombre ou de structure et aussi de déterminer des translocations qui seront la clé d'une classification précise des différents types des leucémies aiguës.

Après prélèvement du sang (2ml) dans des tubes stériles sur héparine de sodium, on procède à une culture cellulaire avec un milieu de culture tel que le RPMI1640 en lui ajoutant d'autres composants nécessaires pour la multiplication et la conservation des cellules sanguines. Cette culture va durer 72h à 37°C. Après la multiplication cellulaire, on procède à un arrêt de mitoses en ajoutant la colchicine et ensuite les cellules sont soumises à un choc hypotonique par ajout de Kcl pour les faire éclater et récupérer les chromosomes.

L'étape suivante sera la fixation des chromosomes par le Carnoy acétique qui se fait sur deux temps, suivie par un étalement de chromosomes sur les lames et une dénaturation à la chaleur et enfin une coloration au Giemsa pour pouvoir les visionner sur microscope optique (les détails de cette technique sont dans l'**annexe 7**).

**3- Analyse moléculaire :** Elle présente la pierre angulaire de notre étude. Elle a concerné seulement les patients atteints des LAM (n=60) et elle comporte trois parties :

- La recherche de la duplication du gène *FLT3-ITD*.
- La recherche de la variation TKD (D835).
- L'analyse de l'exon 12 du gène *NPM1*.

### **3-1- Extraction d'ADN :**

Nos prélèvements sanguins ont été effectués dans des tubes à EDTA de 5ml. Nous avons procédé dans notre étude à l'extraction d'ADN par la technique « SALTING OUT »,

qui est une technique non couteuse, simple et rapide et qui a été développée par Miller et ses collaborateurs [119].

La technique « SALTING OUT » consiste en un relargage des protéines cellulaires, par déshydratation et précipitation avec une solution saturée de chlorure de sodium NaCl.

Le sang doit être initialement vigoureusement mélangé à une solution hypotonique pour faire éclater les globules rouges par une solution TE20 :5 (Tris 20 mM pH7.5/ MgCl<sub>2</sub> 5 mM SDS à 10 %). Le lysat est centrifugé et, après élimination du surnageant, le culot cellulaire contenant les leucocytes est traité par une solution de lyse des globules blancs (NaCl 400mM, EDTA 2mM, Tris 10mM, pH 8.2) et une solution de protéinase. La protéinase K digère les protéines cellulaires puis soumis à une centrifugation. Ces dernières seront par la suite relarguées par l'intermédiaire d'une force ionique du NaCl (4 M) et de la centrifugation. Enfin, la précipitation de l'ADN génomique est effectuée en utilisant une solution d'éthanol absolu à froid (-20 °C) (**annexe 8**)

### **3-2- Mesure de la concentration de l'ADN:**

La concentration des ADN extraits est estimée par la mesure de l'absorbance à 260nm. Sachant qu'une unité de DO à 260nm est équivalente à 50 µg /ml d'ADN, il est possible d'évaluer la quantité d'ADN d'un échantillon par la formule: facteur de dilution x 50 x DO<sub>260</sub>. Par ailleurs, la qualité de l'ADN est évalué par un rapport de DO 260/DO 280 ADN de bonne qualité, dépourvue de contamination protéique doit présenter un rapport compris entre 1,5 et 2. L'estimation de la concentration de l'ADN est déterminée selon la formule suivante :

1 unité de DO<sub>260</sub> nm on a 50 µg / ml d'ADN

N unités de DO 260nm × N µg / ml d'ADN

[C d'ADN] (µg / ml) = Facteur de dilution x DO 260 nm x 50µg / ml

Facteur de dilution = volume total / volume d'ADN

Pour confirmer la concentration et la pureté de l'ADN, on a aussi utilisé le NanoDrop<sup>®</sup> (Thermo Scientific Nanodrop<sup>®</sup> 2000/2000c) qui est un spectrophotomètre à UV. Cet appareil permet de déterminer la pureté de notre ADN, on considère que : l'ADN est suffisamment pur lorsque le rapport R = DO 260/280 est compris entre 1,6 et 2 (1,6 < R ≤ 2), l'ADN est contaminé par les protéines si R < 1,6 et que l'ADN est contaminé par les ARN si R > 2.

La concentration de l'ADN est donnée directement en ng par  $\mu\text{l}$ . Cette concentration doit être idéalement supérieure à 50 ng/ $\mu\text{l}$  pour optimiser les résultats de la PCR longue et du séquençage.

Pour la réalisation des techniques de biologie moléculaire mentionnées précédemment sur notre population d'étude et pour enrayer de possibles biais que peuvent induire des volumes de prises trop faibles (source d'erreurs), nous avons procédé au préalable à des dilutions de nos échantillons d'ADN au  $\approx 100$  ng/ $\mu\text{l}$  dans de l'eau distillée. La concentration ainsi que les rapports 260/280 et 260/230 sont remesurés de nouveau sur le Nanodrop®.

### 3-3- Analyse moléculaire du FLT3 :

La Polymérase Chain Réaction est une technique de biologie moléculaire (Mullis 1985) consiste à utiliser deux amorces oligonucléotidiques de synthèse de 20 à 25 nucléotides complémentaires des extrémités 3' des deux brins d'ADN encadrant la séquence à amplifier. Une de ces amorces est une copie du brin codant et l'autre, une copie du brin non codant. Sous l'action d'une enzyme (Taq polymérase), chaque amorce est allongée dans le sens 5'  $\rightarrow$  3' d'une séquence exactement complémentaire du brin recopié.

Une réaction de PCR correspond à la succession d'une trentaine de cycles comportant chacun 3 étapes :

- Une étape de dénaturation de l'ADN ;
- Une étape d'hybridation des amorces sur les séquences d'ADN cible ;
- Une étape d'extension des amorces par l'ADN polymérase.

#### 3-3-1 Préparation de la PCR du FLT3-ITD :

La recherche de cette duplication est effectuée au niveau de l'exon 14 et 15 du gène *FLT3* (OMIM : 136351). Pour cela on a utilisé les amorces suivantes :

**Tableau 2:** Les amorces (F) et (R) utilisées d'exons 14-15 du gène *FLT3*

Amorce	Séquence (5' $\rightarrow$ 3')	Taille de l'amplicon (pb)
14 (F)	<u>GCAATTTAGGTATGAAAGCCAGC</u>	389
15 (R)	CTTTCAGCATTTTGACGGCAACC	

Les réactifs utilisés pour la préparation du milieu réactionnel de la PCR ainsi que les quantités nécessaires pour chaque tube sont mentionnées dans le tableau 4. La préparation du milieu réactionnel de la PCR se fait à température ambiante.

**Tableau 3:** Composition du milieu réactionnel de PCR pour l'amplification des exons 14 et 15 du gène *FLT3*

Protocole du FLT3 ITD			
Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume (µl)
H2O			16.8
Tampon (-MgCl <sub>2</sub> )	10X	1X	2.5
MgCl <sub>2</sub>	2.5mM	2.5mM	2
dNTPs	25mM	10mM	0.5
Oligo F	100mM	10mM	0.5
Oligo R	100mM	10mM	0.5
Taq polymérase (Fermentas®)	5U/µl	1U	0.2
ADN		50ng	2
<b>Total</b>			25

La réaction d'amplification est réalisée dans des plaques de PCR avec un thermocycleur (BIO-RAD® iCycler) avec les conditions suivantes :

**Tableau 4:** Programme du thermocycleur pour l'amplification de l'exons 14-15 du gène *FLT3*

Processus	Température (°C)	Temps	Nombre de cycles
<b>Dénaturation initiale</b>	94	4 minutes	1
<b>Dénaturation</b>	94	30 secondes	35
<b>Hybridation</b>	56	30 secondes	
<b>Élongation</b>	72	1 minute	
<b>Élongation finale</b>	72	10 minutes	1

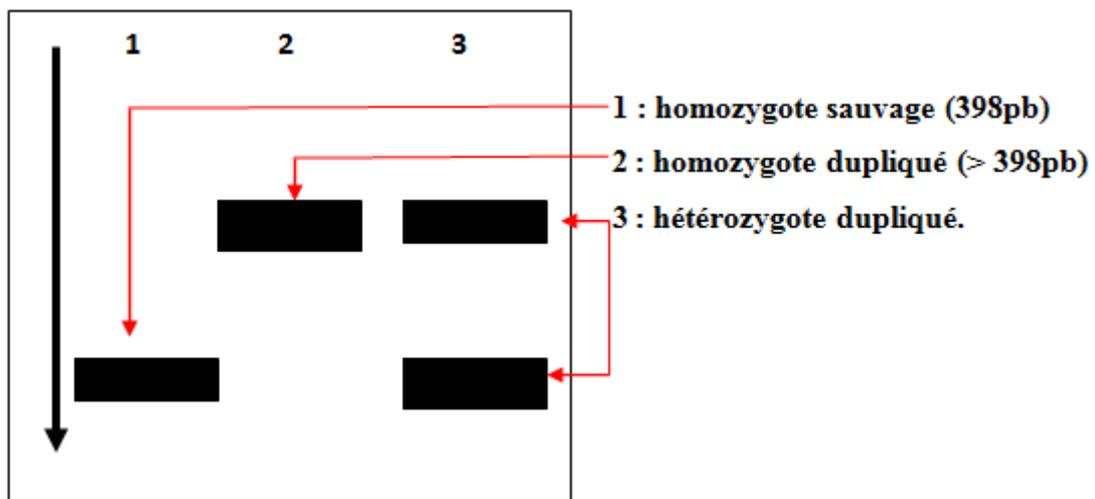
**Observation des produits de PCR :**

Le contrôle de la taille des fragments amplifiés s'effectue par une électrophorèse sur un gel d'agarose à 3 % (3 g d'agarose + 100 ml TBE 1X) additionné a 10 µl de BET (Bromure d'éthidium). Dans le premier puits, on dépose 3 µl de marqueur de taille (PM 100pb LADDER) + 10µl H2O + 2µl BBP. Puis, on mélange 10 µl de produit d'amplification + 3 µl

BBP (Bleu de Bromophénol) ([Tris 0.5M : 2ml + Glycérol : 5ml à PH 7.5] Qsp 10 ml H<sub>2</sub>O) qui permet de suivre le front de migration, et on les dépose dans chaque puits. Les dépôts se font du côté cathode (-). Le système soumis à une migration sous un courant de 80 volts pendant 20-30 min. Cette analyse permet aussi, d'observer si une éventuelle contamination de l'ADN survenue au cours de la PCR.

Après la migration, le gel est soumis au rayon UV. Les molécules de bromure d'éthidium fixées aux ADN émettent une lumière visible et photographiable et permettent de visualiser les fragments amplifiés sous forme de bandes fluorescentes de même taille.

Le schéma ci-dessous représente les profils attendus :



**Figure 13:** Les profils attendus de la PCR du FLT3-ITD

**3-3-2 Préparation de la PCR-RFLP du FLT3-TKD :**

La recherche de la mutation TKD et plus précisément de la mutation D835 s'effectue à travers le polymorphisme de longueur de fragment de restriction (RFLP).

Les amorces utilisées sont décrites dans le tableau ci-dessous :

**Tableau 5:** Les amorces (F) et (R) utilisées pour l'amplification de l'exon 20 du gène *FLT3*

Amorce	Séquence (5'→3')	Taille de l'amplicon (pb)
20 (F)	CCAGGAACGTGCTTGTC	
20 (R)	TCAAAAATGCACCACAGTGAG	195

La composition du milieu réactionnel était la suivante :

**Tableau 6:** Composition du milieu réactionnel de PCR pour l'amplification de l'exon 20 du gène *FLT3*

Protocole du FLT3-TKD			
Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume (µl)
H2O			16.8
Tampon (-MgCl <sub>2</sub> )	10X	1X	2.5
MgCl <sub>2</sub>	2.5mM	2.5mM	2
dNTPs	25mM	10mM	0.5
Oligo F	100mM	10mM	0.5
Oligo R	100mM	10mM	0.5
Taq polymérase (Fermentas®)	5U/µl	1U	0.2
ADN		50ng	2
<b>Total</b>			<b>25</b>

Les conditions de la PCR étaient les suivantes:

**Tableau 7:** Programme du thermocycleur pour l'amplification de l'exon 20 du gène *FLT3*

Processus	Température (°C)	Temps	Nombre de cycles
<b>Dénaturation initiale</b>	95	5 minutes	1
<b>Dénaturation</b>	95	30 secondes	36
<b>Hybridation</b>	57	30 secondes	
<b>Élongation</b>	72	30 secondes	
<b>Élongation finale</b>	72	10 minutes	1

**Observation des produits de PCR :**

Pour observer les produits de la PCR, on procède comme décrit précédemment ; préparation du gel d'agarose 3%, déposition des produit amplifiés et puis observation.

### Digestion des produits de PCR du FLT3-TKD par l'enzyme de restriction :

Après le contrôle de PCR, les échantillons amplifiés sont soumis à une digestion par l'enzyme de restriction EcoRV1 issue de la bactérie Escherichia Coli. Cette enzyme reconnaît et clive une séquence palindromique spécifique qui est la suivante :

5'-GAT|ATC-3'

3'-CTA|TAG-5'

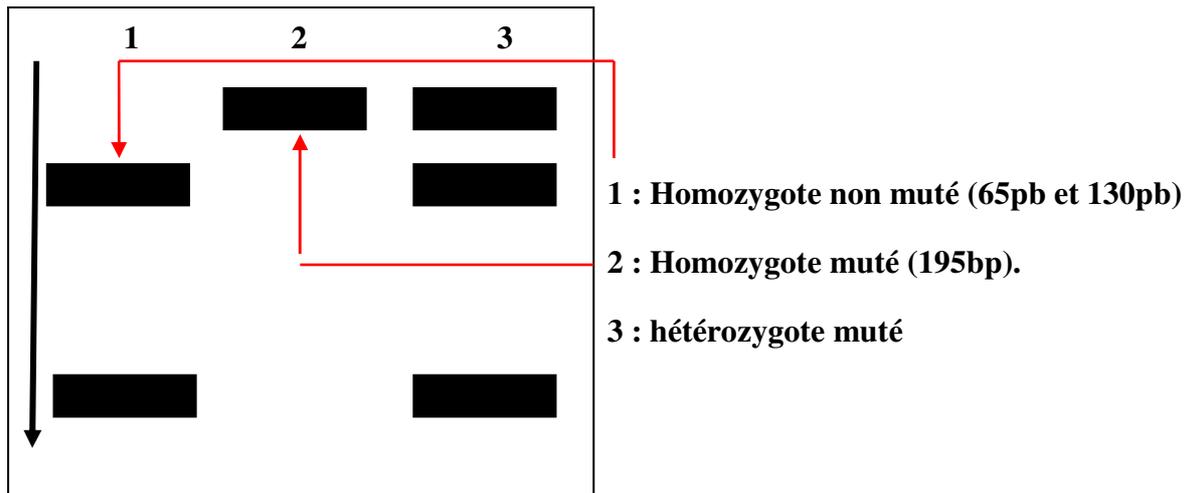
Le protocole de digestion était le suivant:

**Tableau 8:** Composition du milieu réactionnel pour la digestion avec l'EcoRV1

<b>FLT3-D853</b>	
<b>10X buffer</b>	02µl
<b>EcoRV</b>	01 µl
<b>dH2O</b>	17 µl
<b>Produit PCR</b>	10 µl
<b>Volume finale</b>	<b>30 µl</b>

Les échantillons sont incubés dans une étuve pendant toute une nuit à 37 ° C. Les produits digérés et les marqueurs d'ADN de différent poids moléculaires sont séparés sur un gel d'agarose (3% agarose/1xTBE gel), contenant 10µl du bromure d'éthidium.

La mutation TKD D835 est le changement du G du codon GAT, ce qui va empêcher l'enzyme de connaître le site de restriction. Les profils attendus sont les suivants :



**Figure 14:** Profil de restriction de la FLT3-TKD

Séquence	830	831	832	833	834	<b>835</b>	836	837	838	839	840
non mutée	Phe	Gly	Leu	Ala	Arg	<b>Asp</b>	Ile	Met	Ser	Asp	Ser
	5' TTT GGA TTC GCT CGA <b>GAT</b> ATC ATG AGT GAT TCC 3'										
Muté (D835Y)	Phe	Gly	Leu	Ala	Arg	<b>Tyr</b>	Ile	Met	Ser	Asp	Ser
	5' TTT GGA TTC GCT CGA <b>TAT</b> ATC ATG AGT GAT TCC 3'										

**Figure 15:** Séquences de nucléotides et d'acides aminés dans le cas sauvage et muté du gène *FLT3* (D835Y)

### 3-4- Le séquençage du gène *NPM1* :

#### 3-4-1 Amplification de l'exon 12 :

Pour une réaction de séquençage par la méthode de Sanger sur le gène de *NPM1* (OMIM : 164040), il est nécessaire de disposer, tout d'abord, d'une grande quantité de fragments à séquencer (amplicons) dans le but de rechercher des mutations au niveau de l'exon 12. Qui sont principalement la mutation type A qui est une duplication de TCTG en position c860-863, Type B –CATG insertion en position c863-864 et Type D –CCTG insertion en même position (**annexe 9**).

Les séquences des amorces (F) et (R) utilisées pour la PCR de l'exon 12 de *NPM1*.

**Tableau 9:** Les amorces (F) et (R) utilisées pour l'amplification de l'exon 12 du gène NPM1

Amorce	Séquence (5'→3')	Nucléotide de départ	Taille de l'amplicon (pb)
<b>12 (F)</b>	TGATGTCTATGAAGTGTGTGGT CC	471	186
<b>12 (R)</b>	CTCTGCATTATAAAA AGGACAGCCAG	656	

La réaction d'amplification est réalisée dans des plaques de PCR avec un thermocycleur (BIO-RAD® iCycler). Les réactifs utilisés pour la préparation du milieu réactionnel de la PCR ainsi que les quantités nécessaires pour chaque tube sont mentionnées dans le tableau ci dessous. La préparation du milieu réactionnel de la PCR se fait à température ambiante.

**Tableau 10:** Composition du milieu réactionnel de la PCR pour l'amplification de l'exon 12 de la *NPM1*.

Protocole du NPM1			
Réactifs	Concentration initiale	Concentration finale	Volume (µl)
<b>H2O</b>			13.25
<b>Tampon (-MgCl2)</b>	10X	1X	2.5
<b>MgCl2</b>	2.5mM	2.5mM	2.5
<b>dNTPs</b>	25mM	0.4 mM	0.4
<b>Oligo F</b>	100mM	5mM	2
<b>Oligo R</b>	100mM	5mM	2
<b>Taq polymérase (Fermentas®)</b>	5U/µl	1U	0.25
<b>ADN</b>		75ng	1.5
<b>Total</b>			25

Les conditions de la PCR sont les suivants:

**Tableau 11:** Programme du thermocycleur pour l'amplification de l'exon 12 du gène *NPM1*

Processus	Température (°C)	Temps	Nombre de cycles
<b>Dénaturation initiale</b>	95	10 minutes	1
<b>Dénaturation</b>	95	30 secondes	35
<b>Hybridation</b>	63	30 secondes	
<b>Élongation</b>	72	40 secondes	
<b>Élongation finale</b>	72	10 minutes	1

### 3-4-2 Migration sur gel d'agarose :

On vérifie la qualité des produits de PCR issus de l'amplification de l'exon12 par migration sur gel d'agarose à 3 % préparé avec du Bromure d'ETHidium (BET) (1 goutte par 100 ml). À 4 µl de produit de PCR on ajoute 3 µl de Bleu de Bromo-Phénol (BBP) (dilué au ½ dans le TBE (Tris-Borate-EDTA)1X). On dépose sur gel d'agarose et on applique un courant électrique de 80 V pendant 30 minutes en présence du marqueur de taille.

### 3-4-3 Purification des produits de PCR :

Avant de pouvoir séquencer notre amplicon, il est indispensable de purifier les fragments amplifiés en enlevant les restes des dNTP et d'amorces non incorporées. Pour la purification des produits de PCR, on a utilisé la méthode l'ExoSAP-IT<sup>®</sup>, fonctionnant sur le principe de « nettoyage enzymatique » au lieu de la méthode AMPure<sup>®</sup>.

Le réactif ExoSAP-IT est composé de 2 enzymes hydrolytiques, Exonuclease I et Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) et conçu pour le nettoyage simple et rapide de produits de PCR en amont d'applications telles que le séquençage ADN et l'analyse SNP. Lorsque l'amplification est terminée, l'ExoSAP-IT<sup>®</sup> élimine les résidus contaminants (dNTPs, ADN simple brin et amorces) restant dans le mélange, qui pourraient interférer avec ces méthodes.

Dans un tube contenant 2-4 µl le produit de PCR (selon la qualité de ce dernier), on ajoute 1µl d'exonuclease (10units/ul) et 1 µl de l'exoSAP-IT<sup>®</sup>. On vortex le mélange et on incube dans un thermo-cycler pendant 30min à 37°C. Après traitement, le réactif ExoSAP-IT<sup>®</sup> est

inactivé par un simple chauffage à 80 ° C pendant 15 minutes. La figure ci-dessous illustre le mode d'emploi de cette enzyme.

**3-4-4 La réaction de séquençage :**

Pour le séquençage de l'exon 12 de la *NPM1*, on prépare 2 plaques de séquences pour le (F) et le (R). La réaction de séquençage utilisée est une variante de la technique Sanger qui repose sur l'incorporation aléatoire par l'ADN polymérase de di-désoxyribo-Nucléotide Tri-Phosphates (ddNTP) dits "interrupteurs de chaîne" ou "Terminators" présents dans le milieu réactionnel.

On a utilisé la technique de BigDye<sup>®</sup> Terminator version 3.1 (Applied Biosystems<sup>®</sup>) pour notre réaction de séquençage. En fait, Il s'agit d'une réaction de PCR standard qui se fait sur un thermocycleur (BIO-RAD<sup>®</sup> iCycler) avec un milieu réactionnel particulier.

Les réactifs utilisés pour la préparation du milieu réactionnel de séquençage ainsi que les quantités nécessaires pour chaque tube sont mentionnées dans le tableau ci-dessous. La préparation de ce milieu réactionnel se fait à température ambiante.

**Tableau 12:** Composition du milieu réactionnel pour le séquençage de l'exon12 du gène *NPM1*

Réactifs	Quantité
BigDye v.3.1	2 µl
Buffer 5X	2 µl
Primers (2pmol/ µl) F	2 µl
R	2 µl
Produit de PCR purifié	1-4* µl
H2O ARN/ ADN free	-- µl
<b>Total</b>	10 µl
<b>* La quantité dépend de la qualité de notre produit de PCR.</b>	

Les conditions de cette manipulation sont :

**Tableau 13:** Programme du thermocycleur pour la réaction de séquençage.

Processus	Température (°C)	Temps	Nombre de cycles
<b>Dénaturation initiale</b>	96	1 minute	1
<b>Dénaturation</b>	96	10 secondes	35
<b>Hybridation</b>	50	05 secondes	
<b>Élongation</b>	60	40 secondes	

**3-4-5 Purification des produits de séquençage :**

Une fois la réaction de séquençage terminée, on procède à la purification des produits de séquençage en utilisant la méthode de précipitation avec l'éthanol/EDTA (sachant qu'il existe d'autres techniques de purification tels que le Big Dye XTerminator kit ou les plaques Centri-Sep™). Le protocole suivant dure environ 90 minutes.

On commence d'abord par préparer une solution de 125mM d'EDTA à partir de 0.5M EDTA, pH8.0. On centrifuge brièvement les plaques de séquençage pendant 5 à 10 sec à 1.000t/m, ensuite on ajoute les réactifs suivants par ordre : 1 µl d'EDTA 125mM, 1 µl de NaOAc 3M (jouant le rôle de tampon pour maintenir le pH du milieu) et 25 µl d'éthanol 100%. Une fois tous les réactifs ajoutés on couvre les plaques pendant 2 à 3 sec et puis on centrifuge brièvement de 5-10 sec à 1.000t/m. L'étape suivante est l'incubation à température ambiante pendant 15 min, et on centrifuge pendant 15 min à 14000 t/m. à la fin de cette centrifugation on jette le surnageant et on garde la pelote, au quelle on ajoute 35 µl d'éthanol 70% et on centrifuge à 14000 t/m pendant 5 min et puis on jette le surnageant et on garde la pelote qui contient les produits de séquençage purifiés.

**3-4-6 Séquençage des plaques sur l'appareil :**

La dernière étape de notre séquençage est la lecture des séquences par électrophorèse capillaire qui se fait sur un séquenceur 3500/3500xL DNA Analyzer (Applied Biosystems®) (guide d'utilisation (Pub. No. 100031809)). Les résultats de l'analyse sont formulés dans des fichiers (.ab1) et ce pour chaque séquence. L'analyse des résultats ainsi obtenus se fait en utilisant le logiciel CLC main workbench® V5.5 (QIAGEN Company).

Après lecture des séquences d'intérêt, la comparaison est effectuée avec une séquence de référence de la région d'intérêt tirée de banques de données sur internet : NCBI (National Center for Biotechnology Information) ou Ensembl Genome Browser.

### **III- Traitement et critères de réponse:**

Les patients recrutés ont tous reçu le même protocole de traitement mentionné précédemment et qui suit le protocole CALGB 9621.

Selon le service d'hématologie du CHU, le traitement consistait en une chimiothérapie d'induction (3+7) : selon le service d'hématologie, le protocole était composé d'Aracytine 3g/m<sup>2</sup> intra-veineuse pendant 7 jours et de Cerubidine 90 mg/m<sup>2</sup> pendant 3 jours puis suivi par ponction de moelle osseuse. Cette cure est suivie par un traitement post-rémission (une cure de consolidation) où le patient reçoit de l'Ara-C 12 g/m<sup>2</sup> IV pendant 3 jours. Au total le malade peut recevoir jusqu'à 4 cures de consolidation.

L'évaluation de la réponse au traitement était réalisée après 4 semaines de thérapie d'induction au niveau du service d'hématologie. Pour cela, il fallait une réévaluation de la FNS, la blastose médullaire (myélogramme) et les besoins transfusionnels chez chacun des patients.

Le tableau suivant décrit les critères de définitions des différentes réponses :

**Tableau 14:** Critères de définitions des événements.

Catégorie	Critères de réponse
<b>Rémission complète</b>	- Blastos médullaire $\leq 5\%$ avec maturation normale (la présence de signes de dysplasie doit être signalée si elle persiste).
<b>CR</b>	Hémogramme : <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Hb <math>\geq 11</math> g/dl</li> <li>➤ Plaquettes <math>\geq 100000/mm^3</math></li> <li>➤ Polynucléaires neutrophiles <math>\geq 1000/mm^3</math></li> <li>➤ Absence de blastos circulants.</li> </ul>
<b>Rémission partielle (PR)</b>	Critères identique à CR mais : Blastose médullaire diminuée de plus de 50% par rapport au bilan initial et cependant $\geq 5\%$
<b>Rémission médullaire avec ou sans amélioration hématologique (HI)</b>	Blastos médullaires $\leq 5\%$ et diminutions de plus de 50% par rapport au bilan initial, mais persistance de cytopénie. En cas d'amélioration des cytopénies (ne correspondant pas aux critères de RC ou RP) celle-ci sera notée, en plus.
<b>Maladie stable (SD)</b>	Impossibilité d'obtenir au moins une amélioration hématologique significative sur une lignée mais absence de progression sur une période d'au moins 8 semaines.
<b>Maladie en progression</b>	Augmentation des blastos de plus de 50% et $\geq 30\%$ Diminution $\geq 50\%$ du taux de neutrophiles ou de plaquettes par rapport à celui obtenu de la rémission ou de la réponse. Diminution du taux d'Hb $\geq 2$ g/dl ou réapparition d'une dépendance transfusionnelle.

Dans notre étude, la rémission complète a été déterminée comme décrit dans le tableau ci-dessus. La survie globale OS était définie comme étant le temps à partir du 1<sup>er</sup> jour du diagnostic jusqu'au décès de l'individu, ce décès peut être pendant la cure d'induction ou après la 1<sup>ère</sup> rémission, les patients qui n'ont pas donné de nouvelle à notre dernier contrôle ont été classés comme étant décédés. L'EFS a été définie à son tour comme étant le temps à partir du 1<sup>er</sup> jour du diagnostic jusqu'à l'apparition d'un événement qui peut être l'échec d'atteindre une rémission complète, décès pendant la 1<sup>ère</sup> rémission complète ou une rechute.

#### **IV- Analyse statistique :**

Les résultats obtenus ainsi que les critères biologiques des patients ont été analysés par des tests statistiques conventionnels qui permettent de déterminer une possible association entre un marqueur moléculaire et les LAMs. Cette association entre un marqueur génétique et la maladie est attribuée par la recherche d'une distribution significative des fréquences de ce marqueur entre les patients mutés et non mutés.

Les données ont été analysées en utilisant le programme statistique SPSS (version 20.0). Les paramètres quantitatifs sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart-type et les paramètres qualitatifs par l'effectif suivi du pourcentage.

Les tests utilisés sont les suivants :

- 1- **Le test Khi2 de Pearson** : s'applique à des variables nominales et ordinales comportant un nombre restreint de catégories. Il permet d'estimer si la différence de distribution est due au hasard ou à l'effet du marqueur étudié dans le développement de la maladie. Dans le cas où on a un nombre très réduit d'effectif on utilise le test exact de Fisher.
- 2- **Le test-t de Student** : il permet de comparer les moyennes de deux séries de mesures faites sur les mêmes unités statistiques. On l'utilise pour calculer la différence des caractéristiques biologiques entre les deux groupes mutés et sauvage.
- 3- **Le test ANOVA** : l'analyse de variance permet de comparer les moyennes de différentes caractéristiques biologiques entre plusieurs groupes.
- 4- **Estimation de la fonction de survie avec le Kaplan-meir** : c'est un estimateur qui permet de calculer la fonction de survie des patients d'après des données de durée de vie et générer des courbes de survie de la population d'étude.

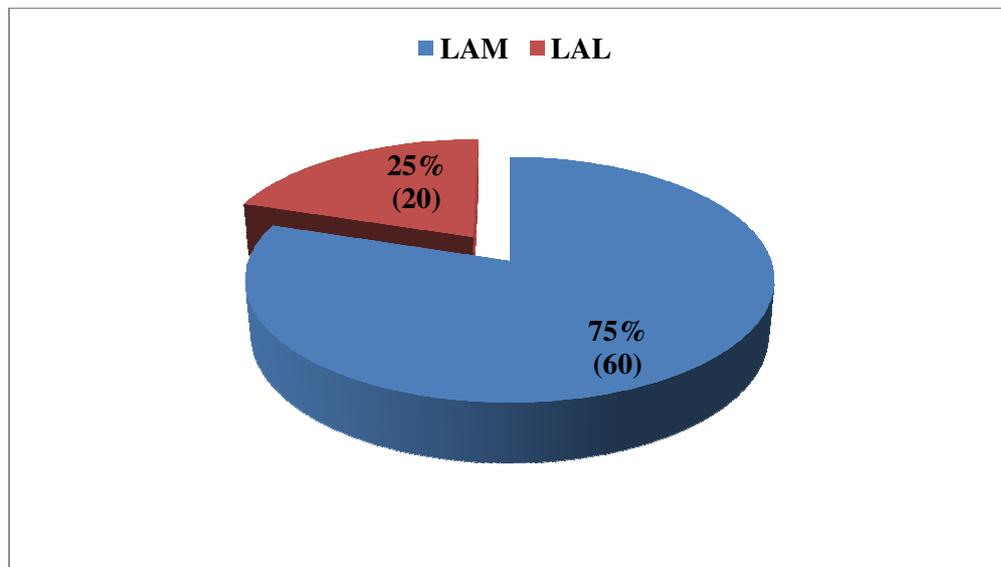
**Le test Log-rank** : permet ce genre de comparaison et teste l'hypothèse nulle d'égalité des probabilités de survie entre 2 études de survie. L'intérêt de l'évaluation d'une courbe de survie est de pouvoir la comparer avec une autre courbe afin de pouvoir porter un jugement sur l'espérance de survie de la population sauvage et la population mutée.

Résultats  
et  
Discussions

Notre étude avait pour objectif en premier temps, la description des caractéristiques biologiques et cliniques des patients adultes atteints de leucémie aigue myéloïde et lymphoïde, en 2<sup>ème</sup> temps, l'investigation des variations moléculaires des deux gènes les plus mutés chez les patients adultes LAM et enfin, la mise en évidence des facteurs pronostiques cliniques et moléculaire et l'évaluation de leur impact sur la réponse au traitement et la survie de ces patients.

### I. Analyse descriptive de la cohorte :

Le recrutement des patients a été effectué sur l'ensemble des individus présentant une leucémie aigue à savoir, les LAL et les LAM. Les paramètres clinico-biologiques ont été prospectés pour chaque patient. Au total, 80 patients sont répertoriés dans cette étude : 20 d'entre eux sont atteints de LAL et 60 de LAM.



**Figure 15:** prévalence des LAM et les LAL

Les leucémies tous types confondus sont des hémopathies malignes rares, elles sont placées à l'échelle mondiale au 11<sup>ème</sup> rang selon GLOBOCAN 2012, quand en Algérie, leur incidence les place au 7<sup>ème</sup> rang avec une fréquence de 4% [64]. Cette différence d'incidence serait éventuellement due à un biais d'enregistrement des cas à travers le pays.

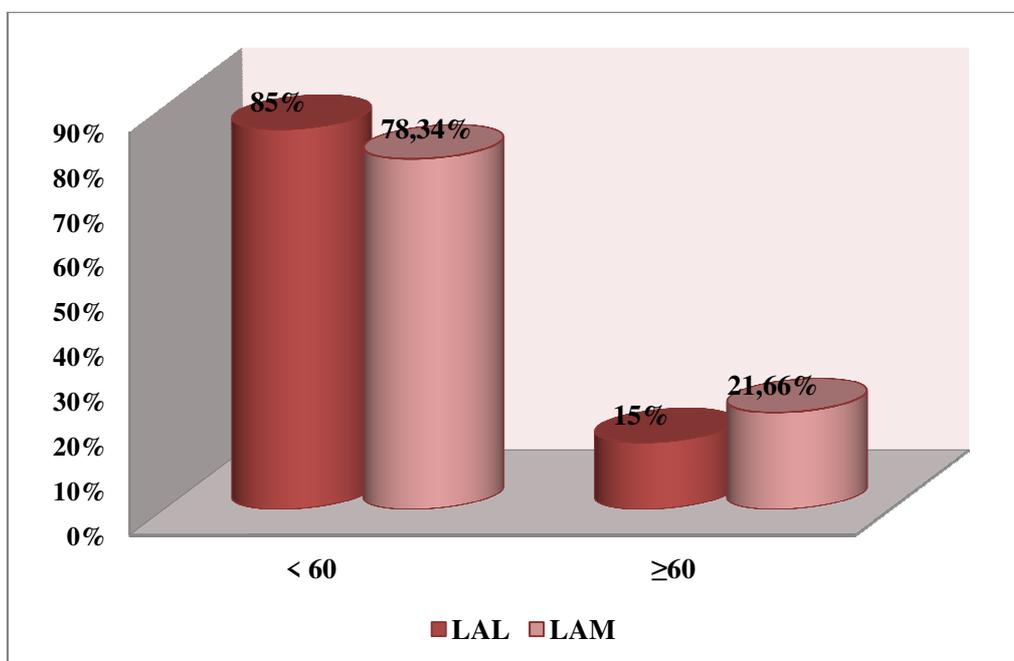
Pour ce qui est de nos résultats, la fréquence des LAM est trois fois plus que celle des LAL (75% vs.25%). L'incidence des leucémies aigues et la répartition des LAL et LAM dans notre population d'étude est conforme à celle de la littérature puisque, les LAM sont les leucémies les plus fréquentes chez l'adulte (environ 25% de tous les types de leucémies) alors que, les LAL représentent moins de 1 % [52,53,61].

### 1. Répartition selon l'âge :

La moyenne d'âge générale de toute la population d'étude est  $44,07 \pm 16,25$  [17-86]. La tranche d'âge (50-59 ans) est la plus fréquente, suivie par la tranche (30-39 ans). La tranche la plus faible est celle des patients de moins de 20 ans et il est à noter que les patients de cette tranche appartiennent tous au groupe des LAL (**tableau 15**).

**Tableau 15:** Répartition globale des patients selon les tranches d'âge

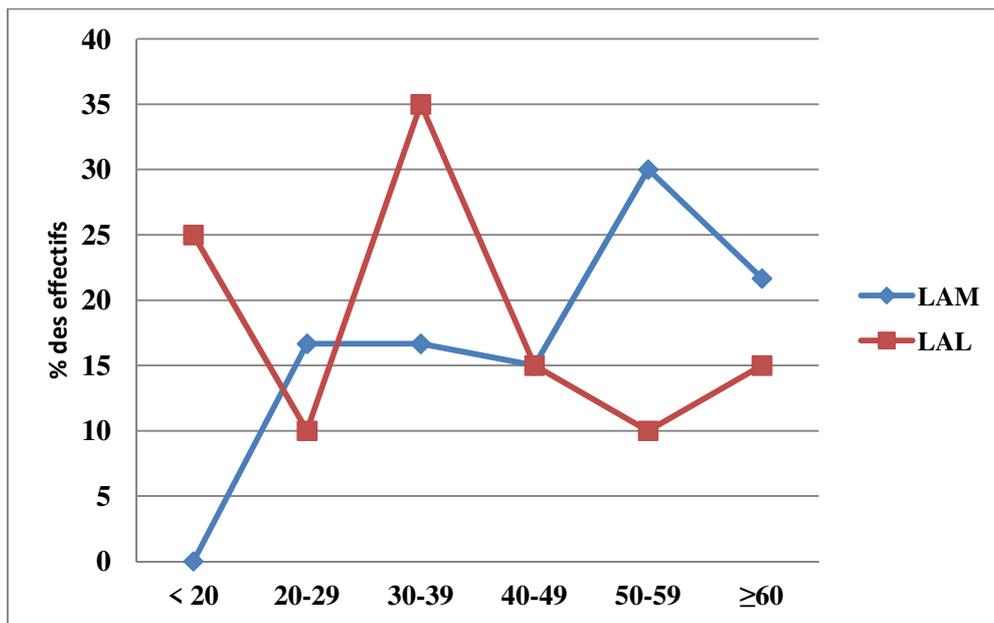
Groupe d'âge	Nombre	Pourcentage
< 20	5	6,25%
20-29	12	15%
30-39	17	21,25%
40-49	12	15%
50-59	20	25%
≥60	14	17,5%
<b>total</b>	<b>80</b>	<b>100%</b>



**Figure 16:** Répartition des patients selon les tranches d'âge et le type de leucémie aigue

Pour les patients LAL, la moyenne est de  $36,55 \pm 17,65$  [19-66 ans] et contrairement au LAM les patients âgés de moins de 60 ans représentent 85%. La moyenne d'âge des patients atteints de LAM est  $46,35 \pm 15,6$  ans [21-86 ans] dont 21,66% sont âgés de plus de 60 ans.

Dans notre population, on a observé une différence d'âge significative entre les deux types de leucémies. Concrètement, les patients dont l'âge est inférieur à 20 ans sont tous des LAL et la majorité de ceux qui étaient âgé plus de 60 ans étaient des LAM (**figure 17**).



**Figure 17:** Répartition des types de leucémies selon les tranches d'âge

### Pour les LAL :

Pour ce qui est des LAL, leur incidence augmente de la naissance à 3 ans, puis diminue jusqu'à environ 50 ans et devient plus rare au-delà de 60% [120,121]. Cependant, notre étude n'a porté que sur les patients adultes.

La fréquence parmi les patients âgés de moins de 20 ans est plus élevée au Costa Rica, Espagne, Canada et la Nouvelle-Zélande et elle est faible chez les populations Afro-Américaines, le moyen Orient et l'Inde [53]. Cette différence peut refléter des différences géographiques ou les origines ethniques des populations étudiées.

### Pour les LAM :

La LAM est une maladie des personnes adultes ; bien qu'elle soit la plus fréquente, elle reste une maladie infantile particulièrement rare [52].

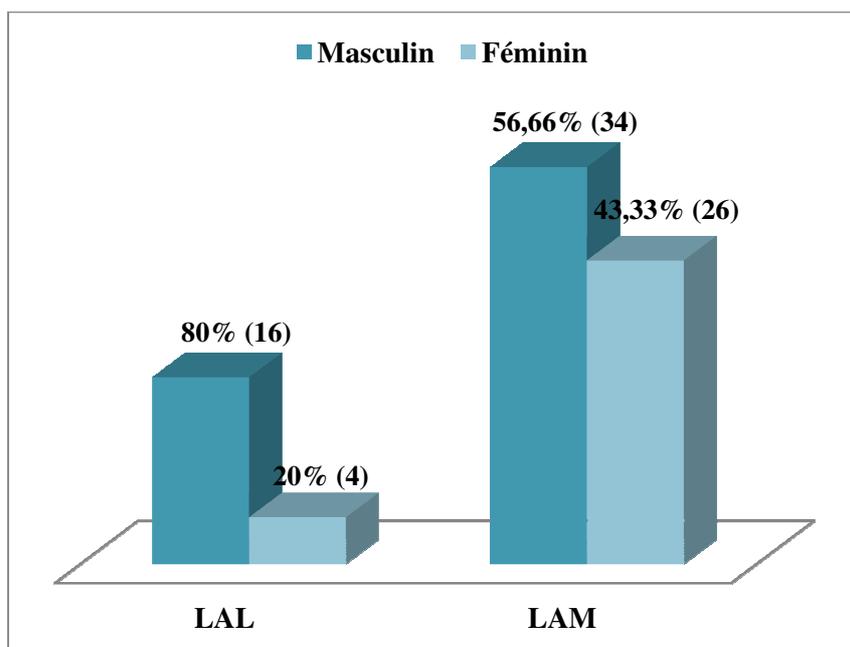
La moyenne d'âge des patients de notre étude enregistrés au moment du diagnostic est nettement inférieure avec une valeur de 46 ans. Ce résultat est observé dans une autre étude épidémiologique faite sur les LAM de la population Algérienne (2011) par **Bekadja et al.**[122].

Cependant, les données bibliographiques montrent que la moyenne d'âge des patients LAM oscille entre 60-65 ans et la survenue de LAM est rare avant 45 ans [123,124]. Au Royaume Uni, 42.85% des patients LAM étaient âgés de plus de 60 ans avec une moyenne d'âge de 65 ans [52]. Aux USA, la fréquence des patients LAM dont l'âge est supérieur à 60 ans est dix fois plus élevé que de ceux inférieurs à 60 ans [124], alors qu'en Algérie c'est le contraire ; la fréquence de ceux âgés de moins de 60 ans est presque trois fois plus que celle des patients supérieurs à 60 ans.

Cette différence avec les autres populations peut être expliquée par le caractère jeune de la population algérienne où plus de la moitié sont âgés de moins de 27,3 ans (2014) [125].

### **2. Répartition selon le sexe :**

Les patients de sexe masculin représentent 62,5% (n=50) contre 37,5% (n=30) de patients de sexe féminin. Soit un sexe ratio (H/F) de 1,66. Au regard des deux types, chez les patients LAM, la fréquence des hommes représente 56,66% (n=34) de la cohorte avec un sexe ratio (H/F) de 1,3 quand au LAL, il y a une prédominance importante du sexe masculin avec une fréquence de 80% (n=16), le sexe ratio (H/F) est 4.



**Figure 18:** Répartition des patients selon le sexe et le type de leucémie

Concernant les LAM, nos résultats sont conformes avec la littérature, en Europe, leurs fréquences sont plus élevées chez les hommes que chez les femmes, avec un sexe ratio de 1,2 [4]. Cette différence peut être due au fait que les femmes s'exposent moins aux facteurs environnementaux et aux travaux de risques, en plus, **Cook et al.** ont proposé d'autres facteurs responsables tels que les hormones et les différences génétiques entre les deux sexes[127].

Egalement pour les LAL où la fréquence est significativement plus élevée chez le sexe masculin. Nos observations soutiennent des études antérieures [128,129] sur les différences entre les sexes dans le pronostic des LAL où les hommes sont plus susceptibles d'être atteint et plus précisément d'avoir des LAL à cellules T. Le type de cellules leucémiques reste en partie une explication alternative à la disparité observée par sexe. Par conséquent, il semble y avoir une explication biologique au-delà du type cellulaire pour la disparité des sexes. Il est plausible de soupçonner l'instabilité chromosomique XY comme une contribution possible à la prolifération cellulaire anormale, entraînant ainsi une leucémie biologiquement agressive chez les patients masculins. De plus, il est possible que la testostérone ou les œstrogènes jouent un rôle mineur dans les LAL

### 3. Répartition géographique :

Le CHU de Constantine reçoit la majorité des patients de leucémie aigues de l'Est Algérien, ceux de Constantine et de Mila représentaient 26,25% chacun, suivis par 23,75% de patients venus de Jijel.

**Tableau 16:** Répartition géographique en fonction de la province

Province	N	%
Constantine	21	26,25%
Mila	21	26,25%
Jijel	19	23,75%
OEB	11	13,75%
Skikda	5	6,25%
Tebessa	1	1,25%
Guelma	1	1,25%
Biskra	1	1,25%
Total	80	100%

Le service de l'hématologie du CHU Constantine ne reçoit pas seulement les patients constantinois mais aussi ceux résidant des Wilaya avoisinantes tels que Mila et Jijel et ce parce que ces dernières ne sont pas dotés de services d'hématologie dans leurs hôpitaux qui puissent prendre en charge des patients leucémiques. Quand aux autres Wilayas, les faibles fréquences observées peuvent être expliquées par le fait que la majorité de ces patients se dirigent vers les services d'hématologie d'Annaba et Batna en raison de leur proximité.

#### 4. Analyses biologiques :

**4.1. Données de l'hémogramme :** tous les patients présentent des anomalies de l'hémogramme.

- leucocytose : en suivant les normes de l'OMS, les valeurs de leucocytes normales varie entre  $5,2-12,4 \times 10^9/L$ .

Dans notre cohorte, 83,75% (n=48) des malades présentent un taux de leucocytes anormal : 23,75% ont une leucopénie, 43,75% une leucocytose et 16,25% présentent une hyperleucocytose. Seulement 16,25% ont un taux de leucocyte normal.

**Tableau 17:** Résultats de leucocytose de tous les patients

Leucocytose ( $\times 10^9/L$ )	N	%
<b>leucopénie</b>	19	23,75%
<b>Normal</b>	13	16,25%
<b>Leucocytose (n=35)</b>		43,75%
<b>&lt; 50</b>	23	65,71%
<b>50-99</b>	12	34,28%
<b>Hyperleucocytose <math>\geq 100</math></b>	13	16,25%
<b>TOTAL</b>	80	100%

Avec une étendu allant de  $0,47 \times 10^9/L$  jusqu'à  $139,5 \times 10^9/L$ , la moyenne de leucocytose des patients LAL est  $41,29 \times 10^9/L \pm 44,07$ , ce qui est légèrement faible comparé à celle des LAM ( $55,37 \times 10^9/L \pm 135,65$ ) avec une étendu de  $0,19 \times 10^9/L$  jusqu'à  $970 \times 10^9/L$ .

- hémoglobine (Hb): Lorsque les valeurs d'Hb sont inférieures à 12 g/dL on parle d'anémie.

Une anémie est retrouvée chez 93,75% (n=75) des patients. La moyenne d'Hb des patients LAM est  $7,81 \pm 1,93$  g/dL et celle des LAL est  $8,73 \pm 2,55$  g/dL.

- plaquettes : les valeurs normales varient entre  $130-400 \times 10^9/L$ .

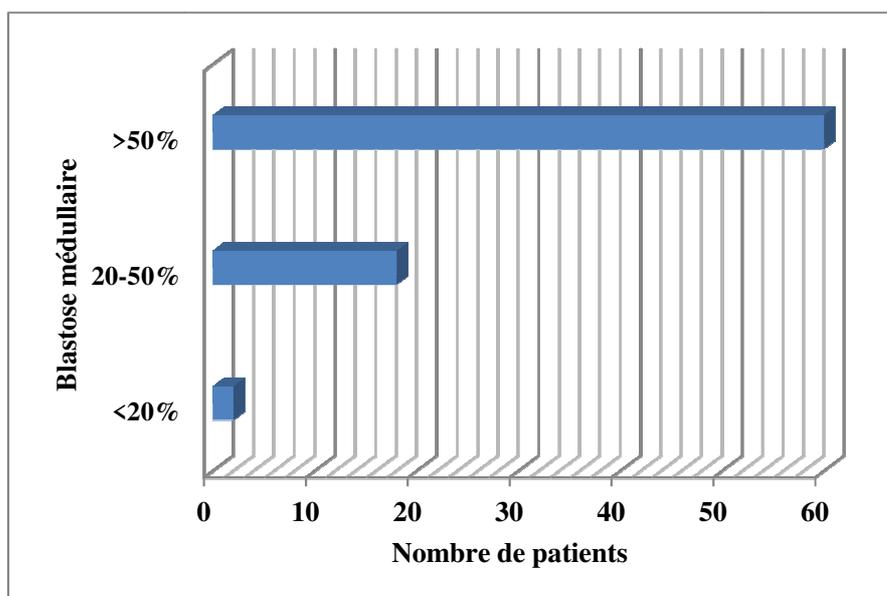
Une thrombopénie est observée chez 73,75% (n=59) des patients leucémiques. La moyenne de PLTs des patients LAM est  $78,21 \pm 93,86 \times 10^9/L$  et celle des LAL est  $146,3 \pm 136,49 \times 10^9/L$ . Les patients LAM représentent une thrombopénie plus sévère que les patients LAL ( $p=0.015$ ).

Conformément à ce qui était attendu, la majorité des patients leucémiques indépendamment du type ont affiché une hyperleucocytose accompagnée d'une anémie, thrombopénie [130]. Tous les patients leucémiques sont sujets à des perturbations hématologiques qui se traduisent en un hémogramme anormal avec des dérèglements des valeurs des composants du sang.

Ces observations peuvent être expliquées par le fait que lors d'une activité anormale de la moelle osseuse comme dans les cas de leucémie aigue, elle est envahie par des blastes qui prolifèrent ce qui empêche la croissance des cellules normales d'où les cytopénies en périphérie (anémie, thrombopénie, neutropénie ...). Le résultat de cet envahissement est une insuffisance médullaire.

#### **4.2. Résultats du myélogramme :**

C'est l'élément clé du diagnostic, c'est un examen cytologique qui va permettre de déterminer le type de leucémie et d'affirmer le diagnostic. Ainsi chez nos patients 97,5% (n=78) présentent une blastose médullaire supérieure à 20%, dont 23,08% (n=18) ont une blastose inférieure à 50% et 76,92% (n=60) une blastose supérieure à 50%. La moyenne de blastose des patients LAL est légèrement supérieure à celle des LAM  $74 \pm 26.09\%$  et  $72 \pm 27.02\%$  respectivement.

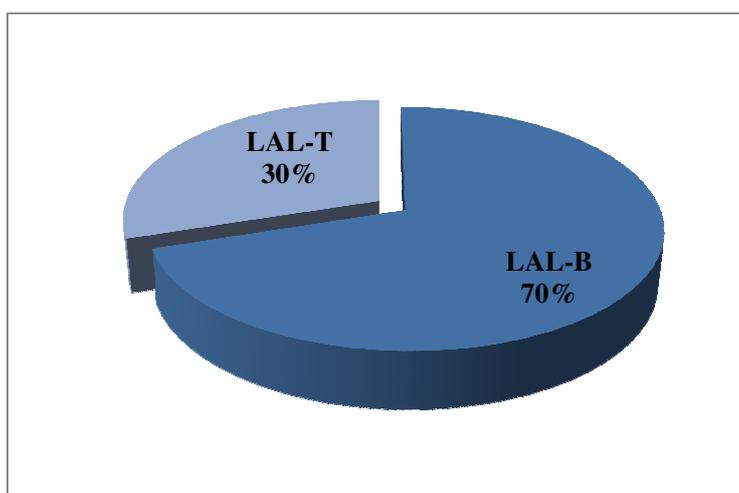


**Figure 19:** Répartition des patients suivant leur taux de blastose.

#### **4.3.Immunophénotypage :**

L'immunophénotypage a permis de classer les patients LAL selon la classification EGIL (**annexe 4**). L'affectation des blastes à chaque lignée s'appuie intégralement sur le profil antigénique qu'exprime les cellules blastiques pour les patients atteints de LAL ce qui nous a permis de déterminer la nature B ou T de la lignée lymphoïde.

Les résultats de l'analyse immunologique montrent que 70% (n=14) des patients LAL appartiennent à la lignée lymphoïde B et 30% (n=6) à la lignée lymphoïde T.



**Figure 20:** Représentation de la classification des LAL selon l'EGIL.

Les marqueurs d'immatunité CD34 et HLA-DR sont fortement exprimés dans les deux types. Les blastes de la lignée B expriment le marqueur intra-cytoplasmique CD19a, ils expriment également les marqueurs de surface CD19, CD10 et CD20. Les blastes de la lignée T expriment le marqueur CD3 intra-cytoplasmique, ainsi que les marqueurs de surface CD5, CD7, CD8 et CD10.

Dans les LAL la détermination de la lignée B ou T et leur classification en sous groupe fournies par la cytométrie en flux (CMF), demeurent très importantes dans la prise en charge thérapeutique. Nos données de CMF ont montré que les LAL de lignée B sont plus fréquentes que celles de la lignée T. Comparés avec la littérature, nos résultats sont conformes avec ce qui a été rapporté au paravent démontrant que les LALT représentent environ un quart des cas de LAL chez l'adulte [131]

En fait, ces classifications découlent de la connaissance des voies de maturation que suivent normalement les cellules au cours de leur développement dans la moelle osseuse pour les LAL B et le thymus pour les LAL T.

Les antigènes CD34 et HLA-DR sont fréquemment exprimés et signalent le caractère immature des blastes d'un clone leucémique [131]. Par ailleurs, l'expression intracytoplasmique de CD79a ou de la chaîne  $\epsilon$  de CD3 signe l'engagement d'une cellule, normale ou leucémique, dans la lignée lymphoïde B ou T [1].

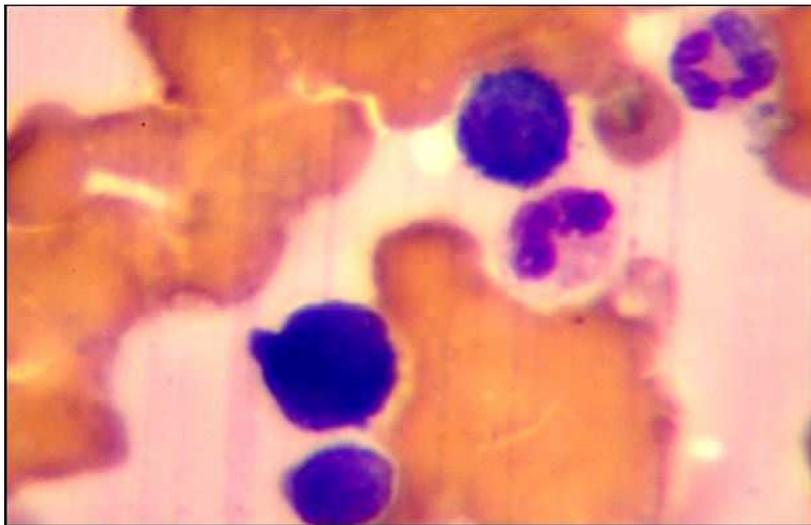
Nos résultats nous ont permis de classer les patients LAL en sous types, ainsi on a trouvé 50% des patients LALB sont en phase BI (pro-B) et les 50% restants sont des BII (B commune). Pour la lignée B, cette caractéristique est associée à l'expression membranaire de la molécule CD19. Les autres antigènes associés à la lignée B qui apparaissent ensuite sont CD22, CD24 puis CD20. Pendant une phase transitoire, les futurs lymphocytes B expriment l'ectopeptidase CD10 [132]

Quant aux patients LALT ; 16,66% sont au stade TI (pro-T), 66,66% sont au stade TII (pré-T) et 16,66% sont TIII (T-cortical). Les cellules engagées dans la lignée T expriment en premier lieu la molécule d'adhésion CD7, dans une phase précoce pouvant conduire à un retour vers la lignée myéloïde. Les antigènes CD2 et CD5 apparaissent ensuite à la surface des précurseurs T, permettant leur exportation de la moelle osseuse vers l'épithélium thymique. L'expression transitoire de CD1, molécule apparentée aux antigènes HLA de classe I, signe la prolifération corticale des thymocytes [133].

Tous ces stades mentionnés sont des formes de blastes cellulaire qui n'ont pas atteints encore un stade de maturation permettant ainsi de confirmer le statut blastique qui a envahie le sang périphérique des patients LAL et de déposer un diagnostic précis pour chaque cas.

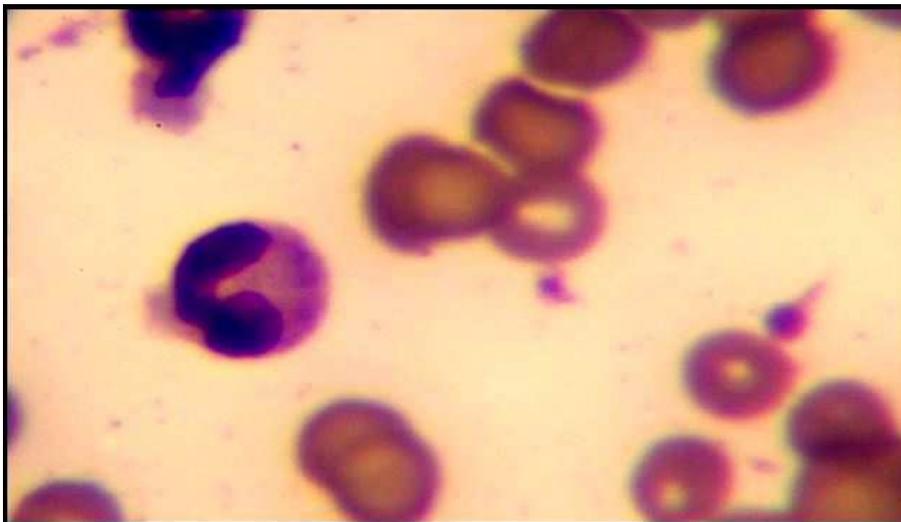
### **4.4. Classification des LAM :**

#### **4.4.1. Résultats du frottis médullaire :**



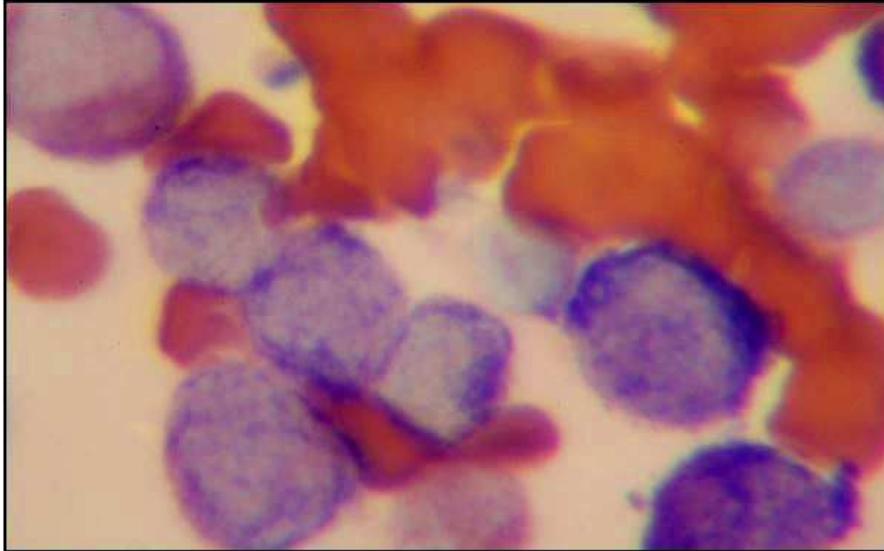
**Figure 21:** Frottis médullaire d'un patient atteint de LAM2

Des cellules avec un rapport nucléo-cytoplasmique très élevé, un noyau assez volumineux, rond et de contours régulier, de couleurs très foncée. Le cytoplasme réduit, peu abondant et ne contient aucune granulation ; Il s'agit de myéloblastes et pro-myéloblastes. D'autres ont un rapport nucléo-cytoplasmique réduit, un noyau irrégulier contenant plusieurs lobes, de couleurs assez clair. Le cytoplasme est assez abondant et ne contient pas de granulations. Il s'agit de pro-myéloblaste et de métamyélocyte.



**Figure 22:** Frottis médullaire d'un patient atteint de LAL2

On remarque l'existence de quelques cellules avec un rapport nucléo-cytoplasmique réduit, un noyau irrégulier et bilobé, avec une chromatine assez condensée. Le cytoplasme est assez abondant et contient de nombreuses petites granulations neutres on est en présence de métamyélocytes neutrophiles.



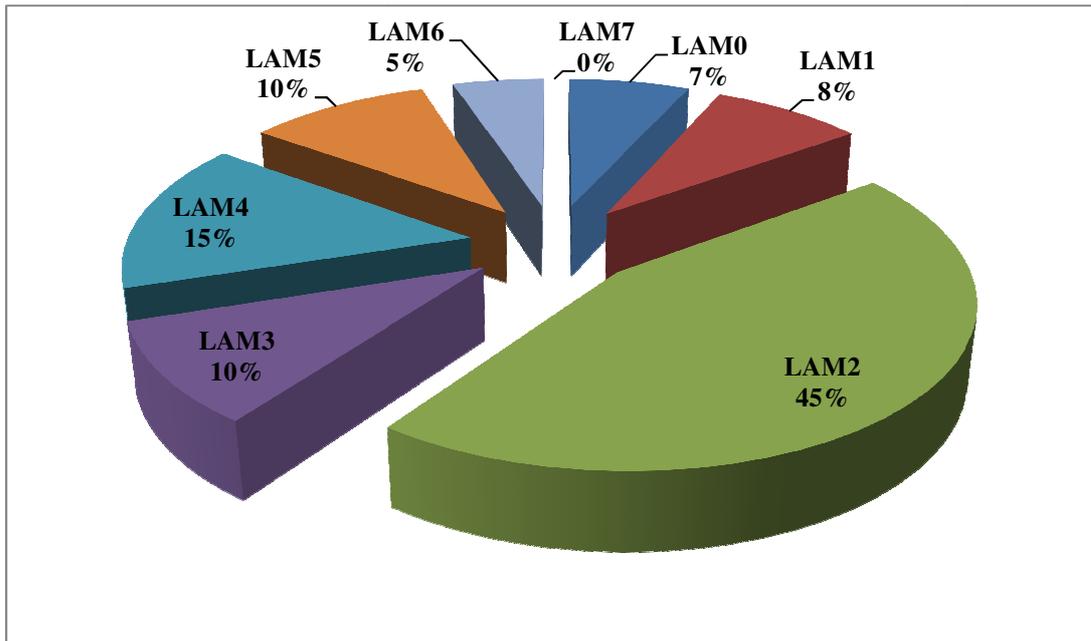
**Figure 23:** Frottis médullaire d'un patient atteint de LAM5

Présence des cellules de très grande taille au noyau arrondi, avec une chromatine finement réticulée et faiblement condensée. Le cytoplasme est abondant et basophile apparaît en clair ; Il s'agit de monoblastes.

D'autres cellules ont un aspect assez proche qui présente une plus grande irrégularité du noyau comportant des encoches et des replis avec un cytoplasme plus condensé en périphérie et un cytoplasme plus foncé ; Il s'agit de pro-monocytes.

#### **4.4.2. La classification :**

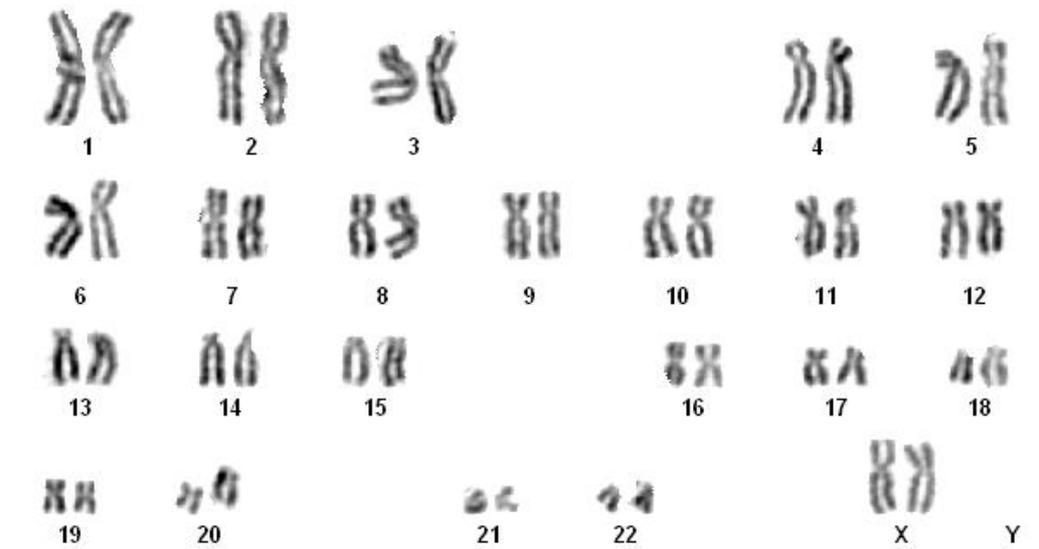
Cette classification est basée essentiellement sur les résultats cytologiques. Parmi les 60 patients LAM, 45% (n=27) sont du type LAM2 suivis par 15% (n=9) de LAM4 et 10% (n=6) de LAM3 et LAM5 chacun, le type M7 est absent dans notre population d'étude. (Annexe3)



**Figure 24:** Classification FAB des patients LAM

Les proportions des types de classification FAB pour les patients LAM sont quasiment les mêmes que ceux décrits dans la littérature[122], cependant, dans notre étude on a eu une absence totale du type M7.

**4.5. Résultats de la cytogénétique :**



**Figure 25:** Résultat d'un caryotype standard d'un patient LAM ne présentant aucune anomalie chromosomique.

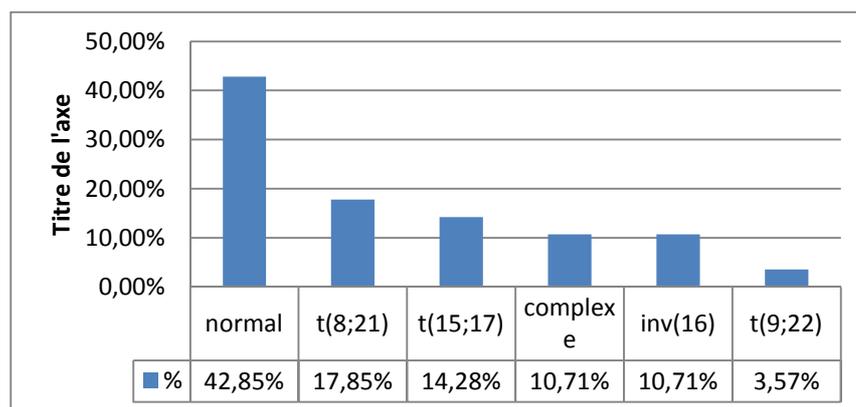
**Tableau 18:** Les résultats de cytogénétique des patients

	Normal	Anormal	Total
LAM	12	16	28
LAL	6	6	12
Total	18	22	40

Au total, 55% (n=44) des patients ont bénéficiés d’une analyse cytogénétique parmi lesquels 4 ont eu un échec de culture. 45% des patients n’ont pas pu accéder à cette analyse par faute de moyen.

Les résultats cytogénétiques montrent que 4 échantillons ont donné un échec de culture, 18 des patients atteints de leucémie aigue représentent un caryotype normal et 22 des patients avec des aberrations chromosomiques. Ainsi l'analyse cytogénétique des leucémies aigues révèle des anomalies chromosomiques acquises, non aléatoires, dans 50 à 80 % des caryotype [134].

- **LAM:**



**Figure 26:** Résultats cytogénétiques des patients LAM

Parmi les résultats obtenus, des anomalies chromosomiques clonales acquises sont trouvées dans 57,15% des patients présentant une LAM de novo dans notre cohorte, ces résultats sont conformes avec la littérature qui rapporte des anomalies dans 50-60 % des cas [71]. Ces anomalies constituent un facteur pronostique indépendant des autres facteurs de risque ce qui fait d’elles un outil très puissant. Elles peuvent aussi être corrélées avec des aspects morphologiques et immunologiques.

La présence de plusieurs anomalies chromosomiques observées chez nos patients avec des fréquences différentes :

1- La translocation t(8;21)(q22;q22) est la première translocation décrite dans les LAM [135]. Dans notre cohorte, elle est présente avec une fréquence de 17,85%. En littérature, elle représente environ 5 %-10% des LAM et de 10-22% dans les LAM2 [136–138]. Approximativement, 3-4% des LAM à t(8 ;21) sont associées à d'autres aberrations chromosomiques, dans le même temps, cette translocation est associée à une perte du chromosome X dans 40% des cas [139].

Dans notre population d'étude, l'âge des patients porteurs de cette translocation est inférieur à 50 ans. L'incidence des LAM avec des anomalies cytogénétiques favorables diminue avec l'âge [87,140]. En effet la t(8 ;21) est plus fréquente chez les patients adultes jeunes et dans les leucémies pédiatriques et est trouvée à des faibles fréquences chez les adultes de plus de 60 ans [87].

La t(8 ;21) est reconnue comme étant un type distinct des LAM dans la classification de l'OMS et elle est associée à un pronostic favorable à la fois en terme de rémissions avec un taux proche de 85 % et qu'en terme de survie, proche de 60 %, en particulier avec l'utilisation de fortes doses d'aracytine. Chez les patients porteurs de cette translocation le mauvais facteur de risque est les taux élevés de leucocytose mais pas l'âge [49,50]

Dans une étude faite en Chine sur la relation entre cette translocation et le traitement, **HY et al.** ont trouvé que les patients porteurs de la t(8 ;21) avaient un taux de rechute 29% contre 57% pour les patients à caryotype normal et qu'avec 4 cycles de cytarabine à forte dose utilisé comme thérapie post-rémission, la survie sans événements des patients t(8 ;21) s'améliorait à 71% contre 43% pour les patients à caryotype normal [141].

2- La seconde translocation la plus retrouvée dans les LAM est la t(15;17)(q22-23;q12-21). Dans notre étude, la t(15 ;17) est trouvée à 14,28% des LAM et à 66,66% des LAM3 (**figure 26**). Ces fréquences sont tout à fait conformes à la littérature, en effet elle est trouvée de 10-15% dans les LAM et est trouvée en particulier jusqu'à 80% des cas de LAM3[142,143].

Le transcrite *PML-RAR-alpha* étant spécifique des LAP, sa recherche est maintenant systématique car il a permis l'introduction des traitements spécifiques, ATRA (Acide tout transrétinoïque) d'une part et un dérivé de l'arsenic, le Trisinox™, d'autre part. Il s'agit du premier exemple de traitement spécifique d'une leucémie aiguë [144].

L'amélioration de ce traitement a permis de classer ce type de LAM en première position en terme de taux de survie élevé et de rémission complète [145]. **Sanz et al.** ont

désigné une stratification des patients LAM3 t(15 ;17), après avoir observé que les patients ayant une hyperleucocytose et un taux de thrombocyte faible avaient un risque élevé de décès durant la chimiothérapie d'induction et en récurrence. Leur étude a ajouté l'ATRA dans les traitements de consolidation dans les groupes à risque intermédiaires et élevé.

Depuis, l'introduction de ces nouvelles thérapeutiques reposant sur l'association de la chimiothérapie (principalement des antracyclines) avec l'ATRA ce qui va induire une maturation des cellules malignes, le taux de rémission complète est aujourd'hui proche de 90% avec un taux de survie proche de 80 % en dépit d'un risque hémorragique [146].

3- Une autre classe d'aberrations a été observée dans notre cohorte, celle des caryotypes complexes, qui sont définis par la présence de trois anomalies génétiques ou plus, en dehors des anomalies récurrentes selon la classification OMS 2016 [50]. Les lésions les plus courantes observées au sein de ce groupe de pronostic particulièrement défavorable sont des pertes (le plus souvent : -5/5q-, -7/7q-, -17/17p-, -18/18q-, 12p- et -16/16-), ou gains de matériel chromosomique (+8/+8q, +21/+21q, +11q, et +22q). Cependant, la résolution des méthodes de cytogénétique conventionnelle ne permet souvent pas de localiser avec précision la région affectée et il est difficile de détecter toutes les anomalies.

Dans les LAM ce groupe cytogénétique représente 10-14 % des patients et jusqu'à 23% des patients les plus âgés [147,148]. Dans notre étude, 10,71% présentent un caryotype complexe et dont l'âge est supérieur à 50 ans (**figure 26**).

Sur le plan clinique, les patients qui présentent un caryotype complexe sont classés dans le groupe cytogénétique à risque défavorable en terme de réponse au traitement et en survie générale [149]. D'autres chercheurs se sont focalisés sur le sous classement de ce groupe selon le nombre d'anomalies observée (3, 4 ou plus) et leur effet sur le pronostic mais le pronostic reste inchangé [147,149].

4- Deux autres aberrations chromosomiques retrouvées dans les LAM , l'inversion péricentrique du chromosome 16 l'inv(16)(p13q22) ou la translocation équilibrée t(16;16)(p13;q22), ces deux anomalies conduisent à la fusion du gène *CBFB* localisé sur le 16q22 et du gène *MYH11* (smooth muscle myosin heavy chain 11) localisé sur le 16p13, il en résulte la production d'une protéine chimérique CBFB-MYH11. Au niveau moléculaire, il existe plus de 10 variant du transcrite de fusion CBFB-MYH11 identifiés [150].

Les protéines de fusion CFBF-MYH11 bloquent le processus de différenciation des cellules myéloïdes par séquestration de la protéine CBFA2 dans le cytoplasme [151]. Le complexe CBFA2/CBF-MYH11 agit également comme un répresseur transcriptionnel en recrutant des corépresseurs et des complexes de modification de la chromatine [151].

Les LAM portant l'altération CBF-MYH11 présentent des caractéristiques spécifiques au niveau de la moelle osseuse et sont morphologiquement associées au type LAM4 avec des composants éosinophiles anormaux (M4eo), mais elles peuvent aussi être trouvées dans les types M2 et M5 [152]. Dans notre population, elles sont strictement retrouvées chez les M4.

Cytogénétiquement, les réarrangements CBF-MYH11 sont la plus part du temps associés aux trisomies 21,8 et 22 et d'une façon moins fréquente avec les délétions du bras long du chromosome 7 et sur le point moléculaire ils sont associés aux mutations du gène c-Kit[153].

Dans notre cohorte, le réarrangement CBF-MYH11 est trouvé à une fréquence de 10,71%, ce résultat est conforme avec la littérature où cette altération est d'une fréquence et elle représente 5-7% des LAM [154].

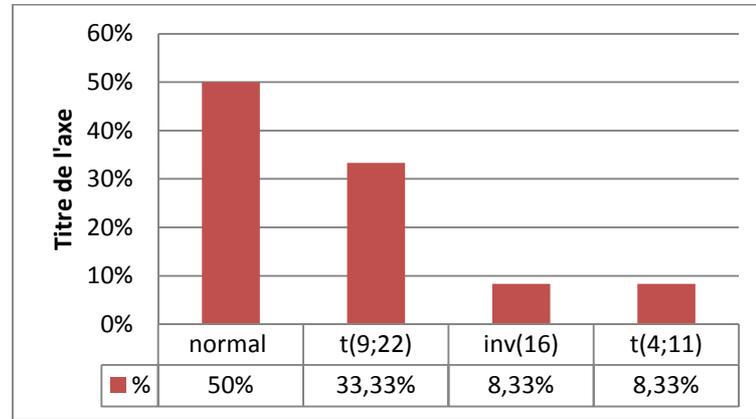
La moyenne d'âge de nos patients porteurs de cette aberration est 36,5 ans. Nos résultats sont conformes avec la littérature où les patients LAM portant le réarrangement inv(16) sont observés dans toutes les catégories d'âge, bien que retrouvée à une fréquence élevée chez les patients jeunes où la moyenne d'âge est aux environs de 36 ans [152]. Dans une étude faite par Delaunay *et al.*, ils ont rapporté que l'âge avancé est associé à une tendance d'apparition d'aberrations chromosomiques additionnelles [155].

Ce groupe cytogénétique est généralement associé à un taux élevé de rémission complète, plus précisément quand il est traité avec des cycles répétitifs de Cytarabine à forte dose comme thérapie de consolidation. Dans notre cohorte, les mauvais facteurs pronostiques qui sont liés à cette anomalies, sont les taux élevés de leucocytose et les taux faibles des plaquettes et l'âge avancé représente un facteur prédictif de possibilité de récurrence mais pas de décès lors de la chimiothérapie d'induction[154,155].

L'absence d'autres aberrations chromosomiques peut être due au nombre réduit de la taille de la cohorte qui a bénéficiée de l'analyse cytogénétique et la présence d'autres anomalies

chez nos patients tels que le caryotype complexe peuvent être un signe d'une instabilité importante du génome à cause de la transformation cellulaire.

- **LAL :**



**Figure 27:** Résultats cytogénétiques des patients LAL

Les LAL comme dans les LAM, les anomalies chromosomiques clonales sont retrouvées dans 50% de nos patients LAL, ces résultats sont en accord avec la littérature où les aberrations sont trouvées à des fréquences supérieures à 50% chez l'adulte [53]. Elles ont une valeur pronostique indépendante qui rend le caryotype indispensable avant la mise en route du traitement car il conditionne la thérapeutique.

Les anomalies les plus retrouvées dans les LALB sont :

1- La translocation  $t(9;22)(q34;q11)$  est présente dans 33,33% de nos patients LAL (**figure 27**) et avec cette fréquence nos résultats sont conformes avec la littérature où elle varie entre 20-40% des patients LAL adultes [74].

À l'exception de leur âge plus élevé, les malades atteints de LAL Ph+ n'ont pas de caractéristiques cliniques remarquables par rapport aux malades non porteurs de la translocation. Sur le plan biologique, ils se distinguent par une leucocytose en moyenne plus élevée, par un immunophénotype B, CD10+, avec ou sans chaînes d'immunoglobulines intracytoplasmiques, co-exprimant C34, CD13 et CD33, dans la classification de l'EGIL, les LAL Ph+ correspondent donc aux LAL BII et BIII [156].

La caractéristique majeure de la LAL Ph+ est son pronostic médiocre. L'obtention d'une rémission complète est possible mais avec une fréquence probablement un peu moindre que celle des patients qui ne portent pas la translocation. Aujourd'hui chez l'adulte, une RC est attendue dans 70-80 % des cas traités par chimiothérapie conventionnelle. Toutefois, ces

RC sont relativement instables, puisque à long terme, la survie sans maladie est inférieure à celle des malades sans la translocation [157].

Les malades LAL Ph+ traités par chimiothérapie conventionnelle ont une espérance de vie particulièrement pauvre, inférieure à 10 % à trois ans [158]. Cependant, après l'introduction des inhibiteurs de tyrosines kinases (ITK) a constitué une révolution dans la prise en charge du cancer en général et par leur efficacité thérapeutique ont profondément transformé le pronostic des LAL. Ces médicaments qu'ils soient de 1<sup>ère</sup> génération (Imatinib) ou de 2<sup>ème</sup> génération (Nilotinib) ont prouvé leur efficacité dans le traitement des LAL Ph+ avec des taux de RC très élevés. Une étude suggère que les malades qui ont reçu simultanément l'Imatinib et la chimiothérapie obtiennent plus souvent une rémission moléculaire que les malades qui ont reçu l'Imatinib en alternance avec une chimiothérapie [159].

2- La t(4;11)(q21;q23) est une translocation chromosomique observée dans la région 21 du bras long du chromosome 4 où se trouve le gène AF4 et la région 23 du bras long du chromosome 11 locus du gène MLL [160].

Le gène MLL est parmi les gènes qui sont fréquemment impliqués dans les hémopathies malignes et en particulier les LA où plus de 104 translocations récurrentes et 64 gènes partenaires dans ces translocations ont été identifiés [161]. La protéine chimérique MLL-AF4 résulte de la fusion de la partie N-terminal du gène MLL avec la partie C-terminal du gène AF4 qui joue non seulement un rôle oncogénique mais également influence le processus de transformation des lignées cellulaires [161].

On a observé cette translocation chez 8,33%% dans notre population d'étude ce qui est en accord avec la littérature. La protéine de fusion MLL-AF4 est décrite principalement dans les LAL pédiatriques ainsi que chez l'adulte [162]. Elle est trouvée dans 10% des patients AML de novo présentant des LALB et dans 30-40% des sous type LAL pro-B [163,164].

Cette translocation est liée avec l'âge où on observe un pique qui peut atteindre 50% chez les nourrissons de moins de 6 mois, puis cette fréquence diminue pour atteindre 10-20% chez les enfants et 2 % chez les enfants plus âgés et enfin la fréquence remonte encore chez les adultes jusqu'à 10% [65,165,166]

Nos patients porteurs de cette translocation affichent des taux de leucocytose élevés au moment du diagnostic, une surexpression d'antigènes de lignées myéloïdes : CD22, cyCD79a, HLA-DR et CD34 et une absence totale du CD10 [160].

La présence de la t(4 ;11) est un mauvais signe pour les patients, elle est classée dans le groupe de risque défavorable. En effet, cette translocation est considérée comme un mauvais facteur à haut risque, associée par des caractéristiques cliniques défavorables avec un taux de réponse à la chimiothérapie d'induction très faible comparée à d'autres aberrations du même groupe [160,164].

En ce qui concerne les échecs de culture, cela peut être expliqué soit par une absence de mitoses qui peut être due au faible indice prolifératif des cellules tumorales malignes, ou peut être c'est lié à l'effet des agents mitogène tels que le PHA sur ces cellules, et aussi le temps nécessaire pour la multiplication des différentes cellules et leur synchronisation, ou bien la qualité du prélèvement est mauvaise avec une quantité faible.

Les anomalies chromosomiques sont précieuses dans le diagnostic des différents types de leucémies. Certaines de ces anomalies sont uniquement associées à des sous-types histologiques ou immunologiques spécifiques d'hémopathies malignes et l'utilisation de la cytogénétique et ses résultats sont largement reconnus comme l'un des déterminants les plus importants pour la prise en charge des leucémies.

De nos jours, plusieurs anomalies chromosomiques récurrentes sont considérées comme des marqueurs de diagnostic et de pronostic distincts. Leur utilisation s'étend au suivi des patients en cas de rechute et à l'évaluation de la maladie résiduelle [167].

### **Histoire familiale et leucémie aigue :**

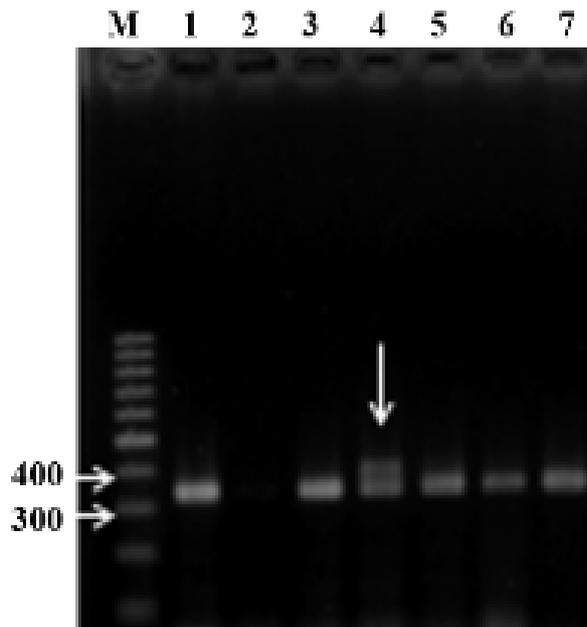
Dans notre population d'étude aucun antécédent familial de cancer n'a été enregistré. Selon la littérature, la leucémie aiguë survient par cas isolés, mais parfois on peut assister à plusieurs cas de leucémies dans la même famille, probablement en rapport avec un facteur familial prédisposant. L'histoire familiale de cancer à n'importe quel site (sein, poumon, hémopathie maligne) semble augmenter le taux d'incidence des leucémies aigues [168].

**II. Analyse moléculaire :**

**1. Recherche des mutations au niveau du gène *FLT3* :**

**1.1. Le *FLT3-ITD* :**

Le résultat de l'amplification des exons 14-15 est le suivant :



**Figure 28:** Détection de la duplication en tandem du gène *FLT3* par amplification PCR.

M : marqueur de taille.

1 : témoin non muté.

2 : le blanc.

3 : homozygote sauvage.

4 : hétérozygote muté.

Les produits de PCR ont donné le profil électrophorétique ci-dessous :

- Une bande épaisse d'une taille de 389pb qui représente l'homozygote non muté,
- Deux bandes dont l'une est d'une taille de 389pb et l'autre d'une taille plus importante représentant ainsi l'hétérozygote.

Tous les patients mutés sont hétérozygotes.

Les LAM sont le résultat de la survenue de deux classes de mutations, la classe I qui confère une capacité proliférative autonome et une survie incontrôlée dont les mutations du gène *FLT3*, la classe II quand à elle, joue un rôle très important dans le blocage de la différenciation des blastes hématopoïétiques et l'échappement à l'apoptose.

Les mutations du gène *FLT3* sont trouvées dans de nombreux sous-types de LAM et sont considérés comme des mutations de la classe I qui confèrent une prolifération et/ou une survie aux cellules transformées. Les patients LAM avec mutations *FLT3* ne sont pas une classe distincte dans la classification OMS 2016 [50], cependant, la détermination de la présence de ces mutations est recommandée par l'OMS en raison de leur importance pronostique[149].

Les mutations ITD procurent une activité permanente du gène *FLT3* et ceci par le détachement du complexe d'auto-inhibition du domaine juxta-membranaire [169]. Les études ont montré que la plupart des mutations ITD (95%) contiennent des résidus correspondant à des acides aminés (AA) en position 591-599 de la région juxta-membranaire et plus précisément l'AA le plus critique et influant est l'arginine en position 595 [170].

Dans notre cohorte, la mutation ITD est trouvée principalement à l'état hétérozygote (**figure 28**), ceci est conforme avec les rapports déjà enregistrés [171–173]. En effet dans les clones blastiques, sa présence dans un allèle et sa suppression dans le second a été démontrée dans certaines LAM. Lorsque cette mutation est à l'état hétérozygote, elle est suffisante pour déterminer un mauvais pronostic de la pathologie[171]. Cependant, il y a des études qui ont prouvées qu'il peut y avoir une perte partielle ou complète de l'allèle de type non muté ; un ratio élevé de l'ITD/*WT* (wild-type) est un autre mauvais facteur pronostic clinique. En effet, la présence d'un génotype hémi-zygote ITD/- qui se trouve dans 1 % des patients pédiatriques et à 5 % des patients adultes est associée à un phénotype bien distinct des autres avec une réponse au traitement et un pronostic plus sévère que les autres[171].

Des différences dans l'intensité des bandes mutantes ont été observées chez les patients *FLT3-ITD*<sup>+</sup> ; il y a ceux avec une bande mutante intense et non muté plus faible, d'autre a les deux bandes sauvages intenses et un autre a une bande sauvage plus intense que la mutante. Mais il n'y avait pas un cas de perte d'allèle sauvage ce qui est différent de ce que **Whitman** et son équipe ont trouvé [171]. Plusieurs études ont montré que l'intensité des bandes et la longueur des fragments dupliqués détectées sur électrophérogramme par PCR à amorces fluorescente et analysées par un logiciel « Gene Mapper », peuvent avoir une influence sur le pronostic de ces patients [171,174].

Dans un groupe total de 60 patients, On a trouvé 4 patients porteurs de la mutation *FLT3-ITD* au niveau de l'exon 14-15, ce qui représente seulement 6,6%. Cette fréquence est faible comparée à ce qu'on trouve dans la littérature, mais elle est semblable à ce que **Kang et**

*al.* [17] ont trouvé avec la même taille de population d'étude. Cependant, **Krstovski et al.** ont enregistré une fréquence plus basse (4.7%)[172]. Nos résultats sont plus faibles de ce que **Frohling et al.** [175] et **Al mawali et al.**[173] ont trouvé (32%). Selon plusieurs études faites dans différents pays la prévalence de la *FLT3-ITD* varie de 20-30% dans les pays occidentaux [176] et de 13-18% dans les pays asiatiques [177]. Quand à l'Afrique, il y avait un manque de documentation liée à ce sujet et les seuls documents qui étaient à notre disponibilité étaient ceux d'une étude faite au Maroc sur 33 patients atteints de LAM et qui a rapporté une fréquence de 18% [178] et d'une autre faite en Afrique du Sud avec une fréquence d'incidence de 12% [179]. On remarque qu'on dépit de la similitude entre la population Algérienne et Marocaine, il y a une différence dans l'incidence de cette mutation.

Ce résultat correspond au profil de trois patients de type LAM2 (75%) et un patient LAM5 (25%). La fréquence d'incidence de la mutation ITD dans les type FAB est variable d'une étude à l'autre, mais selon la littérature elle est plus commune dans le type de leucémie promyélocytaire aigue (APL) 15%-40% [180] et les LAM5, avec une faible fréquence dans les LAM2, LAM6 et les LAM7.

Cependant, nos résultats sont différents; le type de LAM le plus muté est le M2 (75%) et le M5 avec (25%), alors qu'aucun des patients LAM3 ne portait la mutation. La prédominance du LAM2 dans le groupe des mutés n'est pas un résultat exclusives à notre étude ; d'autres ont trouvé la même chose comme au Mexique [181] alors qu'en Allemagne **Blau et al.**[182] ont trouvé que le type le plus muté est le M5 et le plus faible le M2, **Ahmad et al.**[177] en Inde ont trouvé qu'elle est plus fréquente en M0, à Oman[173] et en sud-est de Chine[183] la ITD trouvée dans les type M1 et elle est moins fréquente en M6 et M5 respectivement. La raison de cette différence de distribution reste encore peu claire, mais elle peut être liée à la différence de localisation géographique ou bien à l'ethnicité des populations étudiées.

Deux des patients porteurs de la mutations ITD ont un caryotype normal, 1 patient a un caryotype complexe et un autre au est porteur de la t(8 ;21). Ces résultats sont conformes aux rapports précédents, où la mutation ITD est présente avec une fréquence importante chez les patients à caryotype normal suivi de la présence de la mutation t(8 ;21). Cependant, les mutations ITD sont aussi corrélées avec des anomalies chromosomiques telles que les t(15 ;17)(q22 ;q12) dont le résultat est la protéine chimérique PML-RARA, qui sont trouvées

dans les LAM3 et les altérations du gène MLL[77], ce qui n'était pas le cas dans notre population.

La comparaison des critères biologiques et cliniques tels que le sexe, l'âge, résultats de l'hémogramme et du myélogramme entre le groupe des patients porteurs de la mutation et le groupe non muté n'a affiché des différences statistiquement significatives que pour les taux des plaquettes, ou ils sont considérablement faibles dans le groupe muté comparé à celui du groupe non muté ( $p=0,003$ ).

La moyenne d'âge des patients mutés est 39,5 ans, l'âge de tous les patients FLT3-ITD est inférieur à 60 ans et les cas FLT3-ITD sont plus jeunes. Ces résultats sont semblables à ceux trouvés au Maroc [178], l'Afrique du sud[179] et aussi à ce qu'ont trouvé **Döhner et al.**[184] mais sont opposés à ce qu'a été reporté en Amérique où la médiane d'âge été plus élevée (64 ans)[185].

L'incidence de la mutation ITD est associée avec l'âge, elle est trouvée à 23,1% chez les jeunes adultes et à 34% de patients LAM dont l'âge est supérieur à 55[176]. En opposée elle est trouvée seulement à 10% dans les LAM pédiatriques et 4,3% chez les enfants âgés de moins d'un an, suggérant ainsi que les aberrations génétiques sont cumulées avec l'âge et la fréquence de l'apparition de la mutation FLT3-ITD augmente avec l'âge[186].

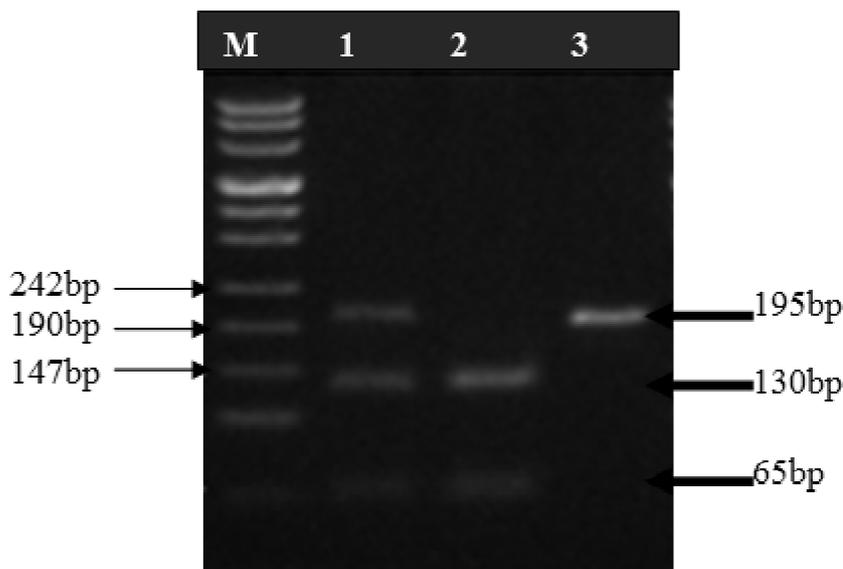
Les mutations ITD sont étroitement associées à une hyperleucocytose élevée, un pourcentage important de blastes dans le sang périphérique et la moelle osseuse, indiquant que la mutation a un effet biologique dans la prolifération cellulaire[77]. Ces données ont été confirmées par plusieurs études[181,183]. Par contre, dans nos résultats on a trouvé que la moyenne de leucocytose dans le groupe FLT3-ITD est plus faible que celle du groupe sauvage, ce qui était semblable à d'autres études[182,187], **Tong et al** [188] ont enregistré une moyenne encore plus faible ( $13 \times 10^9/L$ ).

Il a été démontré et accepté dans la littérature qu'un taux élevé de leucocytes et de plaquettes sont un mauvais facteur de pronostic et de réponse au traitement dans les groupes cytogénétiques à risque intermédiaire dans les leucémies aiguës myéloïdes [189,190], et compte tenu du fait que la mutation FLT3-ITD est à son tour un mauvais facteur de survie globale, la liaison entre le deux (FLT3-ITD et taux de leucocytose) et leur impact sur la survie et la réponse au traitement à fait le sujet de plusieurs études.

**1.2. La *FLT3*-TKD (D835) :**

Le second type de mutation trouvé et qui est également au niveau du récepteur *FLT3* est le remplacement d'un résidu acide aminé dans le domaine tyrosine kinase (TKD). Il s'agit d'une mutation faux-sens au niveau de l'exon 20, impliquant le codon de l'acide aspartique 835. La D835Y est le résultat d'une substitution GAT >TAT; changement de l'acide aspartique (D) en tyrosine (Y).

Tout comme la mutation *FLT3-ITD*, la TKD aussi procure une activation permanente en stimulant une phosphorylation tyrosine et en provoquant une prolifération incontrôlée des cellules. Les études faites sur l'implication de la TKD dans les LAM ne sont pas aussi fréquentes que celles de l'ITD néanmoins, elles affirment toutes que la fréquence de la TKD chez les patients atteints de LAM est plus faible que celle de l'ITD. En fait, les mutations TKD sont trouvées seulement dans 5 à 10% de LAM [191].



**Figure 29:** profil de la restriction de l'*EcoRV* des produits de PCR de la TKD.

M : marqueur de taille.

1: hétérozygote muté.

2: homozygote sauvage.

3: homozygote muté.

L'observation des résultats de la PCR-RFLP concernant la mutation D835 a donné ce qui suit :

- Deux bandes l'une d'une taille de 65 pb et l'autre de 130 pb, représentant l'homozygote non muté.
- Trois bandes de tailles différentes, représentant l'hétérozygote muté.
- Une seule bande de la taille de 195 pb, représentant l'homozygote muté.

Deux de nos patients sont hétérozygotes et un seul est homozygote.

### **Incidence du *FLT3*-TKD :**

Sur les 60 échantillons étudiés, la mutation TKD (D835Y) au niveau de l'exon 20 est trouvée seulement chez 3 patients avec une fréquence de 5%. Cette fréquence est tout a fait semblable à ce qui a été rapporté précédemment, elle est en effet en accord avec ce que **Mead *et al.*** ont trouvé (5,7%) [192], **Elyamani *et al.*** [187] (4,1%), au Maroc aussi ils ont enregistré une fréquence plus faible que ce qu'on a trouvé (3,03%)[178] et elle est à 3.3% dans les leucémies aiguës pédiatriques[193]. La fréquence la plus élevée enregistrée dans la littérature est celle de **Fröhling *et al.*** avec une incidence de 14% [175].

Cette mutation est observée chez les patients LAM de type M2 (33,33%), M1 (33,33%) et M4 (33,33%). Ainsi il n'y avait pas une prédominance d'un type de donné de LAM, en fait, chacun des patients est de type différent (M2, M1 et M4) et encore aucun de nos patients LAM3 recrutés n'est porteur de la mutation. Ces résultats sont semblables à ceux d'une méta-analyse faite en 2012[194] et sont opposés à d'autres rapports montrant que la fréquence de la TKD est entre 10-20% dans les leucémies APL[180]. Malgré que la fréquence de TKD dans les APL est relativement élevée comparée aux autres types FAB, cette mutation ne représente pas des caractéristiques cliniques bien distincts et ne semble pas avoir un effet consistant sur le pronostic des patients APL[180]. D'une autre part, **Yamamoto *et al.*** ont enregistré une fréquence élevée de la mutation dans les type LAM5 et LAM0[90].

Alors que les duplications sont reconnues comme de mauvais pronostic, et sont plus fréquemment observées dans les LAM de profil relativement stéréotype : hyper leucocytaires, a caryotype intermédiaires, les mutations *FLT3*-TKD sont beaucoup plus largement distribuées au sein des différents types de LAM et sont deux a trois fois moins fréquentes que les duplications ; leur impact sur le pronostic est de fait plus difficile a évaluer.

Aucun des patients ne fait partie du groupe à risque favorable selon la classification OMS. Deux patients ont un caryotype normal (66,66%) et un autre un caryotype complexe (33,33%). La mutation TKD semble être plus commune dans les groupes cytogénétiques à risque favorable et intermédiaire[194]. Les résultats d'une méta-analyse[195] réalisée par une équipe australienne qui porte sur des patients adultes atteints de LAM dont les données clinico-biologiques ont été rapportés dans vingt et une références (2000-2012) a confirmé que les mutations FLT3-TKD sont retrouvées de façon privilégiées dans les LAM avec inversion du chromosome 16 (groupe de risque favorable).

Contrairement aux données de la littérature, nos patients porteurs de la TKD ne font pas partie du groupe à risque favorable. Dans une étude faite par Thiede *et al.*[196], la fréquence de la mutation TKD s'est avérée plus élevée dans le groupe de patients à caryotype normal (60,3%).

Il paraît que l'incidence de la mutation TKD n'est pas liée au sexe, selon plusieurs rapports sur cette mutation, il a été reporté que le sexe des patients n'influence pas l'apparition de cette mutation[194,197].

L'analyse des caractéristiques clinique et biologiques des patients selon la présence ou l'absence des mutations a montré que les patients mutés sont plus jeunes que ceux non mutés et les différences des taux de leucocytes et des plaquettes sont statistiquement significatives où le groupe muté affiche des taux plus faibles ( $p=0,01$  pour les leucocytes et  $p<0,0001$  pour les plaquettes).

La relation entre la mutation TKD et l'âge demeure peu clair, mais dans notre population d'étude la moyenne d'âge des patients TKD+ est de 57 ans, elle est un peu plus élevée comparée au groupe *FLT3-ITD*<sup>+</sup> (39,5). Aucun des patients n'est âgé de plus de 60 ans. Ces résultats sont conformes avec ce que **Kiyoi *et al.***[176] ont trouvé ; leur population comportait toutes les tranches d'âge, la plus grande fréquence était chez les adultes mais aucun patient n'était âgé au-delà de 60 ans. Alors que l'étude faite par **Bacher *et al.***[198] a démontré que la population mutée était plus âgée que la notre et qu'elle contenait des patients âgés au-delà de 60 ans (allant jusqu'à 84 ans). En conclusion, après lecture des résultats de méta-analyses faites sur la TKD, il paraît que l'âge n'a aucun effet[90,194,197].

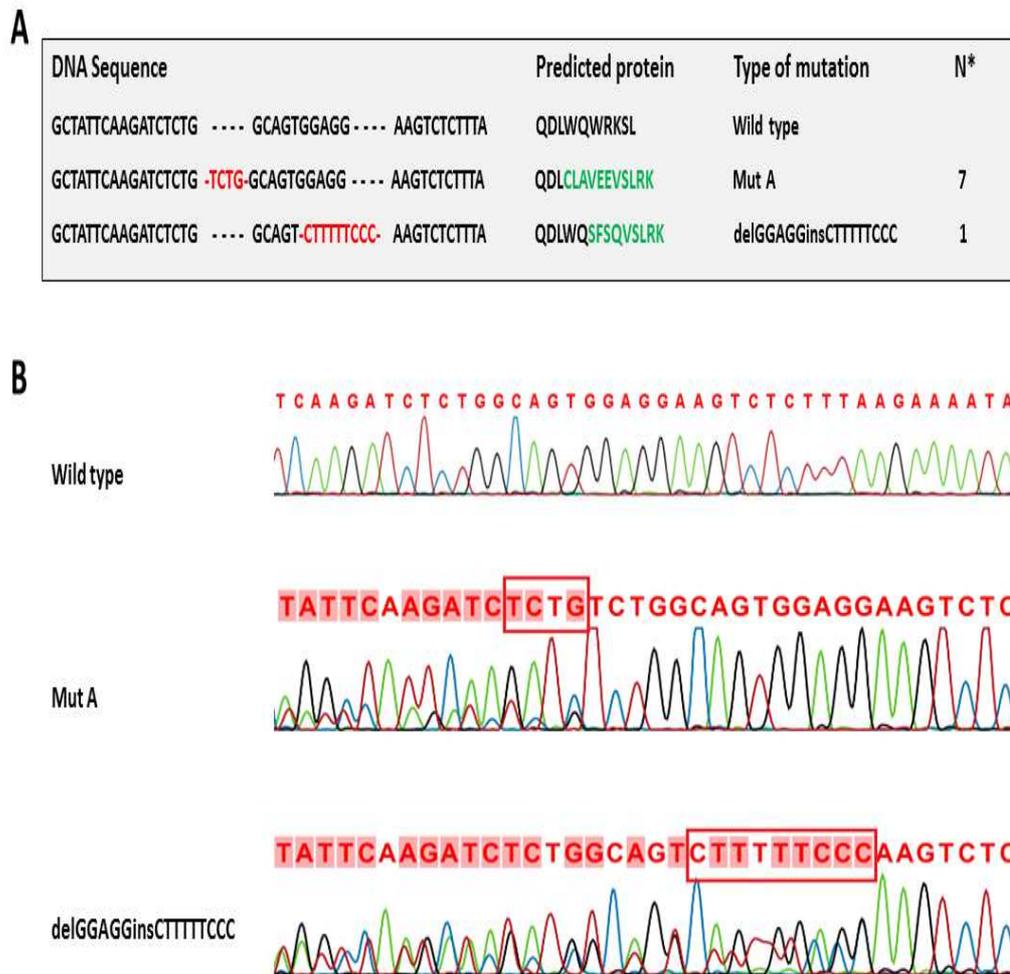
Contrairement à la FLT3-ITD qui est liée à une hyperleucocytose, la TKD est caractérisée d'une leucocytose normale à faible. Dans notre étude la moyenne était significativement plus faible que celle du groupe non muté (11,66 vs 59,65  $\times 10^9/L$ ) avec une

$p=0,01$ , ce qui était en accord ce que **kiyoi *et al.***[176] ont trouvé mais en désaccord avec plusieurs études[183,194,198].

**2. Le séquençage de l'exon 12 du gène *NPM1* :**

Les 60 échantillons d'ADN ont été soumis à une amplification partielle de l'exon 12 du gène *NPM1*. Seuls 53 échantillons ont été correctement amplifiés et prêts pour le séquençage.

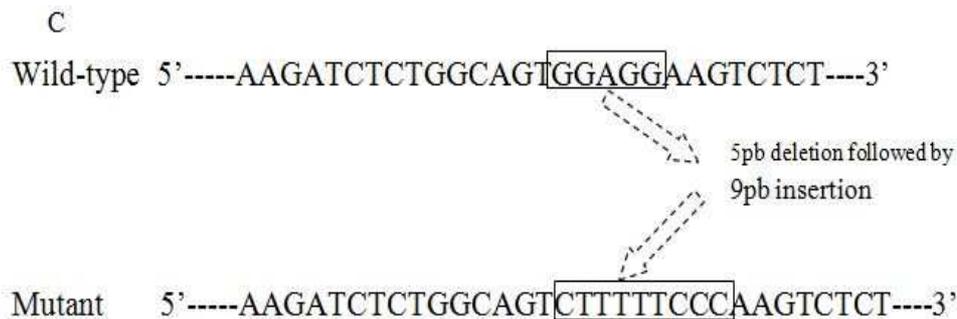
La vérification de la qualité des 7 échantillons amplifiés a été réalisée avec un gène de contrôle ou gène ménager (HouseKeeping Gene) qui est le GAPD (NM\_002046). L'ADN de ces échantillons était de bonne qualité, une des explications possible serait la présence d'autres mutations. Selon *ENSEMBL* [199], la séquence de nos amorces se trouve au niveau des points chauds de l'exon 12 du gène *NPM1* où plusieurs mutations COSMIC et variants qui sont d'origine insertion/délétion ou des SNPs ont été décrits [199].



**Figure 30:** Mutations dans l'exon12 de *NPM1*.

### Explications de la figure 30 :

A) Les nucléotides mutés et la séquence d'acides aminés prédite dans l'exon 12 du gène *NPM1* trouvés dans notre étude sont présentés en comparaison avec la séquence non mutée. Type de mutation (Mut A) est désigné selon un les rapports précédents. Le rouge indique les insertions de nucléotides. Les acides aminés sont donnés en code par lettre. Les acides aminés modifiés sont indiqués en vert. B) Images des résultats de séquençage des échantillons non mutés et des échantillons mutés.



**Figure 31:** Schéma de la mutagenèse de la nouvelle mutation décrite avec suppression de 5 pb et une insertion de 9 pb en position c869\_873.

### 2.1.Fréquence des mutations *NPM1*

Parmi les 53 échantillons séquencés ont a trouvé 8 patients mutés au niveau de l'exon 12 du gène *NPM1* avec une incidence de 15,09%, 7(87,5%) patients d'entre eux sont porteurs de la mutation de type-A, définie par une insertion de 4 paires de nucléotides (TCTG) en position c860-863 (NM\_002520.6: c.860\_863dupTCTG) (**figure 30**). Un autre résultat très important est l'observation d'une nouvelle mutation complexe non répertoriée chez un patient. Cette mutation unique et complexe c.869\_873delGGAGGinsCTTTTCCC est une délétion de cinq nucléotides GGAGG en position c.869\_873 et l'insertion de neufs paires de nucléotides CTTTTCCC (**figure 31**).

Les mutations du gène Nucleophosmin1 au niveau de l'exon 12 (mutations *NPM1*) représentent les aberrations moléculaires les plus fréquentes trouvées chez les patients atteints de LAM. Bien que les mutations du gène *NPM1* soient secondaires aux mutations du DNMT3A et qu'elles participent à des interactions géniques complexes susceptibles d'altérer le pronostic. En 2008 elle était juste une entité provisoire [200] parce que la signification biologique et l'impact pronostique des aberrations chromosomiques additionnelles dans la

LAM avec *NPM1* mutée n'étaient pas entièrement claires. Les récentes découvertes sur les conséquences cliniques et les associations avec *NPM1* ont soutenu les mutations *NPM1* en tant qu'entité distincte dans la LAM, présentant des caractéristiques génétiques, pathologiques, immunophénotypiques et cliniques spécifiques par rapport aux autres classes de l'OMS 2008, et conduit à la mise à jour en 2016 où les mutations du gène *NPM1* sont devenues une entité leucémique distincte.

Nos résultats rapportent la présence de la mutation *NPM1* dans 15,08% des patients, cette fréquence est faible comparée à ce qui est cité dans la littérature où elle varie entre 20-35% chez les patients à caryotype non déterminé, tandis qu'elles peuvent être observées dans près de la moitié des patients avec un caryotype normal [116,201]. Plusieurs études faites sur ce sujet ont rapportés différentes fréquences, comme 45,8% en Egypte [202], 20,8% en Iran [203], 29,9% en Corée du Sud [204], 7,5% a été enregistré en Afrique du Sud [179], 40,4% en Allemagne [205] et 60,8% au Royaume-Uni [206].

Les mutations décrites par **Falini** et ses coéquipiers [201] sont les plus communes, la plus fréquente d'entre elles est appelée mutation A (rs587776806) trouvée dans environ 80 % des cas, elle consiste en la duplication de tétranucléotide TCTG en position c860-863, type B (rs587776806) insertion de CATG en position c863-864, type D aussi consiste à une insertion CCTG en position c863-864 (rs587776806). De plus, la fréquence des mutations hors l'exon12 reste encore inconnue, comme la plupart des grandes études limitent leurs analyses à l'exon 12.

Parmi les patient *NPM1*<sup>+</sup> de notre population d'étude, le type de mutation le plus fréquent est le type A, ce qui confirme ce qu'à montré **Falini et al.** concernant cette mutation [201] avec une absence totale des autres types de mutations, dans diverses études menées sur les mutations du *NPM1* on ne trouve pas un seul type de mutation mais au moins le type A suivi du type B [201,202,204], l'absence des autres types de mutations dans notre cohorte peut être due à la taille réduite de nos échantillons ou bien à un caractère spécifique de la population Algérienne, des études doivent être menées avec des tailles de population plus importantes pour pouvoir le confirmer

D'une façon indépendante du type de la mutation qui touche l'exon 12 du gène *NPM1*, les variant de l'exon 12 de la *NPM1* causent une élongation de la protéine nucléophosmine 1 et engendrent un décalage du cadre de lecture (frame shift) qui conduit à des altérations communes au C-terminale de la protéine, c.-à-d. le remplacement des derniers 7 acides aminés (WQWRSKL) conduit à des changements de résidus donnant ainsi un nouveau motif

de signal d'exportation nucléaire (NES) et tryptophane muté(s) en position 288 et 290 [201]. Par conséquent, ces mutations vont conduire à une présence d'un signal d'export nucléaire plus important que l'import engendrant ainsi une accumulation élevée de la nucléophosmin cytoplasmique.

Une dislocation cytoplasmique du *NPM1* muté est le résultat de la formation du nouveau motif NES et la perte du résidu tryptophane sont nécessaires pour la [207]. Non seulement la localisation cytoplasmique est une conséquence des mutations de *NPM1*, mais elle leur est exclusive, car la plupart des cas exprimant *NPM1c* portent la mutation *NPM1*, et aucun cas de *NPM1* restreint par un noyau n'est muté [201].

Les conséquences fonctionnelles de ces mutations sont mal connues à cause de l'implication de cette protéine dans divers processus cellulaires, mais la protéine anormale qui en résulte est limitée au cytoplasme et semble agir de manière dominante négative, inhibant ainsi l'allèle non muté *NPM1* [208] et étant donné que la protéine *NPM1* joue un rôle suppresseur de tumeur, ces altérations peuvent être cruciales dans la transformation cellulaire.

Tous les patients porteurs de la mutation sont hétérozygotes, ce qui est en accord avec d'autres rapports [201,208] ; les recherches ont démontré que ces mutations sont toujours trouvées à l'état hétérozygote. En effet, des études faites sur des souris modifiées (knockout) ont affirmé que l'homozygote mutant engendre une létalité au stade embryonnaire et malgré que les hétérozygotes mutés soient viables et fertiles, ils sont incapables de produire des homozygotes mutés [100].

Concernant les associations entre les caractéristiques biologiques des patients et la mutation, le tableau suivant résume les différences entre les deux groupes.

**Tableau 19:** Caractéristiques biologiques et cliniques des patients *NPM1*<sup>+</sup> et *NPM1*<sup>-</sup>

	<i>Mutations NPM1</i>		<i>P</i> valeur
	<i>NPM1</i> <sup>-</sup>	<i>NPM1</i> <sup>+</sup>	
<b>Total</b>	52	8	
<b>Sexe</b>			0,719
<b>Masculin</b>	29	5	
<b>Féminin</b>	23	3	
<b>Age</b>			0,151
<b>Médiane</b>	46	50	
<b>Moyenne ± écart type</b>	45,21± 15,47	53,75±16,4	
<b>Type FAB le plus commun (M2)</b>	44%	57,17%	0,118
<b>WBC (×10<sup>9</sup>/L)</b>			0,084
<b>Moyenne± écart type</b>	66,81±146,8	23,86±26,6	
<b>Hb (g/dL)</b>			0,894
<b>Moyenne± écart type</b>	7,8±2,07	7,9±1,2	
<b>Plaquettes (×10<sup>9</sup>/L)</b>			0,196
<b>Moyenne± écart type</b>	86,52±99,53	56,75±53,85	
<b>BM blastes (%)</b>			0,873
<b>Moyenne± écart type</b>	72,67±26,56	74.37±31,01	

- A l'égard du type de LAM de la classification FAB, on observe que le plus fréquent est le LAM2 avec 57,17% suivi de LAM5 (28,57%) et puis LAM0 (14,28%). Selon **Falini et al** (2011), les mutations *NPM1* sont les plus souvent retrouvées dans le type LAM4 et LAM5[209] chez des patients Italiens. A leur tour **Jeon et al.** ont trouvé des résultats semblables aux notre où la mutation est trouvée en LAM2 et LAM5 chez les patients Coréens [204]. **Loghavi et al.** ont enregistré une fréquence de mutation élevée dans les LAM1 et faible chez les LAM0 et LAM6 chez les patients Américains [210]. La mutation du gène *NPM1* est rarement retrouvée dans les LPM (M3) [184,201].

- La revue des rapports de littérature a montré que les mutations *NPM1* sont significativement très fréquentes chez les patients LAM adultes à caryotype normal. En fait, environ 85% des patients atteints de LAM *NPM1*<sup>+</sup> ont un caryotype normal, tandis que les autres patients (~ 15%) présentent des anomalies chromosomiques principalement mineures qui sont probablement des événements secondaires [211–213].

- Dans notre population d'étude le nombre des hommes est le double de celui des femmes, ces résultats sont semblables à une étude réalisée par **Becker et al.**[210]. Cependant,

dans la majorité des études ont rapporté que chez les adultes *NPM1* mutés il y a une prédominance du sexe féminin malgré que le sexe masculin est le dominant dans les LAM [202,204,211].

- En ce qui concerne l'âge, nos résultats ont montré une moyenne d'âge de 53,75 ans chez les patients porteurs de la mutation et 45,21 ans chez les patients non mutés. Ces observations sont conformes avec ce qui a été rapporté dans la littérature où les moyennes d'âge des patients *NPM1*<sup>+</sup> varient entre 46-58 ans, alors que celle des patients *NPM1*<sup>-</sup> est entre 39-47 ans [204,214,215]. Cela peut être expliqué par le fait que les mutations *NPM1* toutes comme celles du *FLT3* sont le résultat de l'accumulation des différentes aberrations génétiques qui augmentent avec l'âge. Alors qu'une étude menée en Egypte a enregistré une moyenne d'âge plus faible que la notre, elle était 33.36 ans pour les *NPM1*<sup>+</sup> et 38 ans pour les *NPM1*<sup>-</sup> [202].

- La moyenne de leucocytose des patients *NPM1*<sup>+</sup> est nettement plus faible que celle du groupe non muté. Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés en Chine [183], en Egypte [202] et en Corée [216]. Mais souvent une mutation *NPM1* est associée à une hyperleucocytose [202,203,217]. Cependant, il paraît que cette différence n'influence en aucun cas l'apparition ou pas de la mutation selon une étude faite sur ce sujet [218].

- On a observé que le groupe *NPM1*<sup>+</sup> a une moyenne de plaquettes plus élevées que celle du groupe *FLT3*, ces résultats confirment une étude faite par **Hsu et Yung** qui ont étudié l'effet de *NPM1* mutant sur les cellules transfectées K563 et ils ont constaté que ces cellules ont acquis une très grande capacité de différenciation mégacaryocytaire, impliquant que les cellules blastiques en présence de la mutation *NPM1* peuvent acquérir une certaine capacité de la différenciation des thrombocytes [219].

Deux de nos patients *NPM1*<sup>+</sup> ont pu bénéficier d'une analyse immunophénotypiques, l'un d'eux a affiché une expression de CD34 à seulement 34% et CD33 à 94% et l'autre avait les CD34 à 3% et les CD33 à 95%. En dépit de ce nombre très réduit des résultats d'immunophénotypage, Nos données sont semblables à la littérature [184,201,211,220]. En effet, *NPM1*<sup>mut</sup> sont associées avec une expression réduite des CD34 dans les blastes mutants, expression augmentée des CD33 et une présence extra-médullaire.

### III. Réponse au traitement et survie des patients LAM:

#### 1. La population d'étude :

L'amélioration du pronostic des LAM a été possible par la stratification de la maladie en groupes de risques en fonction de la cytogénétique, l'évaluation du début de réponse au traitement, et l'identification de l'échec de la chimiothérapie d'induction. En ce moment, la probabilité de guérison dans les pays développés est supérieur à 60 %[221]. Selon le site d'analyse des données SEER, la survie à cinq ans des patients adultes atteints de LAM s'est améliorée au cours des dernières décennies (en Amérique) [222].

En septembre 2017, on a procédé à un suivi des dossiers des patients pour déterminer leur état final, la moyenne du suivi est de 16,83 mois [1-29 mois] (IC95% : 13.63-20.03). Parmi les patients LAM, 18 on atteints une rémission complète, 14 ont rechuté, 28 sont décédés pendant ou après la première thérapie d'induction.

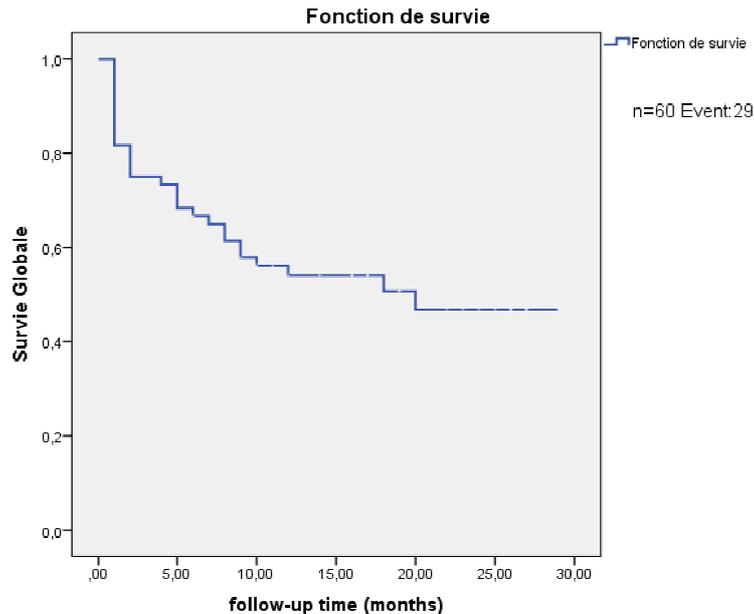
**Tableau 20:** Réponse au traitement (3+7) des 60 patients LAM

Etat	Réponse obtenue		Durée (mois)		
	Nombre	%	Moyenne	Médiane	Etendu
<b>Rémission complète</b>	18	30	18,61±5,6	17	9-29
<b>Rechute</b>	14	23	14,92±7,6	11	6-26
<b>Décès</b>	28	47	5±5,31	2	1-20
<b>Total</b>	60	100			

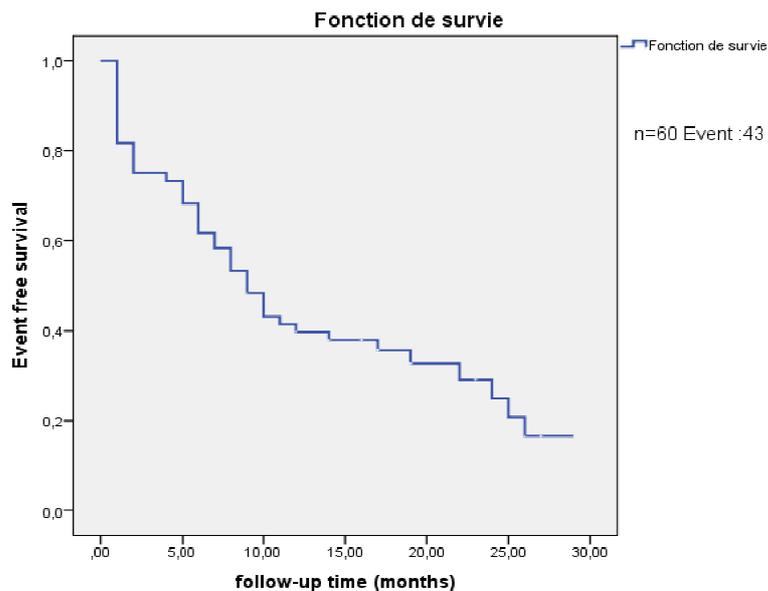
Dans notre population d'étude, le taux de rémission complète est 30% (**tableau 20**)ce qui est considérablement faible comparé à d'autres résultats ; 72% en Allemagne [182], , 76,9% en Corée du Sud [216] et 68,24% aux Etats Unies [210] et 82% au Royaume Uni [223].

Bien qu'un traitement d'induction efficace supprime les signes visibles de leucémie dans la moelle osseuse et restaure l'hématopoïèse chez les patients atteints de LAM de novo, un traitement de consolidation supplémentaire peut être nécessaire pour réduire les cellules tumorales résiduelles [224]. Plusieurs essais cliniques ont montré que chez les patients

atteints de LAM qui ont reçu une greffe en première rémission après avoir reçu une chimiothérapie d'induction et de consolidation affichaient de meilleurs résultats en termes de survie globale que ceux qui n'ont pas bénéficiés d'une allogreffe. [224–226]. Les quatre patients ayant bénéficié d'une allogreffe de la moelle ont eu une rechute tardive [9-22 mois]. Les patients qui ne reçoivent pas de traitement de consolidation sont plus susceptibles d'avoir une rechute, généralement dans les 6 à 9 mois.



**Figure 32:** Survie globale de la population



**Figure 33:** Courbe de la survie sans maladie de la population d'étude

Le taux de survie globale (OS) est 51,66%, alors qu'au Brésil, il est de 43,7% [227], au Royaume Uni 92% [223]. La moyenne de l'OS est 16,8 mois et la moyenne de la survie sans événement (EFS) est 13,2 mois.

Il y a de nombreux facteurs de risque associés à la survie chez les patients atteints de LAM ; facteurs de risque bien connus qui sont associés à un faible taux de survie tels que l'âge avancé, le pronostic défavorable ainsi que l'intensité du traitement. D'autres facteurs qui pourraient affecter la survie tels que le type de traitement ainsi que d'autres caractéristiques du patient, et sans oublier les facteurs socio-économiques.

**Tableau 21:** Les facteurs biologiques de pronostique

Facteurs	Valeurs		
	N	%	P
<b>Age</b>			<0,0001
< 60 ans	49	81,66	
≥60 ans	11	18,33	
<b>Leucocytose</b>			0,011
<30	32	53,33	
≥30	28	46,66	
<b>Plaquettes</b>			<0,0001
<50	32	53,33	
≥50	28	46,66	
<b>Blastose Médullaire</b>			<0,0001
<30 %	6	10	
≥30 %	54	90	

Les patients âgés de plus de 60 ans ont un taux de mortalité plus élevé que celui de ceux âgés de moins de 60 ans (**tableau 21**) (72,7% vs. 63%), avec une médiane de survie globale de 14 mois pour ces derniers et 8 mois pour les ≥60 ans.

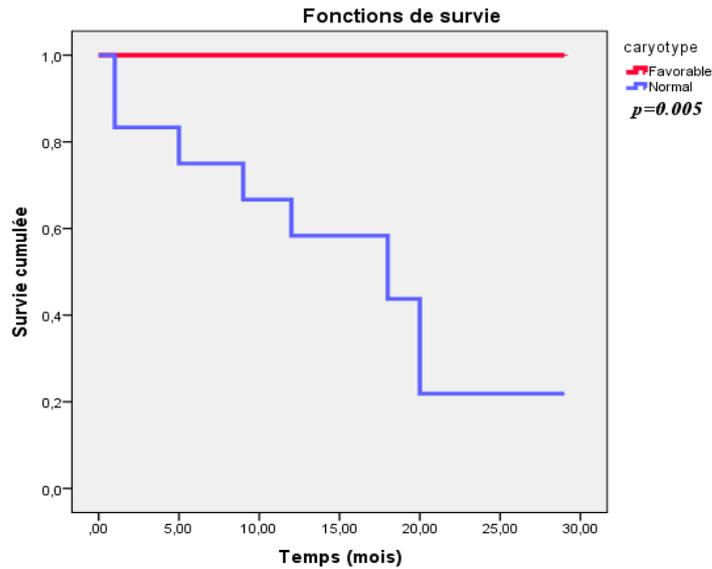
Les LAM chez les personnes âgées sont une entité distincte sur le plan clinique et biologique. Ainsi en se basant sur l'analyse des données cytogénétiques et moléculaires, il apparaît que les cellules leucémiques chez les patients les plus âgés sont naturellement résistantes à la chimiothérapie conventionnelle. En raison de comorbidités et des faibles réserves en cellules souches dans la moelle osseuse, les adultes plus âgés ne peuvent pas

tolérer la chimiothérapie myélo-suppressive ce qui en résulte des taux de mortalité élevés liée au traitement et à l'évolution de la maladie [228,229].

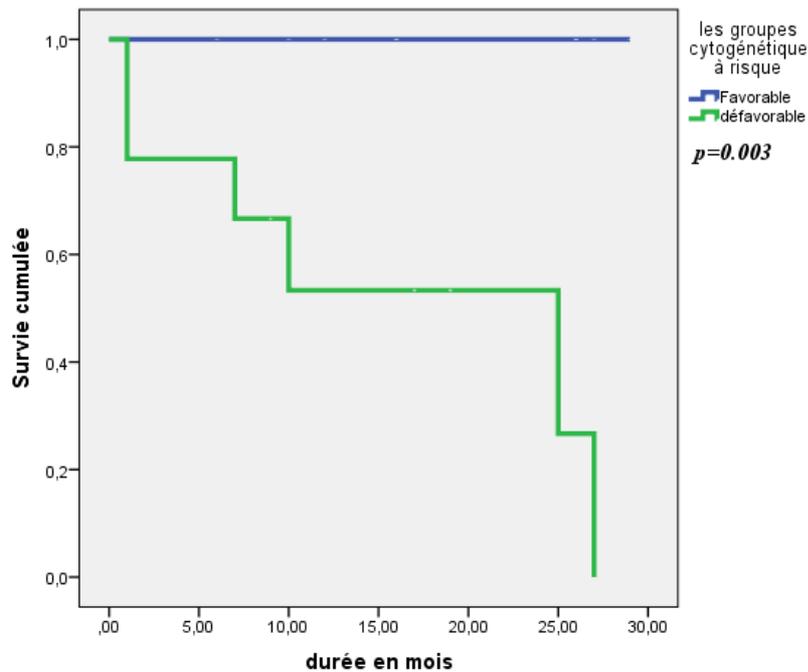
Dans notre cohorte, on a trouvé que le taux de leucocytose est un facteur pronostique statistiquement significatif dans l'analyse univariée, un taux de leucocytose élevé est corrélé avec un temps de survie globale et de survie sans maladie réduits. Ces observations sont conformes à la littérature [221,230], Cela peut être expliqué par le fait qu'un taux très élevé de leucocytes est associé à un risque accru de syndrome de lyse tumorale et de syndrome leucostatique (leucostase) [221]. Ces deux paramètres sont considérés comme des événements oncologiques très importants qui sont capables d'affecter le pronostic des patients. Le taux de leucocytose est le facteur de risque le plus important lié à l'échec du traitement, car il peut causer des complications hémorragiques et des problèmes respiratoires dus au syndrome leucostatique.

En ce qui concerne la classification morphologique des LAM, les patients LAM3 ont montrés un taux de survie meilleurs que celui des autres types (15,82 vs. 11,88 mois). En effet, après l'introduction de l'ATRA dans le traitement des LAM type M3 caractérisés par la t(15 ;17), ce dernier est considéré comme le type qui donne le pronostic le plus favorable et ce en raison de l'effet du traitement qui induit la différenciation des blastes leucémiques [221,231,232].

En ce qui concerne les résultats de la cytogénétique, 42,85% des patients ont un caryotype normal faisant ainsi partie du groupe à risque intermédiaire, le groupe favorable présente 36,66%, ces résultats sont conformes avec la littérature où il a été rapporté que le groupe intermédiaire et plus précisément les patients avec caryotype normal sont les plus fréquents dans les LAM adultes *de novo* [227,233].



**Figure 34:** Courbe de survie selon le groupe à risque (favorable vs. intermédiaire)



**Figure 35 :** Courbe de survie selon le groupe à risque (intermédiaire vs. défavorable)

Le calcul du taux de la survie rapporté à la cytogénétique en comparant dans les premiers temps la survie des patients faisant partie du groupe à risque favorable et ceux présentant un caryotype normal et dans un deuxième temps, des patients du groupe à risque favorable et ceux du groupe à risque défavorable. Dans les deux cas les données de cytogénétiques se sont montrées comme un outil clé et significatif dans le pronostic des LAM ( $p= 0,005$  et  $p=0,003$ ). Il y avait une baisse significative de la courbe de survie des patients ayant un caryotype normal comparé à ceux avec un profil cytogénétique associé au risque

favorable avec un taux de survie de 100% pour ce dernier groupe et 41,66% pour le groupe à caryotype normal (moyenne de survie 18 vs. 15,6 mois). Alors que, les patients avec caryotype anormal ont une survie globale plus importante que celle des patients appartenant au groupe défavorable où le taux de survie a baissé jusqu'à 33,33% (15,6 vs. 12 mois). Nos résultats sont conformes à la littérature[221,234].

Cependant comme il a été démontré précédemment, les patients appartenant au groupe intermédiaire (avec un caryotype normal) représentent le groupe le plus fréquent, une partie des patients de ce groupe affiche une bonne réponse au traitement alors que l'autre partie affiche une mauvaise réponse au traitement, pour cela des études récentes se sont focalisées sur la description de nouveaux biomarqueurs dans le but d'améliorer la classification du groupe à risque intermédiaire. La dernière classification a incorporé les gènes *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA* et *c-Kit* dans l'approche standard du diagnostic des patients LAM et les études ont montré que ces mutations peuvent révéler des informations importantes pour le pronostic des patients [235,236].

**Grossman *et al.*** [237] ont publié un nouveau modèle de classification basé uniquement sur un panel de mutations moléculaires réalisé à l'aide de la technologie du NGS (next generation sequencing). Cinq groupes ont été ainsi identifiés :

- 1- Très favorable : avec le réarrangement PML-RARa ou la double mutation du CEBPA avec un taux de survie globale de 82,9% à 3 ans.
- 2- Favorable : *RUNX1-RUNX1T1*, CBFβ-MYH1 ou les mutations *NPM1* sans *FLT3-ITD* avec un taux de survie globale de 62,6% à 3 ans.
- 3- Intermédiaire : l'absence de toutes mutations faisant partie du groupe 1, 2, 4 ou 5 avec un taux de survie globale de 44,2% à 3 ans.
- 4- Défavorable : comportant les mutations MLL-PTD, *RUNX1* et/ou *ASXL1* avec un taux de survie globale de 21,9% à 3 ans.
- 5- Très défavorable : représenté par les mutations du gène TP53 avec un taux de survie globale de 0% à 3 ans.

Cette caractérisation moléculaire complète fournit un modèle plus puissant pour la prédiction pronostique par le biais des plateformes de séquençage cytogénétique et conventionnelle seulement.

**2. FLT3-ITD et survie globale :**

Tous les 4 patients FLT3-ITD positif sont décédés après une rechute sauf un et le groupe FLT3-ITD non muté présente un taux de rémission complète de 32,14%, taux de rechute de 23,21% et un taux de mortalité de 44,62%.

La moyenne de survie globale du groupe muté est 11,85 mois (étendu 6-20 mois) et 13,5 mois (étendu 1-29 mois) du groupe non muté. La moyenne de la survie sans maladie du groupe FLT3-ITD positif est 9,5 mois et 10,98 mois pour le groupe FLT3-ITD négatif.

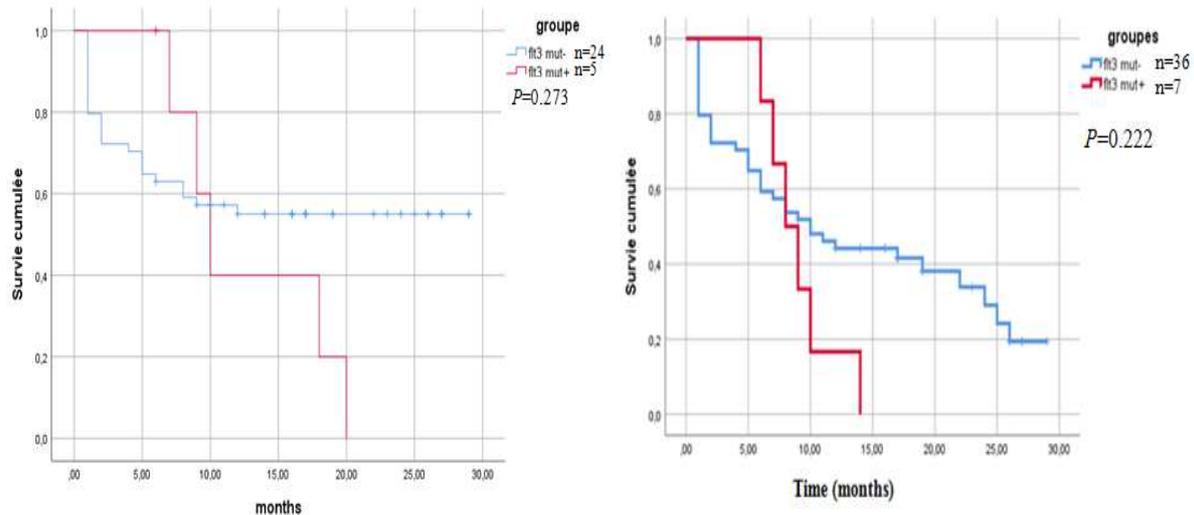
**3. FLT3-TKD et survie globale:**

Tous les 3 patients porteurs de la mutation D835Y sont décédés. Le taux de rémission complète du groupe *FLT3*-TKD négatif est de 31,57%, le taux de rechute est de 24,65% et le taux de mortalité est de 43,85%. La moyenne de survie globale du groupe porteur de la mutation est de 12 mois. La moyenne de survie globale du groupe non muté est 11,69 mois.

L'analyse de la survie entre les patients porteurs d'une mutation activatrice *FLT3* (ITD et TKD) et les patients sans mutation a donné le tableau qui suit :

**Tableau 22:** Réponse au traitement des patients *FLT3*<sup>+</sup> et *FLT3*<sup>-</sup>

<i>Etat</i>	<i>FLT3<sup>-</sup></i>	<i>FLT3<sup>+</sup></i>	<i>p valeur</i>
<i>Rémission</i>	18	0	0,06
<i>Rechute</i>	13	1	0,54
<i>Décès</i>	22	6	<b>0,02</b>
<i>Le total</i>	53	7	



**Figure 36:** Courbes de survie globale et l’EFS selon la présence ou l’absence des mutations *FLT3*

En analysant la survie globale et la survie sans maladie en fonction de la présence ou de l’absence des mutations activatrices du *FLT3* (ITD et TKD), on a trouvé qu’aucun des patients ITD et TKD n’a pu atteindre une rémission complète et que seulement un patient ITD a rechuté. Le groupe *FLT3* positif a un taux de mortalité significativement plus élevé que le taux de survie (85,71% vs. 14,28%), cependant, dans le groupe *FLT3* négatif le taux de survie est significativement plus élevé que celui de la mortalité.

Plusieurs équipes de recherches ont tenté d’élaborer ce qu’on appelle « un modèle pronostique » en évaluant les différentes altérations cytogénétiques et moléculaires et leur relation avec les résultats cliniques[237,238]. Ces travaux ont conclu que la présence de la mutation ITD chez les adultes n’a pas d’impact sur le fait que ces patients puissent atteindre ou pas une rémission complète, mais est significativement corrélé avec un risque de récurrence très élevé, réduit le temps de vie sans maladie et réduit également la survie globale. D’autres auteurs ont montré que le *FLT3*-ITD a été le plus important facteur pronostique indépendant dans la prédiction de la survie chez les patients de moins de 60 ans. Ces conclusions ont été soutenues par une méta-analyse faite par **Yanada et al.**[197] qui confirment l’importance et l’impact de cette mutation sur la survie des patients. Au contraire, **Richard et al.**[233] ont trouvé que le *FLT3*-ITD ne présentait pas un important facteur pronostique et que cette mutation n’a aucune influence sur la survie des cas étudiés.

A la lumière des résultats et de la littérature, l’importance pronostique des mutations TKD est moins claire. En raison de la prévalence relativement rare de ces mutations et du nombre réduit des études faites sur ce sujet. Cependant, des méta-analyses ont été réalisées

sur l'impact des mutations TKD sur la survie et la réponse au traitement, dans notre population d'étude, tous les patients TKD+ sont décédés. Ces résultats sont conformes avec la méta-analyse faite par **Yanada *et al.*** en 2005, et qui a montré que la mutation TKD avait un effet négatif sur les patients LAM et son importance a été, de façon inattendue, comparable à celle de la-ITD en ce qui concerne la survie sans maladie. Ces résultats appuient l'idée que *FLT3* joue un rôle déterminant dans la configuration des caractéristiques cliniques des LAM, et suggèrent que la présence ou l'absence de ces mutations peut contribuer à l'efficacité de la stratification du traitement[197].

Par ailleurs, une autre méta-analyse faite en 2012 par **Li *et al.*** a trouvé des résultats différents, en effet, ils ont montré que les patients qui ont la mutation FLT3-TKD avait un pronostic plus favorable que celui de FLT3-ITD et surtout quand ces patients appartenaient au groupe cytogénétique intermédiaire (ce qui était le cas de nos patients mutés), suggérant que la détection de cette mutation doit seulement être recommandé pour les patients qui ne font pas partie du groupe intermédiaire [194].

Les mutations ITD et TKD sont supposées avoir la même conséquence fonctionnelle c'est à dire la perte du contrôle de l'auto-inhibition et une activation permanente du récepteur tyrosine kinase, or il s'avère que l'impact de ces mutations sur le pronostic et la survie globale est différent, cela peut être la conséquence des différentes voies de signalisation déclenchée par cette activation ou pourrait aussi indiquer que les mutations ITD sont simplement un marqueur de l'instabilité génétique cellulaire qui peut provoquer d'autres mutations pas encore répertoriées.

Plusieurs études se sont focalisées sur le caractère de mutabilité des mutations *FLT3* chez les patients LAM au moment du diagnostic et en cas de rechute, ces études ont toutes conclus que le statut des FLT3-ITD et FLT3-TKD changent après une récurrence. Les données recueillies montrent que 20% des cas affichent un gain ou une perte de ces mutations. En particulier, le gain de la mutation FLT3-ITD est plus important que celui de la TKD, tandis que, la perte de la mutation FLT3-TKD est plus importante que celle de la FLT3-ITD lors de la récurrence. Ces résultats suggèrent que les TKD sont plus sensibles à la chimiothérapie que les FLT3-ITD chez les patients LAM [198,239,240].

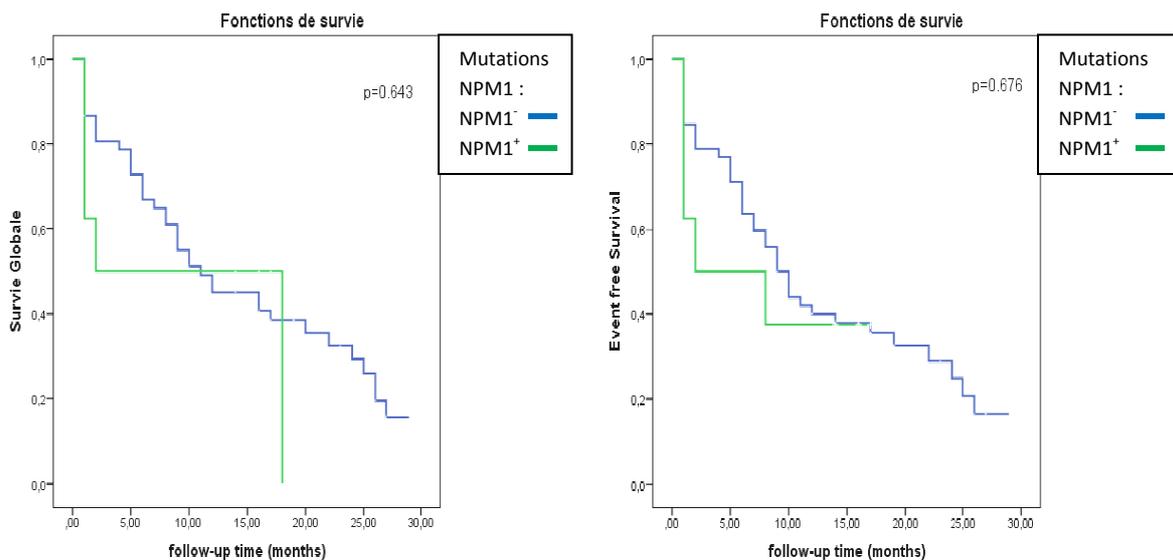
**4. Mutations *NPM1* et survie globale:**

En ce qui concerne les 8 patients *NPM1*<sup>+</sup>, le taux de la rémission complète est de 37,5%, ce taux est plus important comparé à celui des patients *ITD*<sup>+</sup> et *TKD*<sup>+</sup>. Dans le groupe des patients *NPM1*<sup>+</sup>, le taux de récurrence est significativement plus faible que celui des patients *NPM1*<sup>-</sup> ( $p=0,045$ ).

La moyenne de survie globale du groupe muté est de 9,62 mois alors que celle du groupe *NPM1*<sup>-</sup>, elle est de 14,25 mois. La moyenne de la survie sans maladie du groupe *NPM1*<sup>+</sup> est 14,25 mois. La différence de survie dans les deux groupes est non significative. La présence de la mutation n'a pas été liée à une amélioration en termes de survie globale et de survie sans maladie.

**Tableau 23:** Réponse au traitement des patients *NPM1*<sup>+</sup> et *NPM1*<sup>-</sup>

<i>Etat</i>	<i>NPM1</i> <sup>-</sup>	<i>NPM1</i> <sup>+</sup>	<i>p value</i>
<b>Total</b>	45	8	
<b>Rechute</b>			
<i>Oui</i>	10	0	<b>0,045</b>
<i>Non</i>	35	8	
<b>Evènement final</b>			
<i>En vie</i>	24	3	0,403
<i>Décédés</i>	21	5	



**Figure 37:** Courbes de survie globale et l'EFS selon le statut des mutations *NPM1*

Les LAM avec des mutations *NPM1* ont été reconnues comme des entités distinctes dans la dernière classification de l'OMS [50] et leur présence est liée à un pronostic favorable.

Analysées séparément des mutations *FLT3*, on a remarqué que les mutations *NPM1* ont seulement un impact sur la récurrence des patients mais, n'ont pas un effet positif sur la survie globale; la moyenne de survie globale des patients *NPM1+* est plus faible que celle des patients *NPM1-*. Nos résultats sont opposés à ce qui a été décrit dans la littérature, en effet, plusieurs études ont montré que la présence des mutations *NPM1+* est un facteur de prédiction positif pour la réponse à la chimiothérapie et est signe de bon pronostic et qu'elle améliore d'une façon significative les taux de survie, en plus les patients *NPM1+* avaient une probabilité de survie de 5 ans proche de celle des patients appartenant au groupe cytogénétique favorable [201,210,211,220].

Il est important de noter que l'effet positif des mutations *NPM1+* peut être renforcé ou inversé selon le contexte génétique dans lequel se trouvent ces mutations parce qu'elles peuvent interagir avec d'autres aberrations génétiques qui ont à leur tour un impact pronostic, par exemple le *FLT3* et le *DNMT3* qui selon **Papaemmanuil et al.** peuvent avoir un effet négatif sur les patients en dépit de la présence de la mutation *NPM1*, ce qui peut expliquer nos résultats [89].

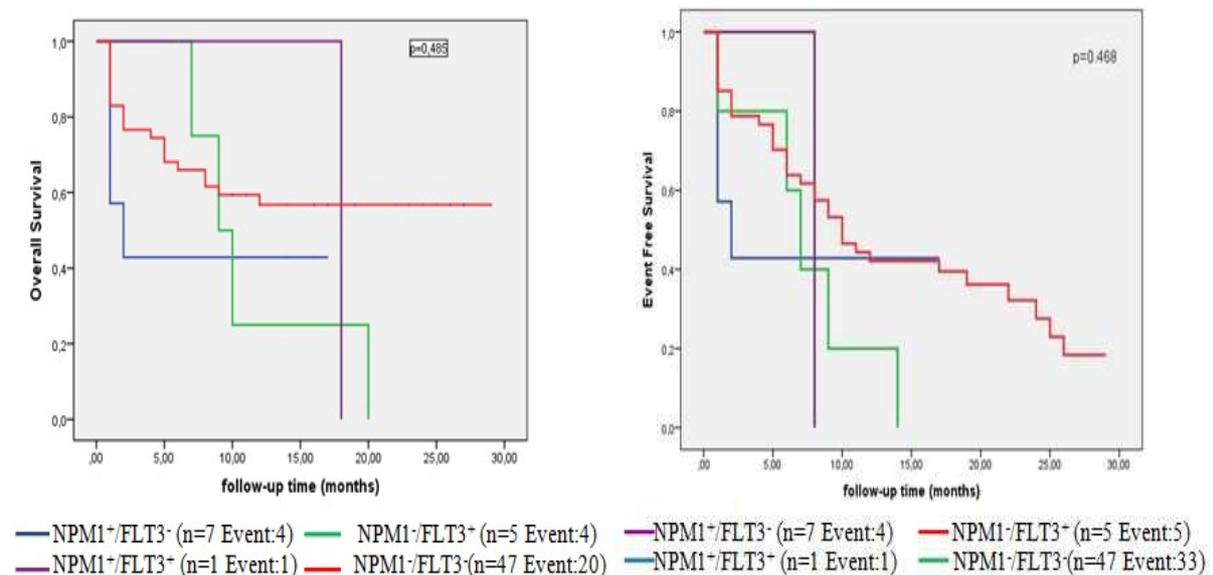
La comparaison entre l'effet des mutations du gène *FLT3* et *NPM1* nous a permis de confirmer l'effet négatif des mutations *FLT3* sur les patients LAM en termes de rémission complète, survie globale et survie sans maladie, on a remarqué que l'effet des mutations *NPM1* était mieux que celles des *FLT3* sur les patients LAM, ce qui est en accord avec des études précédentes [241,242].

Les mutations *NPM1* sont extrêmement stables durant la maladie et après la rechute, ce caractère de stabilité est lié au fait que ces mutations soient un événement primaire qui ne touche pas seulement les cellules différenciées mais aussi les progéniteurs myéloïdes et qui déclenche le développement tumoral [217]. Néanmoins, les mutations *NPM1* peuvent être perdues à la rechute, dans ces cas il est possible que la rechute soit due à un sous-clone mineur présent au moment du diagnostic ou soit due à l'acquisition d'une nouvelle mutation 'tardive' par les cellules pré-leucémiques. Alternativement, une rechute avec perte de la mutation *NPM1* peut représenter une LAM secondaire, non liée à la leucémie initiale [217,243,244].

5. Pour analyser l'effet des deux mutations (*FLT3* et *NPM1*) simultanément sur la survie on a groupé notre cohorte en quatre groupes : *NPM1*<sup>+</sup>/*FLT3*<sup>-</sup>, *NPM1*<sup>-</sup>/*FLT3*<sup>+</sup>, *NPM1*<sup>+</sup>/*FLT3*<sup>+</sup>, *NPM1*<sup>-</sup>/*FLT3*<sup>-</sup> et les résultats sont les suivants :

**Tableau 24:** Etats final des patients en fonction de la présence ou l'absence des deux mutations

Etat	<i>NPM1</i> <sup>+</sup> / <i>FLT3</i> <sup>-</sup>	<i>NPM1</i> <sup>-</sup> / <i>FLT3</i> <sup>+</sup>	<i>NPM1</i> <sup>+</sup> / <i>FLT3</i> <sup>+</sup>	<i>NPM1</i> <sup>-</sup> / <i>FLT3</i> <sup>-</sup>	<i>p</i>
<b>Récidive</b>					<b>0,047</b>
<b>Oui</b>	0	1	0	13	
<b>Non</b>	7	5	1	33	
<b>Evénement Final</b>					<b>0,022</b>
<b>En vie</b>	3	1	0	28	
<b>Décédés</b>	4	5	1	18	



**Figure 38:** Courbes de survie globale et l'EFS selon le statut *FLT3* et *NPM1*

On a remarqué que dans notre population d'étude, l'incidence des mutations *FLT3*-ITD est plus importante dans le groupe *NPM1*<sup>+</sup> que le groupe non porteur des deux mutations (14,28% vs. 6,6%), ce qui confirme que les mutations *NPM1* sont des aberrations primaires qui précèdent la survenue des mutations *FLT3*.

Le taux de rémission complète est plus important chez les patients *NPM1*<sup>+</sup>/*FLT3*<sup>-</sup> comparé à celui du groupe *NPM1*<sup>-</sup>/*FLT3*<sup>+</sup> (42,84% vs. 0%). Le taux de récidive était significativement faible dans le groupe *NPM1*<sup>+</sup>/*FLT3*<sup>-</sup> (*p*=**0,047**). Le taux de mortalité était

significativement plus élevé ( $p=0,022$ ) dans le groupe  $NPM1^+/FLT3^+$  (100%) et le groupe  $NPM1^-/FLT3^+$  (83,33%). Ces résultats sont comparables à ceux déjà conclus par des rapports précédents [89,116,241].

L'analyse de la survie à montré un taux de survie globale et de survie sans maladie pour les patients  $FLT3^+$  inférieurs aux autres groupes, confirmant ainsi l'effet négatif de cette mutation. Quand au groupe porteur de la mutation  $NPM1$ , l'analyse n'a pas montré un taux de survie amélioré comparé au groupe non porteur des mutations. On remarque aussi que la présence de la mutation  $NPM1^+$  lors de l'absence des mutations  $FLT3$  joue un rôle favorable en termes de survie. Avec des conclusions similaires aux notre, plusieurs études ont rapportés qu'en absence des mutations  $FLT3$ , les mutations  $NPM1$  sont signe de pronostic favorable en termes de rémission complète, survie globale et survie sans événement, quand aux patients double positifs ( $FLT3^+/NPM1^+$ ), ils présentent un mauvais taux de réponse au traitement ainsi que la survie [241,242].

# Discussion générale

Les leucémies aiguës sont des proliférations clonales des précurseurs hématopoïétiques résultants d'anomalies génétiques et épigénétiques conduisant à la perturbation de l'auto-renouvellement, la prolifération et la différenciation de cellules et l'accumulation des blastes leucémiques dans la moelle et le sang périphérique. Ce sont des hémopathies relativement rares avec une hétérogénéité très importante en termes de morphologies, immunophénotype, aberrations cytogénétiques et moléculaires. Le devenir clinique des patients LAM est très variable avec une durée de survie allant de quelques jours jusqu'à une rémission complète et ceci est dépendant de plusieurs critères clinique qui peuvent être utilisés comme facteurs prédictifs.

Notre population d'étude s'est caractérisée par l'aspect jeune des patients LAM avec une moyenne d'âge de 46 ans alors que, les données bibliographiques montrent que la moyenne d'âge des patients LAM oscille entre 60-65 ans et que la survenue des LAM est rare avant 45 ans [123,124]. Cette différence avec les autres populations peut être expliquée par le caractère jeune de la population algérienne où plus de la moitié sont âgé de moins de 27,3 ans (2014) [125].

Les 60 patients qui ont fait l'objet de notre étude ont montré une hétérogénéité morphologique nous permettant ainsi de les classer selon la classification FAB en plusieurs sous-types, le plus fréquent est M2 (45%) et une absence totale du M7.

L'analyse cytogénétique a également montré la présence de différentes aberrations chromosomiques dans 53,33% des cas ce qui est en accord avec la littérature [71]. Ces anomalies sont précieuses dans le diagnostic ; certaines d'entre elles sont uniquement associées à des sous-types histologiques spécifiques et l'utilisation de la cytogénétique comme marqueurs diagnostics est très importante pour la prise en charge des patients [167].

L'analyse moléculaire est effectuée sur les deux gènes les plus mutés dans les LAM, le premier est le gène *FLT3*, on a procédé à une recherche de deux polymorphismes de ce gène qui sont la duplication en tandem (ITD) et la mutation D835Y (TKD), le deuxième est le gène *NPM1* dont on a un séquencé une région partielle de l'exon 12.

Nos résultats ont montré une fréquence de 11,6% des mutations activatrices du gène *FLT3*, ces fréquences sont relativement faibles comparés aux données de la littérature où elles varient entre 20-35% [89,245]. Une caractéristique importante de notre population d'étude est la présence des mutations *FLT3* avec une fréquence élevée dans les M2 (57,14%) et son absence dans le sous-type M3, ce qui est en désaccord avec la littérature qui rapporte les *FLT3*-ITD dans 15-40% et les *FLT3*-TKD dans 10-20% des patients M3 [180]. Cette

différence peut être liée à la localisation géographique ou à l'origine ethnique des populations étudiées.

Plus de la moitié de nos patients *FLT3+* (57,14%) ont un caryotype normal (groupe à risque intermédiaire), ces résultats sont tout à fait conformes avec les rapports précédents [194]. Les mutations *FLT3* sont plus souvent trouvées chez les patients à caryotype normal, d'où l'intérêt de la recherche de cette mutation qui permet une sous classification de patients à caryotype normal.

En ce qui concerne les mutations de l'exon 12 du gène *NPM1*, on a distingué deux type de mutations, le type-A (NM\_002520.6 : c.860\_863dupTCTG) et une nouvelle mutation complexe non répertoriée. Cette mutation unique c.869\_873delGGAGGinsCTTTTCCC est une délétion de cinq nucléotides GGAGG en position c.869\_873 et l'insertion de neufs paires de nucléotides CTTTTCCC. Les mutations *NPM1* sont trouvées avec une fréquences de 15,09% ce qui est considérablement faible si on le compare avec ce qui a été rapporté précédemment [116,201].

L'incidence des mutations *FLT3*-ITD est plus importante dans le groupe *NPM1+* que le groupe non porteur des deux mutations (14,28% vs. 6,6%), ce qui confirme que les mutations *NPM1* sont des aberrations primaires qui précèdent la survenue des mutations *FLT3* ce qui explique leur fréquence élevée dans le groupe *NPM1+* [246].

Le suivi des dossiers des patients pour déterminer leur état final a donné les résultats suivants : 18 ont atteints une rémission complète, 13 ont rechuté, 29 sont décédés pendant ou après la première cure d'induction.

En comparant nos résultats avec ceux de différentes études on observe que nos patients ont un faible taux de rémission complète et de survie globale. Aussi, on a constaté qu'une allogreffe de moelle chez les patients atteints de LAM n'est pas forcément synonyme d'une rémission complète, en effet, les 4 patients ayant bénéficiés d'une allogreffe ont rechuté. D'où l'importance de l'analyse cytogénétique et moléculaire pour la prédiction d'une rechute.

L'analyse de survie des patients en fonction du groupe de risque cytogénétique a montré une amélioration significative des patients avec des anomalies du groupe favorable comparée à celles du groupe intermédiaire et défavorable. Cette analyse va permettre d'adapter le traitement des patients selon le groupe auquel ils appartiennent dans le but d'améliorer leur devenir.

Nos résultats ont confirmés ce qui a été rapporté dans la littérature au sujet de l'effet péjoratif des mutations *FLT3* sur la survie ; la présence de la mutation ITD chez les adultes n'a pas d'impact sur le pouvoir d'atteindre ou pas une rémission complète, mais est significativement corrélé avec un risque de récurrence très élevé, réduisant le temps de survie sans maladie et réduisant également la survie globale[237,238].

Les LAM avec des mutations *NPM1* ont été reconnues comme des entités distinctes dans la dernière classification de l'OMS [50] et leur présence est liée à un pronostic favorable. La comparaison entre l'effet des mutations du gène *FLT3* et *NPM1* nous a permis de confirmer l'effet négatif des mutations *FLT3* sur les patients AML en terme de rémission complète, de survie globale et de survie sans maladie, mais ceci nous a permis également de confirmer l'effet positif des mutations *NPM1* sur les patients AML, ce qui est en accord avec des études précédentes [241,242]. Similaire à nos conclusions, plusieurs études ont rapportés qu'en l'absence des mutations *FLT3*, les mutations *NPM1* sont signe de pronostic favorable en terme de rémission complète, de survie globale et de survie sans événement, quand aux patients double positifs (*FLT3+/NPM1+*), ils présentent un mauvais taux de réponse au traitement ainsi que la survie [241,242].

Conclusion  
et  
Perspectives

Les leucémies aiguës sont des hémopathies hétérogènes avec des pronostics variables et des taux de mortalité très élevés. Dans notre étude on a pu décrire les caractéristiques biologiques et cliniques des patients atteints de leucémie aiguës et on a démontré que l'incidence des LAM est plus importante que celle des LAL avec des différences de parités dans le sexe et l'âge, où les LAM sont trouvées chez les personnes âgées et les LAL sont plus observées chez le sexe masculin.

A la lumière de notre travail, il paraît clair que l'analyse cytogénétique et moléculaire sont importantes dans le diagnostic et le pronostic des LAM. Certaines anomalies sont considérées comme des facteurs prédictifs du devenir des patients et peuvent être utilisées comme des éléments clés dans la prise en charge de ces patients.

On a aussi pu démontrer que les mutations activatrices du gène *FLT3* sont des mauvais facteurs pronostiques qui ont un effet négatif sur la réponse au traitement et la survie des patients LAM. La facilité de la technique pour la détection de ces mutations et leur importance pronostique les rendent un outil très important pour le diagnostic des LAM et l'amélioration du traitement.

Un autre point très important est celui des mutations de l'exon12 du gène *NPM1* où on a décrit une nouvelle mutation complexe (délétion/insertion) non répertoriée qui joue un rôle dans l'accumulation de la protéine NPM1 dans le cytoplasme, et on a montré leur effet positif sur les patients en cas d'absence des mutations du *FLT3*.

A l'avenir, une approche à différents volets comprenant des perspectives génétiques, et épigénétiques aidera à générer une image plus complète des processus physiopathologiques impliqués dans la maladie et conduira donc à l'identification de différents types de biomarqueurs potentiels qui peuvent être combinés pour améliorer significativement le diagnostic, le pronostic ou le suivi des LAM, ainsi faciliter les décisions de traitement plus appropriées d'un point de vue clinique et réduire les taux de mortalité. Par conséquent, trouver un modèle de biomarqueurs multiples peut fournir des informations diagnostiques importantes ainsi qu'une sensibilité et une spécificité accrues dans la classification des patients.

En résumé, il est important de mentionner les points suivants :

- Actuellement, les résultats cytogénétiques et les anomalies moléculaires au moment du diagnostic sont considérés comme les facteurs pronostiques les plus importants.

- Il est impérativement important de penser à des collaboration entre les différents services d'hématologies pour pouvoir augmenter la taille de la population d'étude, nous permettant ainsi de tirer des conclusions concernant la population Algérienne.
- Des recherches supplémentaires sont nécessaires pour obtenir un profil génétique plus complet, avec un plus grand nombre de gènes tels que le *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA* et *c-Kit* afin de rendre la médecine personnalisée plus accessible.
- Il est important de mettre en œuvre de nouvelles stratégies de traitement, telles que les inhibiteurs du *FLT3* et d'autres thérapies moléculaires ciblées, dans la pratique clinique.

# Références bibliographiques

1. Debru C, Triadou P. Les leucémies aiguës: une vue historique des classifications. *médecine/sciences*. 1996;12:491.
2. Piller G. Leukaemia - a brief historical review from ancient times to 1950. *Br J Haematol*. 2001;112:282–92.
3. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976;33:451–8.
4. Galloway JL, Zon LI. Ontogeny of hematopoiesis: examining the emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo. *Curr Top Dev Biol*. 2003;53:139–58.
5. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 2008;132:631–44.
6. Paik EJ, Zon LI. Hematopoietic development in the zebrafish. *Int J Dev Biol*. 2010;54:1127–37.
7. Cumano A, Godin I. Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:745–85.
8. Masson E. Anatomie et histologie de la moelle osseuse. *EM-Consulte*. 1998;13:10.
9. Bryon P. Hématologie. Anatomie et histologie de la moelle osseuse. *Encycl Méd Chir (Elsevier, Paris)*; 1998: 10.
10. Travlos GS. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicol Pathol*. 2006;34:548–65.
11. Naito K, Tamahashi N, Chiba T, Kaneda K, Okuda M, Endo K, et al. The microvasculature of the human bone marrow correlated with the distribution of hematopoietic cells. A computer-assisted three-dimensional reconstruction study. *Tohoku J Exp Med*. 1992;166:439–50.
12. Naeim F, Moatamed F, Sahimi M. Morphogenesis of the bone marrow: fractal structures and diffusion-limited growth. *Blood*. 1996;87:5027–31.
13. Walcott B. *Tissues and Organs: A Text-Atlas of Scanning Electron Microscopy*. Richard G. Kessel, Randy H. Kardon. *The Quarterly Review of Biology*. 1979;54:468–468.
14. Szilvassy SJ, Ragland PL, Miller CL, Eaves CJ. The marrow homing efficiency of murine hematopoietic stem cells remains constant during ontogeny. *Exp Hematol*. 2003;31:331–8.
15. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature*. 2001;414:98–104.
16. Watowich SS, Wu H, Socolovsky M, Klingmuller U, Constantinescu SN, Lodish HF. Cytokine receptor signal transduction and the control of hematopoietic cell development. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1996;12:91–128.
17. Kai T, Spradling A. An empty *Drosophila* stem cell niche reactivates the proliferation of ectopic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:4633–8.
18. Iwasaki H, Somoza C, Shigematsu H, Duprez EA, Iwasaki-Arai J, Mizuno S-I, et al. Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation. *Blood*. 2005;106:1590–600.

19. Sachs L. The control of hematopoiesis and leukemia: from basic biology to the clinic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:4742–9.
20. Arai F, Yoshihara H, Hosokawa K, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, et al. Niche regulation of hematopoietic stem cells in the endosteum. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1176:36–46.
21. Frelin C, Ladoux A, Bauters C. VEGF: médiateur de l'angiogenèse hypoxique. *médecine/sciences*. 1997;13:886.
22. Geissler EN, McFarland EC, Russell ES. Analysis of pleiotropism at the dominant white-spotting (W) locus of the house mouse: a description of ten new W alleles. *Genetics*. 1981;97:337–61.
23. Mackarehtschian K, Hardin JD, Moore KA, Boast S, Goff SP, Lemischka IR. Targeted disruption of the *flk2/flt3* gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity*. 1995;3:147–61.
24. Veiby OP, Mikhail AA, Snodgrass HR. Growth factors and hematopoietic stem cells. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1997;11:1173–84.
25. Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell*. 1995;83:59–67.
26. Peschon JJ, Morrissey PJ, Grabstein KH, Ramsdell FJ, Maraskovsky E, Gliniak BC, et al. Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J Exp Med*. 1994;180:1955–60.
27. Begley CG, Green AR. The SCL Gene: From Case Report to Critical Hematopoietic Regulator. *Blood*. 1999;93:2760–70.
28. Shivdasani RA, Mayer EL, Orkin SH. Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein *tal-1/SCL*. *Nature*. 1995;373:432–4.
29. Mikkola HKA, Orkin SH. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development*. 2006;133:3733–44.
30. Rabbitts TH. LMO T-cell translocation oncogenes typify genes activated by chromosomal translocations that alter transcription and developmental processes. *Genes Dev*. 1998;12:2651–7.
31. Warren AJ, Colledge WH, Carlton MB, Evans MJ, Smith AJ, Rabbitts TH. The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein *rbtn2* is essential for erythroid development. *Cell*. 1994;78:45–57.
32. Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, Grosveld G, Downing JR. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell*. 1996;84:321–30.
33. Elagib KE, Racke FK, Mogass M, Khetawat R, Delehanty LL, Goldfarb AN. RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation. *Blood*. 2003;101:4333–41.
34. Wang Q, Stacy T, Miller JD, Lewis AF, Gu TL, Huang X, et al. The CBFbeta subunit is essential for CBFalpha2 (AML1) function in vivo. *Cell*. 1996;87:697–708.
35. Molkenin JD. The Zinc Finger-containing Transcription Factors GATA-4, -5, and -6 ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem*. 2000;275:38949–52.

36. Ikonomi P, Rivera CE, Riordan M, Washington G, Schechter AN, Noguchi CT. Overexpression of GATA-2 inhibits erythroid and promotes megakaryocyte differentiation. *Exp Hematol.* 2000;28:1423–31.
37. Bresnick EH, Lee H-Y, Fujiwara T, Johnson KD, Keles S. GATA switches as developmental drivers. *J Biol Chem.* 2010;285:31087–93.
38. García P., Berlanga O., Vegiopoulos A., Vyas P., Frampton J. c-Myb and GATA-1 alternate dominant roles during megakaryocyte differentiation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis.* 2011;9:1572–81.
39. Vegiopoulos A, García P, Emambokus N, Frampton J. Coordination of erythropoiesis by the transcription factor c-Myb. *Blood.* 2006;107:4703–10.
40. Rosenbauer F, Wagner K, Kutok JL, Iwasaki H, Le Beau MM, Okuno Y, et al. Acute myeloid leukemia induced by graded reduction of a lineage-specific transcription factor, PU.1. *Nat Genet.* 2004;36:624–30.
41. Zhang P, Zhang X, Iwama A, Yu C, Smith KA, Mueller BU, et al. PU.1 inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding. *Blood.* 2000;96:2641–8.
42. Passegué E, Weisman IL. Leukemic stem cells: where do they come from? *Stem Cell Rev.* 2005;1:181–8.
43. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 1994;367:645–8.
44. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997;3:730–7.
45. Cantor AB, Orkin SH. Hematopoietic development: a balancing act. *Curr Opin Genet Dev.* 2001;11:513–9.
46. Gilliland DG, Jordan CT, Felix CA. The molecular basis of leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2004;80–97.
47. Lightfoot TJ, Roman E. Causes of childhood leukaemia and lymphoma. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004;199:104–17.
48. Felix CA, Kolaris CP, Osheroff N. Topoisomerase II and the etiology of chromosomal translocations. *DNA Repair.* 2006;5:1093–108.
49. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2009;114:937–51.
50. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Beau MML, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127:2391–405.

51. Zerbini MCN, Soares FA, Pereira EDR. World Health Organization Classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues, 4th edition, 2008 – major changes from the 3rd edition, 200. Rev Assoc Med Bras. 2008;8.
52. Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. Cancer. 2006;107:2099–107.
53. Wartenberg D, Groves FD, Adelman AS. Acute Lymphoblastic Leukemia: Epidemiology and Etiology. Acute Leukemias [Internet]. Springer, Berlin, Heidelberg; 2008 [cited 2018 Mar 14]. p. 77–93. Available from: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-72304-2\\_5](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-540-72304-2_5)
54. Reynolds P, Behren JV, Elkin EP. Birth Characteristics and Leukemia in Young Children. Am J Epidemiol. 2002;155:603–13.
55. Kinlen L. Evidence for an infective cause of childhood leukaemia: comparison of a scottish new town with nuclear reprocessing sites in britain. The Lancet. 1988;332:1323–7.
56. Ben-David Y, Bernsteint A. Friend virus-induced erythroleukemia and the multistage nature of cancer. Cell. 1991;66:831–4.
57. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer. 2015;136:E359-386.
58. OMS | Cancer WHO. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/>
59. InfoCancer - ARCAGY - GINECO – En Savoir Plus – Cancer – Le cancer en chiffres – Epidémiologie du cancer. Available from: <http://www.arcagy.org/infocancer/en-savoir-plus/cancer/chiffres-du-cancer/epidemiologie-du-cancer.html>
60. Hamdi Cherif M, Bidoli E, Birri S, Mahnane A, Zaidi Z, Boukharouba H, et al. Cancer estimation of incidence and survival in Algeria 2014. Cancer Res Ther. 2015; Vol. 3 (9):100–104.
61. Cancer Statistics Review, 1975-2014 - SEER Statistics [Internet]. Available from: [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2014/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/)
62. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. European Journal of Cancer. 2013;49:1374–403.
63. Cancer registration statistics, England Statistical bulletins - Office for National Statistics [Internet]. Available from: <https://www.ons.gov.uk/peoplepopulationandcommunity/healthandsocialcare/conditionsanddiseases/bulletins/cancerregistrationstatisticsengland/previousReleases>
64. Globocan 2012 - Home. Available from: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
65. Pui C-H, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. The Lancet. 2008;371:1030–43.
66. Groves FD, Linet MS, Devesa SS. Patterns of occurrence of the leukaemias. Eur J Cancer. 1995;31A:941–9.

67. Prébet T, Gore SD, Thépot S, Esterni B, Quesnel B, Rauzy OB, et al. Outcome of acute myeloid leukaemia following myelodysplastic syndrome after azacitidine treatment failure. *Br J Haematol.* 2012;157:764–6.
68. Farnault L, Boudjarane J, Baccini V, Costello R. Leucémies aiguës lymphoblastiques de l'adulte. *EMC-Hématologie.* 2015;10:1-14.
69. Huguet F, Récher C. Leucémies aiguës de l'adulte. *EMC-AKOS (traité de Médecin).* 2012;7:1-9
70. Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine.* 1999;341:1051–62.
71. Welch JS, Ley TJ, Link DC, Miller CA, Larson DE, Koboldt DC, et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell.* 2012;150:264–78.
72. Marcucci G, Mrózek K, Ruppert AS, Archer KJ, Pettenati MJ, Heerema NA, et al. Abnormal cytogenetics at date of morphologic complete remission predicts short overall and disease-free survival, and higher relapse rate in adult acute myeloid leukemia: results from cancer and leukemia group B study 8461. *J Clin Oncol.* 2004;22:2410–8.
73. Roussel M, Mitre H, Leymarie P, Leporrier M, Troussard X, Flandrin sous la direction de G. Jonction BCR-ABL de type e19a2 : leucémie myéloïde chronique ou non ? *Hématologie.* 1998;4:301–5.
74. Lara D, Gauthier M. Leucémies aiguës lymphoblastiques. *Hématologie.* 2014;20:116–29.
75. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood.* 2017;129:424–47.
76. FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3). Available from: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/FLT3ID144.html>
77. Grafone T, Palmisano M, Nicci C, Storti S. An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: biology and treatment. *Oncol Rev.* 2012;6 (8):64-74.
78. Kindler T, Lipka DB, Fischer T. FLT3 as a therapeutic target in AML: still challenging after all these years. *Blood.* 2010;116:5089–102.
79. Gotze KS, Ramirez M, Tabor K, Small D, Matthews W, Civin CI. Flt3high and Flt3low CD34+ progenitor cells isolated from human bone marrow are functionally distinct. *Blood.* 1998;91:1947–58.
80. Griffith J, Black J, Faerman C, Swenson L, Wynn M, Lu F, et al. The Structural Basis for Autoinhibition of FLT3 by the Juxtamembrane Domain. *Molecular Cell.* 2004;13:169–78.
81. Small D. FLT3 Mutations: Biology and Treatment. *Hematology.* 2006;2006:178–84.
82. Takahashi S. Inhibition of the MEK/MAPK signal transduction pathway strongly impairs the growth of Flt3-ITD cells. *Am J Hematol.* 2006;81:154–5.
83. Gabbianelli M, Pelosi E, Montesoro E, Valtieri M, Luchetti L, Samoggia P, et al. Multi-level effects of flt3 ligand on human hematopoiesis: expansion of putative stem cells and proliferation of granulomonocytic progenitors/monocytic precursors. *Blood.* 1995;86:1661–70.

84. Manfra DJ, Chen S-C, Jensen KK, Fine JS, Wiekowski MT, Lira SA. Conditional expression of murine Flt3 ligand leads to expansion of multiple dendritic cell subsets in peripheral blood and tissues of transgenic mice. *J Immunol.* 2003;170:2843–52.
85. Carow CE, Kim E, Hawkins AL, Webb HD, Griffin CA, Jabs EW, et al. Localization of the human stem cell tyrosine kinase-1 gene (FLT3) to 13q12-->q13. *Cytogenet Cell Genet.* 1995;70:255–7.
86. D. Kottaridis Panagiotis, Gale Rosemary E., Linch David C. Flt3 mutations and leukaemia. *British Journal of Haematology.* 2003;122:523–38.
87. Bruserud Ø, Hovland R, Wergeland L, Huang T-S, Gjertsen BT. Flt3-mediated signaling in human acute myelogenous leukemia (AML) blasts: a functional characterization of Flt3-ligand effects in AML cell populations with and without genetic Flt3 abnormalities. *Haematologica.* 2003;88:416–28.
88. Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, et al. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 1996;10:1911–8.
89. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine.* 2016;374:2209–21.
90. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood.* 2001;97:2434–9.
91. Scholl S, Krause C, Loncarevic IF, Müller R, Kunert C, Wedding U, et al. Specific detection of Flt3 point mutations by highly sensitive real-time polymerase chain reaction in acute myeloid leukemia. *J Lab Clin Med.* 2005;145:295–304.
92. Chang JH, Dumbar TS, Olson MO. cDNA and deduced primary structure of rat protein B23, a nucleolar protein containing highly conserved sequences. *J Biol Chem.* 1988;263:12824–7.
93. Federici L, Falini B. Nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia: a tale of protein unfolding and mislocalization. *Protein Sci.* 2013;22:545–56.
94. Wang D, Umekawa H, Olson MO. Expression and subcellular locations of two forms of nucleolar protein B23 in rat tissues and cells. *Cell Mol Biol Res.* 1993;39:33–42.
95. Hingorani K, Szebeni A, Olson MO. Mapping the functional domains of nucleolar protein B23. *J Biol Chem.* 2000;275:24451–7.
96. Wang W, Budhu A, Forgues M, Wang XW. Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication. *Nat Cell Biol.* 2005;7:823–30.
97. Samad MA, Okuwaki M, Haruki H, Nagata K. Physical and functional interaction between a nucleolar protein nucleophosmin/B23 and adenovirus basic core proteins. *FEBS Lett.* 2007;581:3283–8.
98. Nishimura Y, Ohkubo T, Furuichi Y, Umekawa H. Tryptophans 286 and 288 in the C-terminal region of protein B23.1 are important for its nucleolar localization. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2002;66:2239–42.

99. Mitrea DM, Grace CR, Buljan M, Yun M-K, Pytel NJ, Satumba J, et al. Structural polymorphism in the N-terminal oligomerization domain of NPM1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111:4466–71.
100. Grisendi S, Bernardi R, Rossi M, Cheng K, Khandker L, Manova K, et al. Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature*. 2005;437:147–53.
101. Zhang H, Shi X, Paddon H, Hampong M, Dai W, Pelech S. B23/nucleophosmin serine 4 phosphorylation mediates mitotic functions of polo-like kinase 1. *J Biol Chem*. 2004;279:35726–34.
102. Swaminathan V, Kishore AH, Febitha KK, Kundu TK. Human histone chaperone nucleophosmin enhances acetylation-dependent chromatin transcription. *Mol Cell Biol*. 2005;25:7534–45.
103. Gurumurthy M, Tan CH, Ng R, Zeiger L, Lau J, Lee J, et al. Nucleophosmin interacts with HEXIM1 and regulates RNA polymerase II transcription. *J Mol Biol*. 2008;378:302–17.
104. Li Z, Boone D, Hann SR. Nucleophosmin interacts directly with c-Myc and controls c-Myc-induced hyperproliferation and transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:18794–9.
105. Inouye CJ, Seto E. Relief of YY1-induced transcriptional repression by protein-protein interaction with the nucleolar phosphoprotein B23. *J Biol Chem*. 1994;269:6506–10.
106. Yu Y, Maggi LB, Brady SN, Apicelli AJ, Dai M-S, Lu H, et al. Nucleophosmin is essential for ribosomal protein L5 nuclear export. *Mol Cell Biol*. 2006;26:3798–809.
107. Gene: NPM1 (ENSG00000181163) - Summary - Homo sapiens - Ensembl genome browser 92. Available from: [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000181163;r=5:1713871-16-171411137](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000181163;r=5:1713871-16-171411137)
108. Frehlick LJ, Eirín-López JM, Ausió J. New insights into the nucleophosmin/nucleoplasmin family of nuclear chaperones. *Bioessays*. 2007;29:49–59.
109. Mendes-da-Silva P, Moreira A, Duro-da-Costa J, Matias D, Monteiro C. Frequent loss of heterozygosity on chromosome 5 in non-small cell lung carcinoma. *Mol Pathol*. 2000;53:184–7.
110. Berger R, Busson M, Baranger L, Hélias C, Lessard M, Dastugue N, et al. Loss of the NPM1 gene in myeloid disorders with chromosome 5 rearrangements. *Leukemia*. 2006;20:319–21.
111. Falini B, Mason DY. Proteins encoded by genes involved in chromosomal alterations in lymphoma and leukemia: clinical value of their detection by immunocytochemistry. *Blood*. 2002;99:409–26.
112. Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer K, Shapiro DN, Look AT, et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science*. 1995;267:316–7.
113. Redner RL, Rush EA, Faas S, Rudert WA, Corey SJ. The t(5;17) variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosmin-retinoic acid receptor fusion. *Blood*. 1996;87:882–6.
114. Winteringham LN, Kobelke S, Williams JH, Ingley E, Klinken SP. Myeloid Leukemia Factor 1 inhibits erythropoietin-induced differentiation, cell cycle exit and p27Kip1 accumulation. *Oncogene*. 2004;23:5105–9.

115. Falini B, Nicoletti I, Bolli N, Martelli MP, Liso A, Gorello P, et al. Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. *Haematologica*. 2007;92:519–32.
116. Heath EM, Chan SM, Minden MD, Murphy T, Shlush LI, Schimmer AD. Biological and clinical consequences of *NPM1* mutations in AML. *Leukemia*. 2017;31:798–807.
117. Garzon R, Garofalo M, Martelli MP, Briesewitz R, Wang L, Fernandez-Cymering C, et al. Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105:3945–50.
118. Falini B, Martelli MP, Pileri SA, Mecucci C. Molecular and alternative methods for diagnosis of acute myeloid leukemia with mutated NPM1: flexibility may help. *Haematologica*. 2010;95:529–34.
119. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:1215.
120. Swensen AR, Ross JA, Severson RK, Pollock BH, Robison LL. The age peak in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 79:2045–51.
121. Key Statistics for Acute Lymphocytic Leukemia [Internet]. [cited 2018 Jul 16]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/acute-lymphocytic-leukemia/about/key-statistics.html>
122. Bekadja MA, Hamladji RM, Belhani M, Ardjoun FZ, Abad MT, Touhami H, et al. A population-based study of the epidemiology and clinical features of adults with acute myeloid leukemia in Algeria: report on behalf of the Algerian Acute Leukemia Study Group. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2011;4:161–6.
123. Sant M, Allemani C, Tereanu C, Angelis RD, Capocaccia R, Visser O, et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. *Blood*. 2010;116:3724–34.
124. Juliusson G, Antunovic P, Derolf Å, Lehmann S, Möllgård L, Stockelberg D, et al. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood*. 2009;113:4179–87.
125. L'Algérie est le 2e plus jeune pays au Maghreb en 2014 (infographies). *Al HuffPost Maghreb*. 2014. Available from: [http://www.huffpostmaghreb.com/2014/09/13/algerie-maghreb-infograph\\_n\\_5815298.html](http://www.huffpostmaghreb.com/2014/09/13/algerie-maghreb-infograph_n_5815298.html)
126. Linet MS, Wacholder S, Zahm SH. Interpreting epidemiologic research: lessons from studies of childhood cancer. *Pediatrics*. 2003;112:218–32.
127. Cook MB, Dawsey SM, Freedman ND, Inskip PD, Wichner SM, Quraishi SM, et al. Sex disparities in cancer incidence by time period and age. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18:1174–82.
128. Holmes L, Hossain J, desVignes-Kendrick M, Opara F. Sex Variability in Pediatric Leukemia Survival: Large Cohort Evidence. *International Scholarly Research Notices*. 2012 [cited 2018 Jul 16]. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/isrn/2012/439070/>

129. Pui C-H, Boyett JM, Relling MV, Harrison PL, Rivera GK, Behm FG, et al. Sex Differences in Prognosis for Children With Acute Lymphoblastic Leukemia. *JCO*. 1999;17:818–818.
130. Revue microscopique du frottis sanguin : propositions du Groupe Francophone d Hématologie Cellulaire (GFHC). [cited 2018 Apr 17]. Available from: <http://docplayer.fr/2016577-Revue-microscopique-du-frottis-sanguin-propositions-du-groupe-francophone-d-hematologie-cellulaire-gfhc.html>
131. Han X, Bueso-Ramos CE. Advances in the pathological diagnosis and biology of acute lymphoblastic leukemia. *Ann Diagn Pathol*. 2005;9:239–57.
132. Béné MC, Nebe T, Bettelheim P, Buldini B, Bumbea H, Kern W, et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia*. 2011;25:567–74.
133. Anderson G, Takahama Y. Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection. *Trends Immunol*. 2012;33:256–63.
134. Moorman AV, Roman E, Willett EV, Dovey GJ, Cartwright RA, Morgan GJ. Karyotype and age in acute myeloid leukemia.: Are they linked? *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2001;126:155–61.
135. Rowley JD. Identificaton of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia. *Ann Genet*. 1973;16:109–12.
136. Arber DA, Stein AS, Carter NH, Ikle D, Forman SJ, Slovak ML. Prognostic impact of acute myeloid leukemia classification. Importance of detection of recurring cytogenetic abnormalities and multilineage dysplasia on survival. *Am J Clin Pathol*. 2003;119:672–80.
137. Cheng Y, Wang Y, Wang H, Chen Z, Lou J, Xu H, et al. Cytogenetic profile of de novo acute myeloid leukemia: a study based on 1432 patients in a single institution of China. *Leukemia*. 2009;23:1801–6.
138. Klaus M, Haferlach T, Schnittger S, Kern W, Hiddemann W, Schoch C. Cytogenetic profile in de novo acute myeloid leukemia with FAB subtypes M0, M1, and M2: a study based on 652 cases analyzed with morphology, cytogenetics, and fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*. 2004;155:47–56.
139. Acute myelogenous leukemia with an 8;21 translocation: A report on 148 cases from the Groupe Français de Cytogénétique Hématologique. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 1990;44:169–79.
140. Bacher U, Kern W, Schnittger S, Hiddemann W, Haferlach T, Schoch C. Population-based age-specific incidences of cytogenetic subgroups of acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2005;90:1502–10.
141. Li H-Y, Yue H, Wei X-D, Zhu X-H, Zhang Y-L, Zhang L-N, et al. [The efficacy of high-dose cytarabine for patients with t(8;21) AML and with normal karyotype AML]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 2008;29:110–2.
142. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. A variant form of hypergranular promyelocytic leukaemia (M3). *Br J Haematol*. 1980;44:169–70.

143. Avvisati G, Lo Coco F, Mandelli F. Acute promyelocytic leukemia: clinical and morphologic features and prognostic factors. *Semin Hematol.* 2001;38:4–12.
144. Grignani F, Fagioli M, Alcalay M, Longo L, Pandolfi PP, Donti E, et al. Acute promyelocytic leukemia: from genetics to treatment. *Blood.* 1994;83:10–25.
145. Sanz MA, Lo Coco F, Martín G, Avvisati G, Rayón C, Barbui T, et al. Definition of relapse risk and role of nonanthracycline drugs for consolidation in patients with acute promyelocytic leukemia: a joint study of the PETHEMA and GIMEMA cooperative groups. *Blood.* 2000;96:1247–53.
146. Lo-Coco F, Cicconi L, Breccia M. Current standard treatment of adult acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 2016;172:841–54.
147. Stölzel F, Mohr B, Kramer M, Oelschlägel U, Bochtler T, Berdel WE, et al. Karyotype complexity and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J.* 2016;6:e386.
148. Mrózek K. Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype. *Semin Oncol.* 2008;35:365–77.
149. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood.* 2010;115:453–74.
150. Schnittger S, Bacher U, Haferlach C, Kern W, Haferlach T. Rare *CBFB-MYH11* fusion transcripts in AML with *inv(16)/t(16;16)* are associated with therapy-related AML M4eo, atypical cytomorphology, atypical immunophenotype, atypical additional chromosomal rearrangements and low white blood cell count: a study on 162 patients. *Leukemia.* 2007;21:725–31.
151. Kundu M, Liu PP. Function of the *inv(16)* fusion gene *CBFB-MYH11*. *Curr Opin Hematol.* 2001;8:201–5.
152. Le Beau MM, Larson RA, Bitter MA, Vardiman JW, Golomb HM, Rowley JD. Association of an inversion of chromosome 16 with abnormal marrow eosinophils in acute myelomonocytic leukemia. A unique cytogenetic-clinicopathological association. *N Engl J Med.* 1983;309:630–6.
153. Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood.* 2002;100:4325–36.
154. Schwind S, Edwards CG, Nicolet D, Mrózek K, Maharry K, Wu Y-Z, et al. *inv(16)/t(16;16)* acute myeloid leukemia with non-type A *CBFB-MYH11* fusions associate with distinct clinical and genetic features and lack *KIT* mutations. *Blood.* 2013;121:385–91.
155. Delaunay J, Vey N, Leblanc T, Fenaux P, Rigal-Huguet F, Witz F, et al. Prognosis of *inv(16)/t(16;16)* acute myeloid leukemia (AML): a survey of 110 cases from the French AML Intergroup. *Blood.* 2003;102:462–9.
156. Faderl S, Kantarjian HM, Thomas DA, Cortes J, Giles F, Pierce S, et al. Outcome of Philadelphia chromosome-positive adult acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2000;36:263–73.

157. Thomas X, Boiron J-M, Huguet F, Dombret H, Bradstock K, Vey N, et al. Outcome of treatment in adults with acute lymphoblastic leukemia: analysis of the LALA-94 trial. *J Clin Oncol*. 2004;22:4075–86.
158. Jones LK, Saha V. Philadelphia positive acute lymphoblastic leukaemia of childhood. *British Journal of Haematology*. 2005;130:489–500.
159. Wassmann B, Pfeifer H, Goekbuget N, Beelen DW, Beck J, Stelljes M, et al. Alternating versus concurrent schedules of imatinib and chemotherapy as front-line therapy for Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ ALL). *Blood*. 2006;108:1469–77.
160. Marchesi F, Girardi K, Avvisati G. Pathogenetic, Clinical, and Prognostic Features of Adult t(4;11)(q21;q23)/MLL-AF4 Positive B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Advances in Hematology*. 2011;621627.
161. Meyer C, Hofmann J, Burmeister T, Gröger D, Park TS, Emerenciano M, et al. The *MLL* recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia*. 2013;27:2165–76.
162. Kohlmann A, Schoch C, Dugas M, Schnittger S, Hiddemann W, Kern W, et al. New insights into *MLL* gene rearranged acute leukemias using gene expression profiling: shared pathways, lineage commitment, and partner genes. *Leukemia*. 2005;19:953–64.
163. Bassan R, Spinelli O, Oldani E, Intermesoli T, Tosi M, Peruta B, et al. Improved risk classification for risk-specific therapy based on the molecular study of minimal residual disease (MRD) in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood*. 2009;113:4153–62.
164. Moorman AV, Harrison CJ, Buck GAN, Richards SM, Secker-Walker LM, Martineau M, et al. Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of cytogenetic data from patients treated on the Medical Research Council (MRC) UKALLXII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 trial. *Blood*. 2007;109:3189–97.
165. Pui CH. Acute leukemias with the t(4;11)(q21;q23). *Leuk Lymphoma*. 1992;7:173–9.
166. Pui CH, Kane JR, Crist WM. Biology and treatment of infant leukemias. *Leukemia*. 1995;9:762–9.
167. Betz BL, Hess JL. Acute myeloid leukemia diagnosis in the 21st century. *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134:1427–33.
168. Rauscher GH, Sandler DP, Poole C, Pankow J, Mitchell B, Bloomfield CD, et al. Family History of Cancer and Incidence of Acute Leukemia in Adults. *Am J Epidemiol*. 2002;156:517–26.
169. Leick MB, Levis MJ. The Future of Targeting FLT3 Activation in AML. *Curr Hematol Malig Rep*. 2017;12:153–67.
170. Vempati S, Reindl C, Kern R, Malamoussi T, Dugas M, Mellert G. Arginine 595 is duplicated in patients with acute leukemias carrying internal tandem duplications of FLT3 and modulates its transforming potential. *Blood Journal*. 2007;110 (2):686-94.
171. Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD, et al. Absence of the Wild-Type Allele Predicts Poor Prognosis in Adult de Novo Acute Myeloid Leukemia with Normal

Cytogenetics and the Internal Tandem Duplication of FLT3: A Cancer and Leukemia Group B Study. *Cancer Res.* 2001;61:7233–9.

172. Krstovski N, Tosic N, Janic D, Dokmanovic L, Kuzmanovic M, Spasovski V, et al. Incidence of FLT3 and nucleophosmin gene mutations in childhood acute myeloid leukemia: Serbian experience and the review of the literature. *Med Oncol.* 2010;27:640–5.

173. Al-Mawali A, Gillis D, Lewis I. Characteristics and Prognosis of Adult Acute Myeloid Leukemia with Internal Tandem Duplication in the FLT3 Gene. *Oman Med J.* 2013;28:432–40.

174. Kim Y, Lee GD, Park J, Yoon J-H, Kim H-J, Min W-S, et al. Quantitative fragment analysis of FLT3-ITD efficiently identifying poor prognostic group with high mutant allele burden or long ITD length. *Blood Cancer J.* 2015;5:e336.

175. Fröhling S, Schlenk RF, Breitruck J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, et al. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood.* 2002;100:4372–80.

176. Kiyoi H, Naoe T. FLT3 in Human Hematologic Malignancies. *Leukemia & Lymphoma.* 2002;43:1541–7.

177. Ahmad F, Mandava S, Das BR. Analysis of FLT3-ITD and FLT3-Asp835 Mutations in de novo Acute Myeloid Leukemia: Evaluation of Incidence, Distribution Pattern, Correlation with Cytogenetics and Characterization of Internal Tandem Duplication from Indian Population. *Cancer Investigation.* 2010;28:63–73.

178. Dehbi H, Kassogue Y, Nasserredine S, Quessar A, nadifi S. FLT3-ITD Incidence and FLT-D835 Mutations in Acute Myeloid Leukemia Patients with Normal Karyotype in Morocco: A Preliminary Study. *Middle East Journal of Cancer.* 2013;4(1):1-5.

179. Marshall RC, Tlagadi A, Bronze M, Kana V, Naidoo S, Wiggill TM, et al. Lower frequency of NPM1 and FLT3-ITD mutations in a South African adult de novo AML cohort. *Int J Lab Hematol.* 2014;36:656–64.

180. Bochtler T, Fröhling S, Weichert W, Endris V, Thiede C, Hutter B, et al. Evolution of a FLT3-TKD mutated subclone at meningeal relapse in acute promyelocytic leukemia. *Cold Spring Harb Mol Case Stud.* 2016;2.

181. Cuervo-Sierra J, Jaime-Pérez JC, Martínez-Hernández RA, García-Sepúlveda RD, Sánchez-Cárdenas M, Gómez-Almaguer D, et al. Prevalence and Clinical Significance of FLT3 Mutation Status in Acute Myeloid Leukemia Patients: A Multicenter Study. *Archives of Medical Research.* 2016;47:172–9.

182. Blau O, Berenstein R, Sindram A, Blau IW. Molecular analysis of different FLT3-ITD mutations in acute myeloid leukemia. *Leukemia & Lymphoma.* 2013;54:145–52.

183. Gou H, Zhou J, Ye Y, Hu X, Shang M, Zhang J, et al. The prevalence and clinical profiles of FLT3-ITD, FLT3-TKD, NPM1, C-KIT, DNMT3A, and CEBPA mutations in a cohort of patients with de novo acute myeloid leukemia from southwest China. *Tumour Biol.* 2016;37:7357–70.

184. Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rücker FG, Corbacioglu A, et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood*. 2005;106:3740–6.
185. Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Appelbaum FR, Slovak ML, Willman CL, et al. FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2001;97:3589–95.
186. Xu F, Taki T, Eguchi M, Kamada N, Ishii E, Endo M, et al. Tandem duplication of the *FLT3* gene is infrequent in infant acute leukemia. *Leukemia*. 2000;14:945–7.
187. Elyamany G, Awad M, Fadalla K, Albalawi M, Al Shahrani M, Al Abdulaaly A. Frequency and Prognostic Relevance of FLT3 Mutations in Saudi Acute Myeloid Leukemia Patients. *Adv Hematol*. 2014;141360.
188. Tong W-G, Sandhu VK, Wood BL, Hendrie PC, Becker PS, Pagel JM, et al. Correlation between peripheral blood and bone marrow regarding FLT3-ITD and NPM1 mutational status in patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2015;100:e97–8.
189. de Jonge HJM, Valk PJM, de Bont ESJM, Schuringa JJ, Ossenkoppele G, Vellenga E, et al. Prognostic impact of white blood cell count in intermediate risk acute myeloid leukemia: relevance of mutated NPM1 and FLT3-ITD. *Haematologica*. 2011;96:1310–7.
190. Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *The Lancet*. 2006;368:1894–907.
191. Kiyoi H, Naoe T. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia. *Methods Mol Med*. 2006;125:189–97.
192. FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favorable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia. *Blood Journal*. 2007;110(4):1262-70.
193. Liang D-C, Shih L-Y, Hung I-J, Yang C-P, Chen S-H, Jaing T-H, et al. FLT3-TKD mutation in childhood acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2003;17:883–6.
194. Li W, Zhang L, Huang L, Mi Y, Wang J. Meta-analysis for the potential application of FLT3-TKD mutations as prognostic indicator in non-promyelocytic AML. *Leuk Res*. 2012;36:186–91.
195. Kok CH, Brown AL, Perugini M, Iarossi DG, Lewis ID, D’Andrea RJ. The preferential occurrence of FLT3-TKD mutations in inv(16) AML and impact on survival outcome: a combined analysis of 1053 core-binding factor AML patients. *Br J Haematol*. 2013;160:557–9.
196. Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schäkel U, Platzbecker U, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis: Presented in part at the 42nd Annual Meeting of the American Society of Hematology, December 1-5, 2000, San Francisco, CA (abstract 2334). *Blood*. 2002;99:4326–35.
197. Yanada M, Matsuo K, Suzuki T, Kiyoi H, Naoe T. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Leukemia*. 2005;19:1345–9.

198. Bacher U, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S. Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters—an analysis of 3082 patients. *Blood*. 2008;111:2527–37.
199. Transcript: NPM1-201 (ENST00000296930.9) - cDNA sequence - Homo sapiens - Ensembl genome browser 92. Available from: [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/Sequence\\_cDNA?db=core;g=ENSG00000181163;r=5:171387116-171411137;t=ENST00000296930](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000181163;r=5:171387116-171411137;t=ENST00000296930)
200. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114:937–51.
201. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med*. 2005;352:254–66.
202. Kassem N, Hamid AA, Attia T, Baathallah S, Mahmoud S, Moemen E, et al. Novel mutations of the nucleophosmin (NPM-1) gene in Egyptian patients with acute myeloid leukemia: a pilot study. *J Egypt Natl Canc Inst*. 2011;23:73–8.
203. Rezaei N, Arandi N, Valibeigi B, Haghpanah S, Khansalar M, Ramzi M. FMS-Like Tyrosine Kinase 3 (FLT3) and Nucleophosmin 1 (NPM1) in Iranian Adult Acute Myeloid Leukemia Patients with Normal Karyotypes: Mutation Status and Clinical and Laboratory Characteristics. *Turk J Haematol*. 2017;34:300–6.
204. Jeon Y, Seo SW, Park S, Park S, Kim SY, Ra EK, et al. Identification of Two Novel NPM1 Mutations in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Ann Lab Med*. 2013;33:60–4.
205. Schneider F, Hoster E, Schneider S, Dufour A, Benthous T, Kakadia PM, et al. Age-dependent frequencies of mutations and Type-ITD in patients with normal karyotype AML (NK-AML). *Ann Hematol*. 2012;91:9–18.
206. Fernandez-Mercado M, Yip BH, Pellagatti A, Davies C, Larrayoz MJ, Kondo T, et al. Mutation Patterns of 16 Genes in Primary and Secondary Acute Myeloid Leukemia (AML) with Normal Cytogenetics. *PLOS ONE*. 2012;7:e42334.
207. Falini B, Bolli N, Shan J, Martelli MP, Liso A, Pucciarini A, et al. Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+ AML. *Blood*. 2006;107:4514–23.
208. Falini B, Bolli N, Liso A, Martelli MP, Mannucci R, Pileri S, et al. Altered nucleophosmin transport in acute myeloid leukaemia with mutated *NPM1*: molecular basis and clinical implications. *Leukemia*. 2009;23:1731–43.
209. Falini B, Gionfriddo I, Cecchetti F, Ballanti S, Pettirossi V, Martelli MP. Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): Any hope for a targeted therapy? *Blood Reviews*. 2011;25:247–54.
210. Becker H, Marcucci G, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, et al. Favorable Prognostic Impact of NPM1 Mutations in Older Patients With Cytogenetically Normal De Novo Acute Myeloid Leukemia and Associated Gene- and MicroRNA-Expression Signatures: A Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol*. 2010;28:596–604.

211. Thiede C, Koch S, Creutzig E, Studel C, Illmer T, Schaich M, et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2006;107:4011–20.
212. Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*. 2005;106:3733–9.
213. Haferlach C, Mecucci C, Schnittger S, Kohlmann A, Mancini M, Cuneo A, et al. AML with mutated NPM1 carrying a normal or aberrant karyotype show overlapping biologic, pathologic, immunophenotypic, and prognostic features. *Blood*. 2009;114:3024–32.
214. Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008;111:2776–84.
215. Boissel N, Renneville A, Biggio V, Philippe N, Thomas X, Cayuela J-M, et al. Prevalence, clinical profile, and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype. *Blood*. 2005;106:3618–20.
216. Kim Y-K, Kim H-N, Lee SR, Ahn J-S, Yang D-H, Lee J-J, et al. Prognostic significance of nucleophosmin mutations and FLT3 internal tandem duplication in adult patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Korean J Hematol*. 2010;45:36–45.
217. Chou W-C, Tang J-L, Lin L-I, Yao M, Tsay W, Chen C-Y, et al. Nucleophosmin mutations in de novo acute myeloid leukemia: the age-dependent incidences and the stability during disease evolution. *Cancer Res*. 2006;66:3310–6.
218. How J, Sykes J, Gupta V, Yee KWL, Schimmer AD, Schuh AC, et al. Influence of FLT3-internal tandem duplication allele burden and white blood cell count on the outcome in patients with intermediate-risk karyotype acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2012;118:6110–7.
219. Hsu CY, Yung BYM. Involvement of nucleophosmin/B23 in TPA-induced megakaryocytic differentiation of K562 cells. *Br J Cancer*. 2003;89:1320–6.
220. Verhaak RGW. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood*. 2005;106:3747–54.
221. de Lima MC, da Silva DB, Freund APF, Dacoregio JS, Costa TEJB, Costa I, et al. Acute Myeloid Leukemia: analysis of epidemiological profile and survival rate. *Jornal de Pediatria*. 2016;92:283–9.
222. Acute Myeloid Leukemia - Cancer Stat Facts. Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>
223. Kottaridis PD, Gale RE, Linch DC. Prognostic implications of the presence of FLT3 mutations in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2003;44:905–13.
224. Master S, Mansour R, Devarakonda SS, Shi Z, Mills G, Shi R. Predictors of Survival in Acute Myeloid Leukemia by Treatment Modality. *Anticancer Res*. 2016;36:1719–27.

225. Mitchell JM, Conklin EA. Factors affecting receipt of expensive cancer treatments and mortality: evidence from stem cell transplantation for leukemia and lymphoma. *Health Serv Res.* 2015;50:197–216.
226. Oran B, Weisdorf DJ. Allogeneic stem cell transplantation in first complete remission. *Curr Opin Hematol.* 2011;18:395–400.
227. Padilha SL, Souza EJ dos S, Matos MCC, Domino NR. Acute myeloid leukemia: survival analysis of patients at a university hospital of Paraná. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.* 2015;37:21–7.
228. Estey E. Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes in Older Patients. *JCO.* 2007;25:1908–15.
229. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians.* 62:10–29.
230. Viana MB, Cunha KCCMS, Ramos G, Murao M. [Acute myeloid leukemia in childhood: 15-year experience in a single institution]. *J Pediatr (Rio J).* 2003;79:489–96.
231. Singh H, Werner L, DeAngelo D, Ballen K, Amrein P, Wadleigh M, et al. Clinical outcome of patients with acute promyelocytic leukemia and FLT3 mutations. *Am J Hematol.* 2010;85:956–7.
232. Crespo-Solis E, Contreras-Cisneros J, Demichelis-Gómez R, Rosas-López A, Vera-Zertuche JM, Aguayo A, et al. Survival and treatment response in adults with acute promyelocytic leukemia treated with a modified International Consortium on Acute Promyelocytic Leukemia protocol. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2016;38:285–90.
233. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2008;358:1909–18.
234. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood.* 1998;92:2322–33.
235. Mrózek K, Marcucci G, Nicolet D, Maharry KS, Becker H, Whitman SP, et al. Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2012;30:4515–23.
236. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood.* 2010;116:354–65.
237. Grossmann V, Schnittger S, Kohlmann A, Eder C, Roller A, Dicker F, et al. A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations. *Blood.* 2012;120:2963–72.
238. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine.* 2012;366:1079–89.

239. Shih L-Y, Huang C-F, Wu J-H, Wang P-N, Lin T-L, Dunn P, et al. Heterogeneous patterns of FLT3 Asp(835) mutations in relapsed de novo acute myeloid leukemia: a comparative analysis of 120 paired diagnostic and relapse bone marrow samples. *Clin Cancer Res.* 2004;10:1326–32.
240. McCormick SR, McCormick MJ, Grutkoski PS, Ducker GS, Banerji N, Higgins RR, et al. FLT3 Mutations at Diagnosis and Relapse in Acute Myeloid Leukemia. *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134:9.
241. Konoplev S, Huang X, Drabkin HA, Koeppen H, Jones D, Kantarjian HM, et al. Cytoplasmic Localization of Nucleophosmin in Bone Marrow Blasts of Acute Myeloid Leukemia Patients is not Completely Concordant with NPM1 Mutation and is not Predictive of Prognosis. *Cancer.* 2009;115:4737–44.
242. Mullighan CG, Kennedy A, Zhou X, Radtke I, Phillips LA, Shurtleff SA, et al. Pediatric acute myeloid leukemia with NPM1 mutations is characterized by a gene expression profile with dysregulated HOX gene expression distinct from MLL-rearranged leukemias. *Leukemia.* 2007;21:2000–9.
243. Schnittger S, Kern W, Tschulik C, Weiss T, Dicker F, Falini B, et al. Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation-specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML. *Blood.* 2009;114:2220–31.
244. Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, Chen WC, Brandwein JM, Gupta V, et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature.* 2014;506:328–33.
245. Levis M. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2013;2013:220–6.
246. Palmisano M, Grafone T, Ottaviani E, Testoni N, Baccarani M, Martinelli G. NPM1 mutations are more stable than FLT3 mutations during the course of disease in patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2007;92:1268–9.

# Annexes

**Annexe I : : Molécules impliquées dans la différenciation précoce des cellules souches hématopoïétiques [1]**

MOLECULES IMPLIQUEES DANS LA DIFFERENCIATION PRECOCE DES CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUES AU COURS DU DEVELOPPEMENT					
Gène	Protéine*	Expression	Phénotype hématopoïétique des souris mutantes	Létalité	Phénotype souris chimères/cellules ES <i>in vitro</i>
<b>Fik-1/KDR (VEGFR-2)</b>	Récepteur à activité tyrosine kinase	Progéniteurs, cellules endothéliales, mésoderme précoce	Pas d'érythropoïèse primitive Aucune lignée définitive	E8,5-9,5	Quelques précurseurs érythroïdes primitifs dans les corps embryonnaires
<b>SCL/TAL-1</b>	bHLH	Progéniteurs, cellules érythroïdes, mégacaryocytes mastocytes, cellules endothéliales embryonnaires	Pas d'hématopoïèse primitive et définitive	E9,5	Aucune contribution aux tissus hématopoïétiques adultes
<b>Lmo2/Rbtn2</b>	Lim	Ubiquitaire	Pas d'hématopoïèse primitive et définitive	E10	Aucune contribution aux tissus hématopoïétiques adultes
<b>GATA-2</b>	GATA doigts de zinc	Progéniteurs, cellules érythroïdes, mégacaryocytes, mastocytes SNC et SNP**	Pas d'hématopoïèse primitive et définitive	E10,5-11,5	Contingent très réduit des progéniteurs multipotents définitifs. Différenciation myélo-érythroïde non bloquée
<b>AML-1 (CBF<math>\alpha</math>2) CBF<math>\beta</math></b>	runt	Ubiquitaire	Aucune lignée définitive	E12,5	Aucune contribution aux tissus hématopoïétiques adultes Différenciation érythroïde primitive
<b>c-kit</b>	Récepteur à activité tyrosine kinase	CSH et progéniteurs cellules endothéliales embryonnaires, expression variée dans l'embryon	↓ Progéniteurs myélo-érythroïdes définitifs Anémie sévère	Quelques jours après la naissance	-

1. Cortes F, Labastie M. Contrôle moléculaire du développement du système hématopoïétique chez les vertébrés. médecine/sciences. 2000;16:198.

## **Annexe II : facteurs de transcription impliqués dans l'hématopoïèse [1]**

### MOLÉCULES IMPLIQUÉES DANS LA DIFFÉRENCIATION D'UNE OU DE PLUSIEURS LIGNÉES HÉMATOPOÏÉTIQUES

Gène	Protéine*	Expression	Phénotype hématopoïétique des souris mutantes	Létalité
c-myb	Myb	CSH et progéniteurs myéloérythroïdes	Pas de myéloérythropoïèse définitive Pas de LB. Blocage précoce de la lymphopoïèse T	E15
PU.1	Ets	Progéniteurs multipotents myéloïdes, B et érythroïde	Pas de progéniteurs lymphoïdes B et T Aucun progéniteur myéloïde dans le foie	E17-18
Ikaros	Kruppel (doigts de zinc)	Foie, thymus et rate fœtaux Corpus striatum LT adultes et lignées leucémiques T	Pas de LB et cellules NK Lymphopoïèse T postnatale anormale	Viable
E2A	bHLH	Ubiquitaire	Pas de LB**	Après la naissance
Ets-1	Ets	Cellules endothéliales dans l'embryon. Thymocytes. Cellules T adultes	Pas de cellules NK fonctionnelles Blocage de l'activation des LT	Viable
GATA-1	GATA doigts de zinc	Progéniteurs, cellules érythroïdes, mégacaryocytes, mastocytes Testicules	Pas d'érythropoïèse primitive et définitive	E11
FOG	doigts de zinc	Progéniteurs, cellules érythroïdes, mégacaryocytes	Pas d'érythropoïèse primitive et définitive. Thrombocytopénie	E10,5-12,5
NF-E2	bZIP	Cellules érythroïdes, mégacaryocytes, mastocytes	Thrombocytopénie	Après la naissance

1. Cortes F, Labastie M. Contrôle moléculaire du développement du système hématopoïétique chez les vertébrés. médecine/sciences. 2000;16:198.

### Annexe III : classification des leucémies aiguës

La classification FAB des leucémies aiguës myéloïdes : [1]

Types	Caractéristiques	Incidence
LAM0	Représente environ 5% des LAM, absence de signes morphologiques de différenciation myéloïde. Seul, le phénotype permet de classer les blastes dans cette catégorie en montrant, en l'absence de marqueurs lymphoïdes, la présence de marqueurs myéloïdes.	3
LAM1 <b>myéloblastiques sans maturation</b>	L'infiltration blastique est monomorphe, sans aucune maturation granuleuse. Quelques blastes renferment de rares corps d'Auer, les myéloperoxydases sont positives dans au moins 5% des blastes. Elles n'ont pas d'anomalie caryotypique particulière identifiable.	15-20
LAM2 <b>myéloblastiques avec maturation</b>	Maturation granuleuse anormale (dysgranulopoïèse) avec hyposegmentation des noyaux des PN et hypogranularité des granuleux. Les blastes sont de grande taille	25-30
LAM3 <b>promyélocyaires</b>	Leucémie aiguë promyélocytaire. <b>Forme classique :</b> 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. <b>Forme variante :</b> 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.	5-10
LAM4 <b>myélomonocytaires</b>	L'infiltration est à la fois myéloblastique et monocytaire. La composante monocytaire prédomine dans le sang et la morphologie myéloblastique prédomine dans le sang. Une forme est particulière par l'existence de précurseurs éosinophiles morphologiquement anormaux dans la moelle osseuse (LAM4 avec éosinophiles ou LAM4eo).	25-30
LAM5 <b>monoblastiques</b>	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).	2-20
LAM6 <b>érythroleucémie</b>	Les érythroblastes sont anormaux, comportant des anomalies de maturation et il existe parfois une	3-5

	érythroblastémie. Il existe un excès de blastes par rapport aux cellules non érythroblastiques (>30% de myéloblastes), est associée une dysgranulopoïèse et une dysmégacaryocytopoïèse,	
LAM7 <b>mégacaryocytoblastiques</b>	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.	3-12

La classification OMS 2008 des leucémies aigues myéloïdes :[2]

<b><u>LAM avec anomalies génétiques récurrentes</u></b>
-LAM avec t (15:17); PML/RARA (FAB M3)
-LAM avec t (8:21); RUNX1/RUNX1T1
-LAM avec t (16:16) ou inv(16); CBFβ/MYH11
-LAM avec t (9:11); MLLT3/MLL
-LAM avec t (6;9); DEK/NUP214 (Nouveau)
-LAM avec inv(3) ou t (3;3); RPN1/EVI1 (Nouveau)
-LAM avec t (1;22); RBM15/MKL1 (Nouveau)
- <u>Entités provisoires:</u>
• LAM avec mutation NPM1 (Nouveau)
• LAM avec mutation CEBPA (Nouveau)
<b><u>LAM avec des changements liés à la Myélodysplasie (Renommé)</u></b>
<b><u>LAM associées à la thérapie.</u></b>
<b><u>LAM NOS (25-30% des LAM)</u></b>
-LAM avec différenciation minimal (FAB M0)
-LAM avec mutation (FAB M1)
-LAM avec maturation granulocytaire (FAB M2)
-LA Myélomonocytaire (FAB M4)
-LA Monoblastique /Monocytaire (FAB M5)
-LA érythroïdes (FAB M6)
-LA Mégacaryoblastiques (FAB M7)
-LA panmyelosis avec myélofibrose
-LA basophile
<b><u>Sarcome Myéloïde</u></b>
<b><u>Proliférations myéloïdes liées au syndrome de Down</u></b>
-Anomalies myélopoïèse transitoires
-Leucémie myéloïde associée au syndrome de Down
<b><u>Tumeurs blastique dendritiques plasmacytoïdes cellulaire</u></b>

1. FERRANT. A. Hématologie. Faculté de Médecine Unité d'Hématologie, 2004 ;1
2. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H. World Health Organization Classification of Tumours: Tumours of Haematopoietic and lymphoid tissues. In: eds. Lyon: IARC Press. 2008.

#### Annexe IV : classification des LAL :

##### Classification FAB des LAL : [1]

LAL	Caractéristiques	Incidence (%)
L1	<ul style="list-style-type: none"><li>• Prolifération cellulaire homogène</li><li>• Blastes de 15 à 25 µm de diamètre</li><li>• Rapport nucléocytoplasmique élevé (&gt; 80 %)</li><li>• Noyau arrondi avec 1 ou 2 petites encoches</li><li>• Chromatine fine avec petit nucléole</li><li>• Cytoplasme basophile réduit à une fine couronne périnucléaire</li><li>• Pas de corrélation entre morphologie et immunologie</li></ul>	30
L2	<ul style="list-style-type: none"><li>• Prolifération cellulaire hétérogène</li><li>• Blastes de 20 à 30 µm de diamètre</li><li>• Rapport nucléocytoplasmique variable (&lt; 80 %)</li><li>• Noyau à contour régulier</li><li>• Chromatine fine parfois réticulée 1 à 2 nucléoles bien visibles</li><li>• Cytoplasme basophile avec parfois de fines granulations peroxydase négative</li><li>• Pas de corrélation entre morphologie et immunologie.</li></ul>	65
L3 Leucémie de Burkitt	<ul style="list-style-type: none"><li>• Prolifération cellulaire hétérogène</li><li>• Blastes de 20 à 30 µm de diamètre</li><li>• Noyau arrondi</li><li>• Chromatine fine parfois perlée 1 à 2 nucléoles bien visibles</li><li>• Cytoplasme abondant très basophile souvent criblé de vacuoles</li><li>• Marqueurs immunologiques des proliférations B</li></ul>	5

1. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood. 2009;114:937–51.

## Classification EGIL des LAL : [2]

<b>Lignée B</b> : toujours C19+ et/ou CD79+ et/ou CD22+	
BI (pro-B)	Pas d'autre marqueur B
BII (B commune)	CD10+
BIII (pré-B)	Chaîne $\mu$ intracytoplasmique
BIV (B mature)	Chaîne légère Kappa ou Lambda de surface
<b>Lignée T</b> : toujours CD3+ en intracytoplasmique ou en surface	
TI (Pro-T)	CD7+
TII (pré-T)	CD2+ et/ou CD5+ et/ou CD8+
T-III (T cortical)	CD1a+
T-IV (T mature)	CD3+ en surface, CD1a-
a: $\alpha/\beta$ T	TCR $\alpha/\beta$ +
b : $\gamma/\delta$ T	TCR $\gamma/\delta$ +

Tableau 2. Classification EGIL des LAL [13].				
Toutes les LAL B ont au moins 2 des 3 Ag suivants : CD19+, CD22+ (s ou c), cCD79a+				
	CD10	c $\mu$	s lg	
B-I (pro-B)	-	-	-	
B-II (common ALL)	+	-	-	
B-III (pré-B)	±	+	-	
B-IV (mature B)	±	±	+	
Pour affirmer le caractère T : cCD3+				
Ensuite on peut classer en 4 stades :	CD7	CD2 et/ou CD5 et/ou CD8	CD1a	sCD3
T-I (pro-T ou early T)	+	-	-	-
T-II (pré-T)	+	+ (au moins un)	-	-
T-III (thymocytes communs, corticaux, intermédiaires)	±	+ (au moins un) CD4+ et CD8+		±
T-IV (mature T) Groupe a : TCR % + Groupe b : TCR % +	±	+ (au moins un) CD4+ ou CD8+	-	+

Remarque : T-I et T-II sont parfois regroupés = thymocytes immatures ou prothymocytes.  
c : cytoplasmique ; s : de surface ; lg : immunoglobuline ;  $\mu$  : chaîne lourde  $\mu$

2. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. 1995;9:1783–6.

## Classification OMS des LAL [3,4]

### Classification des leucémies aiguës lymphoïdes sur la présence d'anomalies génétiques récurrentes :

- ❖ Leucémies aiguës lymphoïdes hyperdiploïdes à plus de 50 chromosomes (entre 51 et 64)
  - Fréquence estimée à 20-25 % des LAL chez l'enfant (2 et 10 ans).
  - Il s'agit le plus souvent de LAL communes (BII) non hyperleucocytaires
  - Bon pronostic
- ❖ Leucémies aiguës lymphoïdes hyperdiploïdes à moins de 45 chromosomes
  - Fréquence estimée à 5 % environ.
  - Il s'agit habituellement de LAL B communes (BII) mais parfois aussi de LAL T dans 20 % des cas.
  - Mauvais pronostic
- ❖ Leucémies aiguës lymphoïdes B avec t (12;21) (p13;q22)
  - Fréquence dans 25 % des cas de LAL B de l'enfant.
  - Pronostic favorable
- ❖ Leucémies aiguës lymphoïdes B avec t (1;19) (q23;p13.3)
  - 6 % des cas de LAL B chez l'enfant.
  - Pronostic péjoratif
- ❖ Leucémies aiguës lymphoïdes B avec t (9;22) (q34;q11.2)
  - Rares chez l'enfant (3 à 4%)
- ❖ Leucémies aiguës lymphoïdes B avec anomalies du gène MLL (11q23)
  - Fréquence chez l'enfant estimée à 2-3 %.
  - Constitue 60 % environ des LAL B de l'enfant de moins de 1 an

- ❖ Leucémies aiguës lymphoïdes à cellules de Burkitt
- ❖ Leucémies aiguës lymphoïdes T avec t (5;14) (q35;q32)
  - 25 % des LAL T de l'enfant.
  - Mauvais pronostic

### Leucémies aiguës lymphoïdes sans anomalies génétiques significatives.

D'autres anomalies cytogénétiques sont mises en évidence dans les LAL, mais elles ne sont pas associées à des entités particulières.

Il existe en outre des LAL B ou T pour lesquelles aucune anomalie génétique n'est actuellement détectée.

3. Zerbini MCN, Soares FA, Pereira EDR. World Health Organization Classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues, 4th edition, 2008 – major changes from the 3rd edition, 2000. Rev Assoc Med Bras. 2008;8.

4. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Beau MML, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016;127:2391–405.





## ETUDE GENETIQUE SUR LES LEUCEMIES

**Chercheur :** AYACHI Sariyah, Doctorante en génétique moléculaire.

### **Fiche de consentement**

Je soussigné(e), ..... et reconnais avoir été informé par le chercheur indiqué ci-dessus sur les examens génétiques concernant **les leucémies** et donne mon consentement pour un prélèvement sanguin afin d'effectuer ou de faire effectuer les études génétiques sur ADN qui peuvent aider au diagnostic ou à la prévention de la maladie.

- sur moi-même
- sur la personne placée sous ma tutelle : Nom et Prénom-----

**Je donne mon accord** pour que la partie de mon prélèvement non utilisée soit à la disposition de la communauté scientifique à des fins de **recherche bio-médicale**. Et je peux me retirer de cette étude si je le désirerai à tout moment et toutes mes informations seront confidentielles.

Signature



## **Annexe VII : Caryotype standard :**

### **a- Prélèvements :**

On prélève de chaque patients 2 ml de sang. Tous les prélèvements sont effectués sur des tubes stériles sur héparines du sodium (L'anticoagulant de choix selon les recommandations du Groupe Français de Cytogénétique).

Il est préférable de commencer la manipulation le jour même du prélèvement, sinon le sang peut être conservé à 4° C, pendant une durée maximale de 4 jours jusqu'à obtention des éléments nécessaire pour la mise en culture

### **b- Culture cellulaire :**

- La mise en culture se fait dans des flacons du type Falcon avec le milieu de culture RPMI1640 (avec L-Glutamine), c'est un milieu de culture fournit prêt à l'emploi. Un minimum de deux cultures indépendantes est requis pour réaliser un caryotype. La composition du milieu de culture RPMI1640 natif (Appelé également milieu de Moore modifié) est mentionnée dans l'annexe.
- Le milieu de culture, préparé auparavant dans des aliquotes et conservée à -20°C, est mis dans l'étuve pour sa décongélation extemporanément juste avant l'utilisation. Il contient :
  - **Milieu de culture RPMI1640:** 6,5 ml.
  - **Sérum de veau fœtal:** 1,5 ml.
  - **2 gouttes de pénicilline** (Antibiotique).
  - **PHA C:** 100 µl.
  - **Héparine:** 50 µl.
  - **Sang (L'échantillon):** 10 gouttes (Environ 200 µl).

Il est à noter qu'il existe d'autres milieux de culture prêts à l'emploi (Des Kits) et contiennent tous les éléments précités comme le PBMax.

La culture est réalisée dans des flacons de 15 ml, elles sont disposés horizontalement dans une étuve à 37° C, avec pression de CO<sub>2</sub> modulable (5 %) et pendant 72 heures. L'observation des cultures sous microscope après 72 h n'est pas nécessaire, les manipulations pour l'obtention du caryotype seront entamées directement.

### **c- Caryotype:**

#### ➤ **Arrêt des mitoses :**

- Après 72 heures d'incubation (Le temps nécessaire pour une croissance cellulaire assez importante), on sort les cultures de l'étuve.
- Le blocage des mitoses en métaphase se fait par ajout de 150 µl de la colchicine (À 20mg/l).

- On remet les tubes dans l'étuve à 37° C après addition de la colchicine, pendant 1 heure 30 en position horizontale pour que la colchicine puisse agir. On centrifuge les tubes à 1500 tours/minute, pendant 5 minutes.

➤ **Choc hypotonique :**

- Après la centrifugation, on jette le surnageant, et on ajoute 1,5 ml de KCl à 5,6 g/l pour réaliser le choc hypotonique. Par des agitations modérées, jusqu'à dissolution totale du culot, puis vigoureusement et on termine cette étape en complétant en quantité suffisante pour jusqu'à 6,5 ml.
- On remet ensuite les tubes à l'étuve toujours réglée à 37° C pendant 20 minutes en position horizontale.

➤ **Préfixation :**

- Juste avant la fin des 20 minutes du choc hypotonique, on prépare la solution de fixation, le Carnoy acétique, qui est un mélange de méthanol et d'acide acétique, avec des proportions de 3 V de méthanol et 1 V d'acide acétique. La quantité de la solution n'est pas déterminée, elle dépend du nombre des tubes. Le volume de la solution de fixation à mettre est de 1 ml dans chaque tube. On mélange par agitation modérée pour éliminer le reste du KCl.
- On mélange puis on centrifuge à 1500 tours/minute pendant 5 minutes.
- On jette le surnageant.

➤ **Fixation :** Elle se fait en deux temps :

- **La 1<sup>ère</sup> fixation :** Après avoir jeté le surnageant, on ajoute 0,5 ml du Carnoy acétique puis on vortex jusqu'à dissolution totale du culot, et on complète ensuite en qsp jusqu'à 6,5 ml. On laisse pendant 20 minutes à l'air libre et à température ambiante. On centrifuge à 1500 tours/minute pendant 5 minutes et on déverse le surnageant et on garde le culot.
- **La 2<sup>ème</sup> fixation :** Après avoir jeté le surnageant, on ajoute 0,5 ml de la solution de fixation puis on vortex jusqu'à dissolution totale du culot, et on complète ensuite en qsp jusqu'à 6,5 ml. On laisse pendant 20 minutes à l'air libre et à température ambiante. On centrifuge à 1500 tours/minute pendant 5 minutes et on déverse le surnageant avec une pipette en laissant quand même de 0,5 à 1 ml ; ce volume est proportionnel avec la quantité du culot cellulaire et déterminera par la suite la densité des lames en noyaux. Le culot cellulaire est conservé.
- A ce stade on peut continuer notre manipulation et faire l'étalement, soit garder nos tubes issues de la deuxième fixation (Culot + surnageant) dans un réfrigérateur à 4°C pour une utilisation ultérieure.

➤ **Étalement :**

- Avant étalement, on mélange jusqu'à dissolution du culot dans le reste du surnageant.
- Pour réaliser l'étalement, on fait tomber deux gouttes de chaque suspension cellulaire sur les lames. Il faut respecter une certaine distance pour l'améliorer et permettre aux gouttes de mieux se disperser. On laisse les lames sécher à l'air libre.

➤ **Coloration :**

- La coloration se fait au Giemsa diluée 1/20, préparée extemporanément. On verse la solution sur les lames jusqu'à ce qu'elle soit couvertes complètement et on les laisse pendant 5 à 8 minutes. Après, les lames sont rincées à l'eau courante et séchées verticalement à l'air libre.
- Il faut savoir que cette coloration est primaire ; elle nous permet de savoir si notre lame contient des métaphases ou pas. Si c'est le cas on procède à une dénaturation.

➤ **La dénaturation :**

- Avant la dénaturation, on met les lames dans l'étuve à 37° C pendant une nuit pour permettre le vieillissement. Ce vieillissement nous permet de déterminer la richesse réelle des lames en mitoses, le temps de la dénaturation sera fonction de ce paramètre.
- Avant de d'entamer la coloration, on préchauffe le bain marie à 65° C. Une plaque est déposée au-dessus de celui-ci sur laquelle on place les lames.
- La dénaturation se fait par la chaleur, on place les lames dans un bac en porcelaine rempli de solution d'EARLE diluée au 1/10 préchauffée pendant 20 min. Enfin, on plonge le bac dans le bain marie réglé à 87° C pendant 47 min.
- Une fois le temps écoulé, on fait un choc thermique en plaçant le bac sous l'eau courante, ensuite on fait une coloration avec le Giemsa.

## Protocole d'extraction de l'ADN

### Salting out

(Miller *et al.*, 1988).

Après réalisation d'un prélèvement sanguin de 5 à 10 ml dans des tubes EDTA, l'extraction de l'ADN est lancée immédiatement ou (si les conditions ne le permettent pas) dans les 3 jours qui suivent la réalisation du prélèvement conservé à +4°C. L'extraction de l'ADN se fait en 3 étapes :

- **Préparation des leucocytes** : les leucocytes sont séparés du sang total par lyse hypotonique des érythrocytes dans un tampon Tris-EDTA (Tris 20 mM, EDTA 5 mM, pH 7,5) (TE) 20:5 pendant 10 minutes dans la glace. Après lavage, le culot est remis en suspension dans le TE 20:5.

- **Extraction de l'ADN** : se fait par ajout d'un tampon de lyse (NaCl 400 mM, EDTA 2 mM, Tris 10 mM, pH 8,2), du Sodium Dodécyle Sulfate (SDS) à 10 % et de la protéinase K à 10 mg/ml.

Les tubes sont mis en rotation sur une roue, à 27°C, pendant une nuit, et sont refroidis le lendemain dans la glace pendant 5 minutes. On ajoute ensuite 1 ml de NaCl 4M pour permettre la libération de l'ADN nucléaire dans le lysat ainsi que la digestion et l'élimination des protéines qui lui sont associées par précipitation avec ce solvant inorganique. La pelote d'ADN est formée dans le surnageant par précipitation avec l'éthanol pur. Une fois la pelote d'ADN récupérée avec une pipette Pasteur, elle est rincée deux fois dans l'éthanol à 70 % et mise ensuite dans un tube Nunc<sup>®</sup> de 1,5 ml.

- **Solubilisation** : l'ADN ainsi obtenu est solubilisé en phase aqueuse (on ajoute entre 300 et 1000 µl d'eau bi-distillée selon la grosseur de la pelote). On laisse une nuit sur un agitateur-rotateur à 37°C, puis à température ambiante jusqu'à dissolution complète (1 à 2 jours).

**Annexe IX :**  
**Représentation schématique de la séquence de l'exon 12 de la *NPM1* avec localisation de la région d'intérêt et les amorces utilisées pour l'amplification et les hot-spots de mutations**

5'...TTTTTATGACTGATTAAAGTGTTTGGGAATTAAATTACATCTGAGTA  
TAAATTTTCTTGGAGTCATATCTTTATCTAGAGTTAACTCTCTGGTGGT  
AGAATGAAAAATAGATGTTGAACTATGCAAAGAGACATTTAATTTAT  
TGATGTCTATGAAGTGTTGTGGTTCCCTTAACCACATTTCTTTTTTTTTT  
TTTCCAGGCTATTCAAGATCTCTGGCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGA  
AAATAGTTTAAACAATTTGTTAAAAAATTTTCCGTCTTATTTCAATTTCT  
GTAACAGTTGATATCTGGCTGTCCTTTTTTATAATGCAGAGTGAGAACT  
TTCCCTACCGTGTTTGATAAATGTTGTCCAGGTTCTATTGCCAAGAAT  
GTGTTGTCCAAAATGCCTGTTTAGTTTTTAAAGATGGAACCTCCACCCT  
TTGCTTGGTTTTAAGTATGTATGGAATGTTATGATAGGACATAGTAGT  
AGCGGTGGTCAGACATGGAAATGGTGGGGAGACAAAAATATACATGT  
GAAATAAACTCAGTATTTTAATAAAGTA3'

Amorces (F) et (R)



La région séquencée



Régions de mutations



Données recueillies sur ENSEMBL Genome Browser

# Résumés

## الملخص:

تشكل اللوكيميا مجموعة غير متجانسة من امراض الدم الخبيثة و تعتبر اللوكيميا الحادة التعبير الخاص عن هذا التغير، حيث يكون في بعض الأحيان من الصعب التمييز بين مختلف الأنواع. إن فهم الفيزيولوجيا المرضية لهذا الداء على المستوى الخلوي و الجزيئي في تقدم و تعتبر العلامات الوراثية في الوقت الحاضر هي الأهم لتصنيف، فهم و علاج المرضى. و مع ظهور التكنولوجيا الحديثة، بدأ إكتشاف علامات جزيئية أخرى، مثل الطفرات و تحديد الملامح الفوق جينية يلعب دورا هاما في تحليل المرض. يسهم تحديد هذه العلامات الحيوية في فهم أفضل للأساس الجزيئي للمرض و الذي قد يكون مفيدا للغاية لتشخيص و مراقبة اللوكيميا الحادة و حتى التنبؤ بقابلية استجابة كل مريض للعلاج.

في المرحلة الأولى من عملنا، أجرينا دراسة مستعرضة للوكيميا الحادة، فقمنا بتحليل دموي عادي، خلوي و وراثي للمرضى المصابين بسرطان الدم الحاد النخاعي و اللمفاوي المعالجين في المركز الإستشفائي الجامعي بن باديس قسنطينة.

في المرحلة الثانية، قمنا برصد التنوعات الجزيئية للمورثة « FLT3-ITD, TKD » و الجزء 12 من المورثة « NPM1 » عند مرضى اللوكيميا النخاعية الحادة. و لقد أظهرت نتائجنا أن نسبة تواجد هذه الطفرات عند مرضانا هي منخفضة نوعا ما مقارنة بنتائج الدراسات الأخرى، كما أنه تم إكتشاف طفرة جديدة غير مصنفة على مستوى المورثة

في النهاية قمنا بتحليل تأثير وجود هذه الطفرات على الإستجابة للعلاج و حياة مرضى سرطان الدم النخاعي الحاد، و قد أظهرت النتائج أن طفرات « FLT3 » لها تأثيرا سلبيا على مستقبل المرضى حيث أنها تزيد من احتمال عودة المرض و الوفاة على عكس طفرات المورثة « NPM1 » التي يبدو أن لها تأثيرا إيجابيا على المرضى خاصة عندما لا تكون مرتبطة بطفرات « FLT3-ITD, TKD »

أثبتت الدراسة الجزيئية و الجزيئية ال خلوية أنها الأداة الأفضل للتكفل باللوكيميا الحادة، و قد تم تأسيس إرتباط شبه خاص بين بعض أنواع اللوكيميا الحادة و بعض الطفرات الوراثية. هذه التحاليل مهمة لتأكيد التشخيص و إختيار أمثل لطريقة العلاج و المتابعة و بالتالي تحسين رعاية المرضى في المراكز الإستشفائية الخاصة.

**الكلمات المفتاحية :** اللوكيميا الحادة، FLT3-ITD, TKD . الطفرات الوراثية. NPM1 .

**Abstract:**

Leukemia is a very heterogeneous group of malignant neoplasms and this heterogeneity expresses itself more particularly in the acute leukemia where sometimes it turns out to be difficult to make the distinction between the various entities. The pathophysiology of this disease is starting to be understood at the cellular and molecular levels, and cytogenetic markers have become the most important for the stratification of the risk and the treatment of the patients.

However, with the advent of the new technologies, the identification of other molecular markers, like gene mutations and the characterization of the profiles of the epigenetic modifications, began to play an important role in the understanding of the disease. The identification of these biomarkers contributes to a better understanding and a better treatment strategies of the patients.

At first of our work, we proceeded to a transverse study on the acute leukaemia, and for that we made a hematological, cytological and cytogenetic analysis for acute leukemia patients who were received at hematology center in our hospital.

Secondly, molecular variations of the gene *FLT3* (*FLT3-ITD* and *FLT3-TKD*) and of the exon12 of the gene *NPM1* were analysed for the AML patients. Our results reveal that *FLT3* and *NPM1* mutations are less frequent in our population than reported in literature. we were also able to describe a new unreported complex mutation in the exon 12 of the *NPM1* gene.

Finally, we analyzed the effect of the presence of the previously detected mutations on the answer to the treatment, the survival and the future of the AML patients. Our results showed that the mutations of the *FLT3* have a pejorative effect on the future of the patients, they indeed increase, the possibility relapse and death rate contrary to the mutations of the *NPM1* gene which appear to have a positive effect on the AML patients when they are not associated with the *FLT3-ITDs*.

The molecular and cytogenetic analysis for leukemia patients' turned out to be an important diagnosis tool for prognosis of the acute leukemia. The specific association between acute leukemia subtypes and certain anomalies was clearly established. These analyses are important for confirming the diagnosis, to establish a prognosis, to make a choice and a therapeutic follow-up and consequently, the management of patients at the hematological centers can be improved.

**Keywords:** acute leukemia, *FLT3* mutations, *NPM1* mutations, survival.

**Aspects biologiques et génétiques des leucémies aiguës**  
**Implication des gènes *FLT3* et *NPM1* dans la réponse au traitement**

**Thèse pour l'obtention du diplôme de Docteur en Sciences en Génétique Moléculaire**

**Le résumé :**

Les leucémies sont un groupe très hétérogène d'hémopathies malignes et cette hétérogénéité s'exprime plus particulièrement dans les leucémies aiguës où il s'avère parfois très difficile de faire la distinction entre les différentes entités. La physiopathologie de cette maladie commence à être comprise au niveau cellulaire et moléculaire, et les marqueurs cytogénétiques sont actuellement les plus importants pour la stratification du risque et le traitement des patients. Cependant, avec l'avènement des nouvelles technologies, la détection d'autres marqueurs moléculaires, tels que les mutations ponctuelles et la caractérisation des profils épigénétiques, a commencé à jouer un rôle important dans l'approche de la maladie. L'identification de ces biomarqueurs contribue à une meilleure compréhension de la base moléculaire de la maladie, ce qui est très utile pour le diagnostic, le pronostic et la surveillance de la LAM, ainsi que pour prédire la réponse de chaque individu au traitement.

Dans un premier temps de notre travail, on a procédé à une étude transversale sur les leucémies aiguës, et pour cela nous avons effectué une analyse hématologique et cytologique et cytogénétique pour des patients atteints de leucémies aiguës myéloïdes et lymphoïdes recrutés au niveau du CHUC.

Dans un deuxième temps, des variations moléculaires du gène *FLT3* (*FLT3-ITD* et *FLT3-TKD*) et de l'exon12 du gène *NPM1* ont été prospectées chez les patients LAM. Nos résultats ont montré que notre population d'étude est caractérisée par des fréquences faibles de ces mutations et on a pu décrire également une nouvelle mutation non répertoriée au niveau de l'exon12 du gène *NPM1*.

A la fin, on a analysé l'effet de la présence de mutations précédemment détectées sur la réponse au traitement, la survie et le devenir des patients LAM. Nos résultats ont montré que les mutations du *FLT3* ont un effet péjoratif sur le devenir des patients, elle augmente en effet, la possibilité de récurrence et de décès contrairement aux mutations du gène *NPM1* qui paraissent avoir un effet positif sur les patients LAM quand elles ne sont pas associées aux *FLT3-ITDs*.

L'étude moléculaires et cytogénétiques des leucémies s'est révélée être un outil de premier choix pour la prise en charge des leucémies aiguës. L'association quasi-spécifique entre certaines leucémies aiguës et certaines anomalies a été clairement établi. Ces analyses sont importantes pour 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 structures hospitaliers spécialisées peut être améliorés.

**Mots-clés :** leucémies aiguës, mutations, *FLT3*, *NPM1*, survie globale.

**Laboratoires de recherche :**

Laboratoire de Biologie et Génétique Moléculaire (Université Constantine 3),  
Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire (Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

**Président :** ROUABAH Abdelkader- Professeur- Université des Frères Mentouri, Constantine 1

**Directrice :** SATTA Dalila - Professeur - Université des Frères Mentouri, Constantine 1.

**Examineurs :** SIDI MANSOUR Nouredine- Professeur - Constantine 3,  
REZGOUN Mohamed Larbi - MC-A - Université des Frères Mentouri, Constantine 1,