



PROFIL MOLÉCULAIRE DES PATIENTS ATTEINTS DE LMC AU NIVEAU DE L'EHU 1^{er} NOVEMBRE D'ORAN

**XIII^{ème} CONGRÈS
MAGHRÉBIN D'HÉMATOLOGIE**

Du 26 au 28 MAI 2016
Hôtel SHERATON - ALGER



SOCIÉTÉ ALGÉRIENNE
d'Hématologie et de Transfusion Sanguine

NACHI M; CMH Alger, Sheraton, Alger



LEUCÉMIE MYÉLOÏDE CHRONIQUE (LMC)

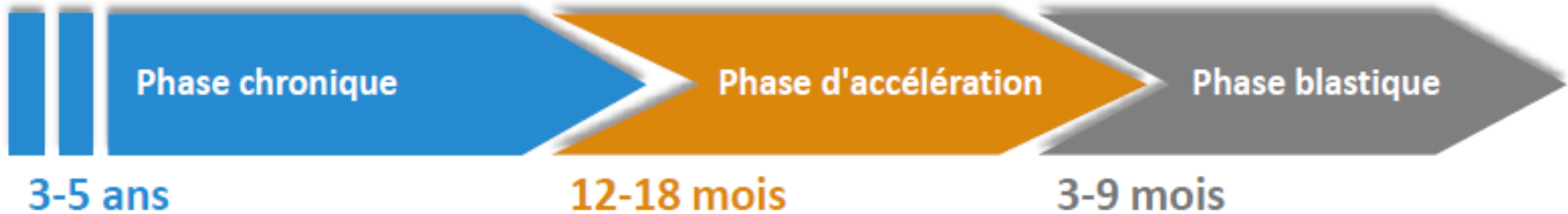
- Syndrome myéloprolifératif chronique (WHO 2016)¹ .
- Hémopathie maligne rare (15% de l'ensemble des leucémies de l'adulte): **la CSH** .
- Marqueur cytogénétique: **Chromosome Phi²** .

1. Daniel A., et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016; 127(20):2391-2405)

2. Nowell P, Hungerford D (1960) A Minute Chromosome In Human Granulocytic Leukemia. *Science* 1960;132:1497-1500

LEUCÉMIE MYÉLOÏDE CHRONIQUE (LMC)

Avant 2000



Après 2000 (pour la majorité des patients)

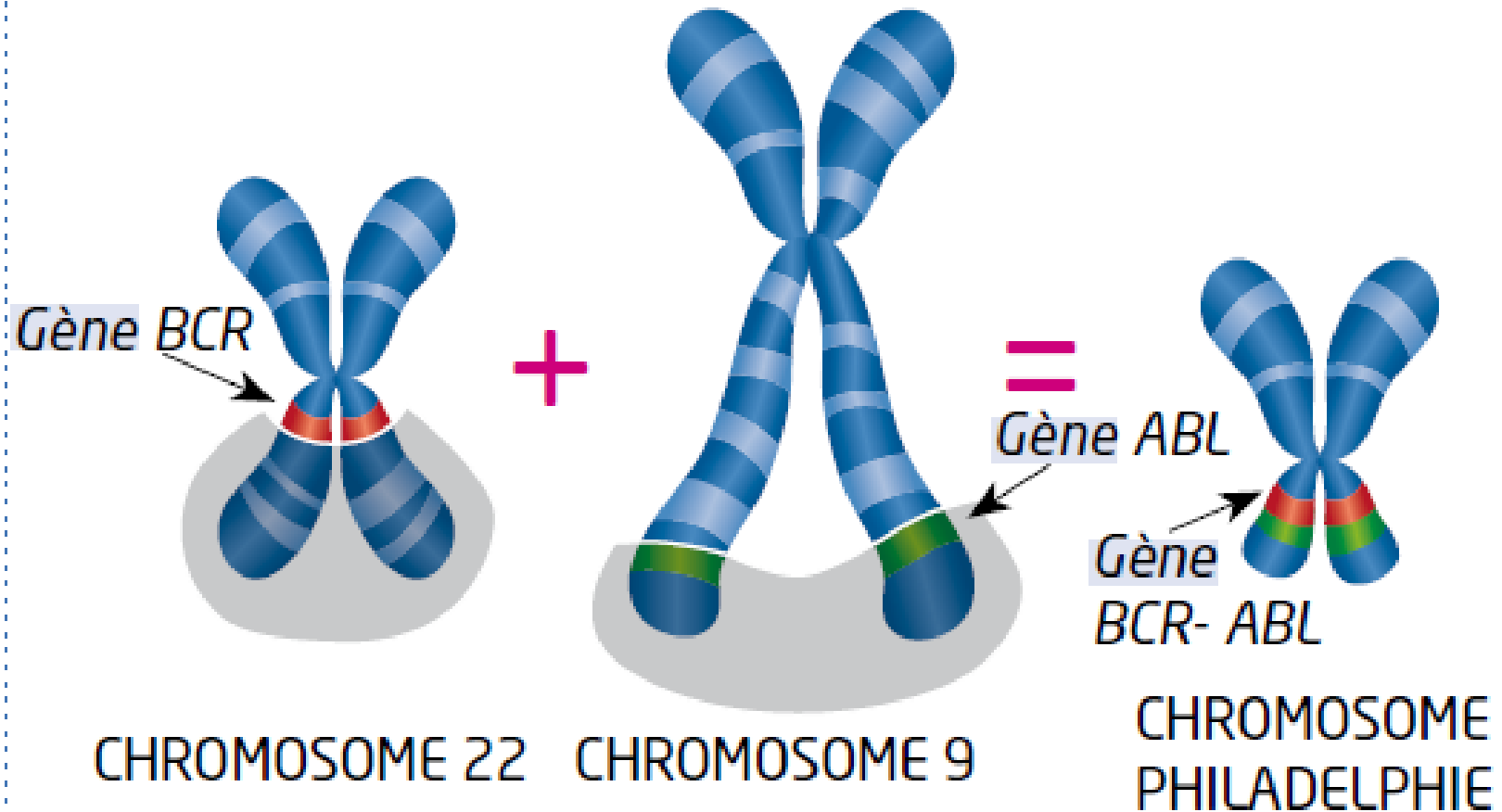


D'après John Goldman.

Origine et conséquences

FORMATION DU CHROMOSOME PHILADELPHIE

Translocation réciproque t (9;22)



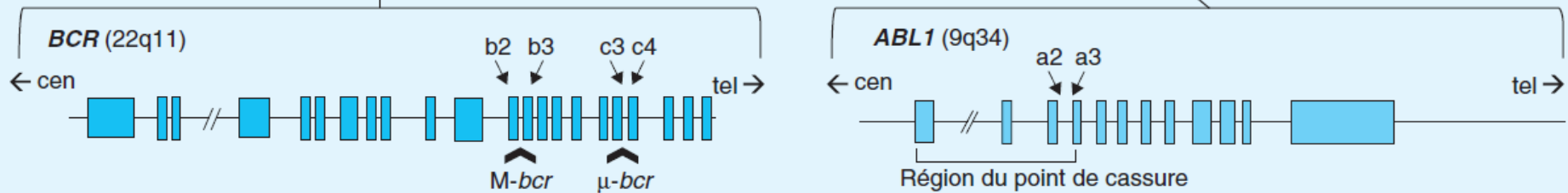
Origine et conséquences

A

Chromosome 22

Chromosome 9

Chromosome philadelphie
der(22)t(9;22)(q34;q11)

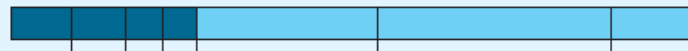


B

Type de transcrit de fusion *BCR-ABL1*

Fréquence

e14a2 = b3a2



55 %

M *BCR-ABL1*

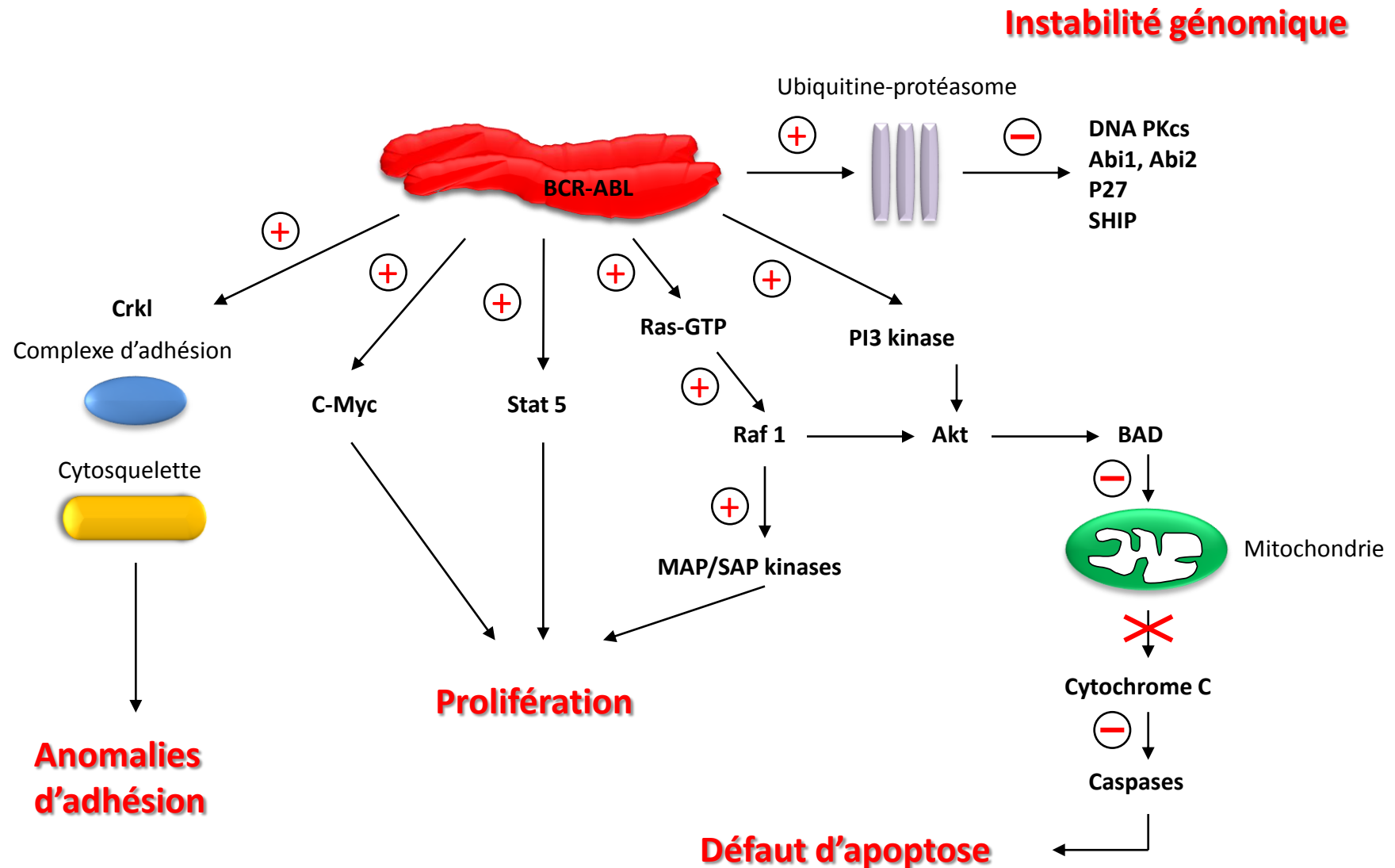
e13a2 = b2a2



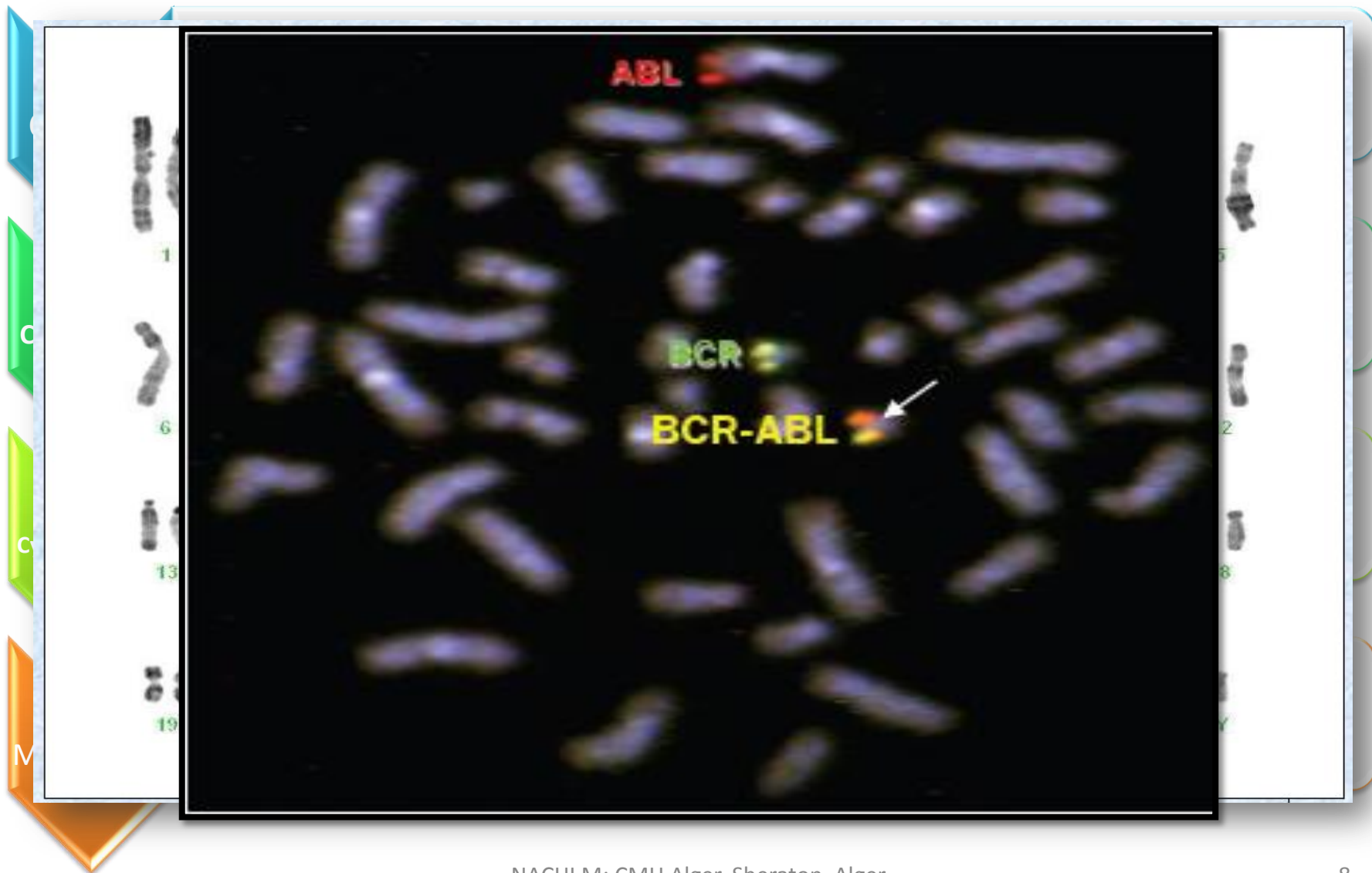
40 %

M *BCR-ABL1*

Origine et conséquences



LEUCÉMIE MYÉLOÏDE CHRONIQUE (LMC) DIAGNOSTIC



EXPERIENCE DE L'EHU ORAN

Objectifs

1

Mise en place des techniques de RT-PCR Multiplex et de QRT-PCR en temps réel au niveau du Service de Biochimie de l'EHU Oran / dans le cadre d'une thèse de DESM (Pr. Bekadja)

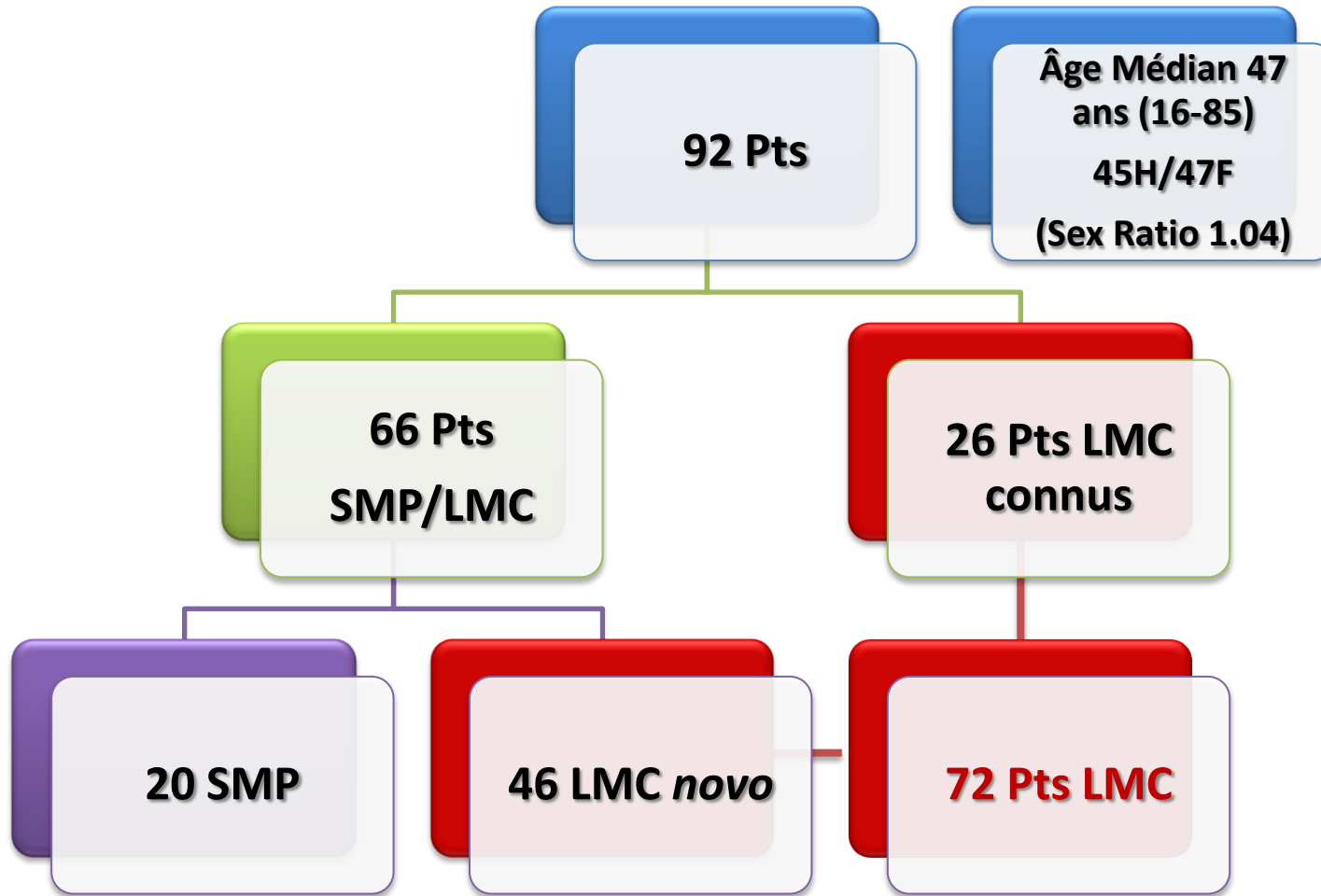
2

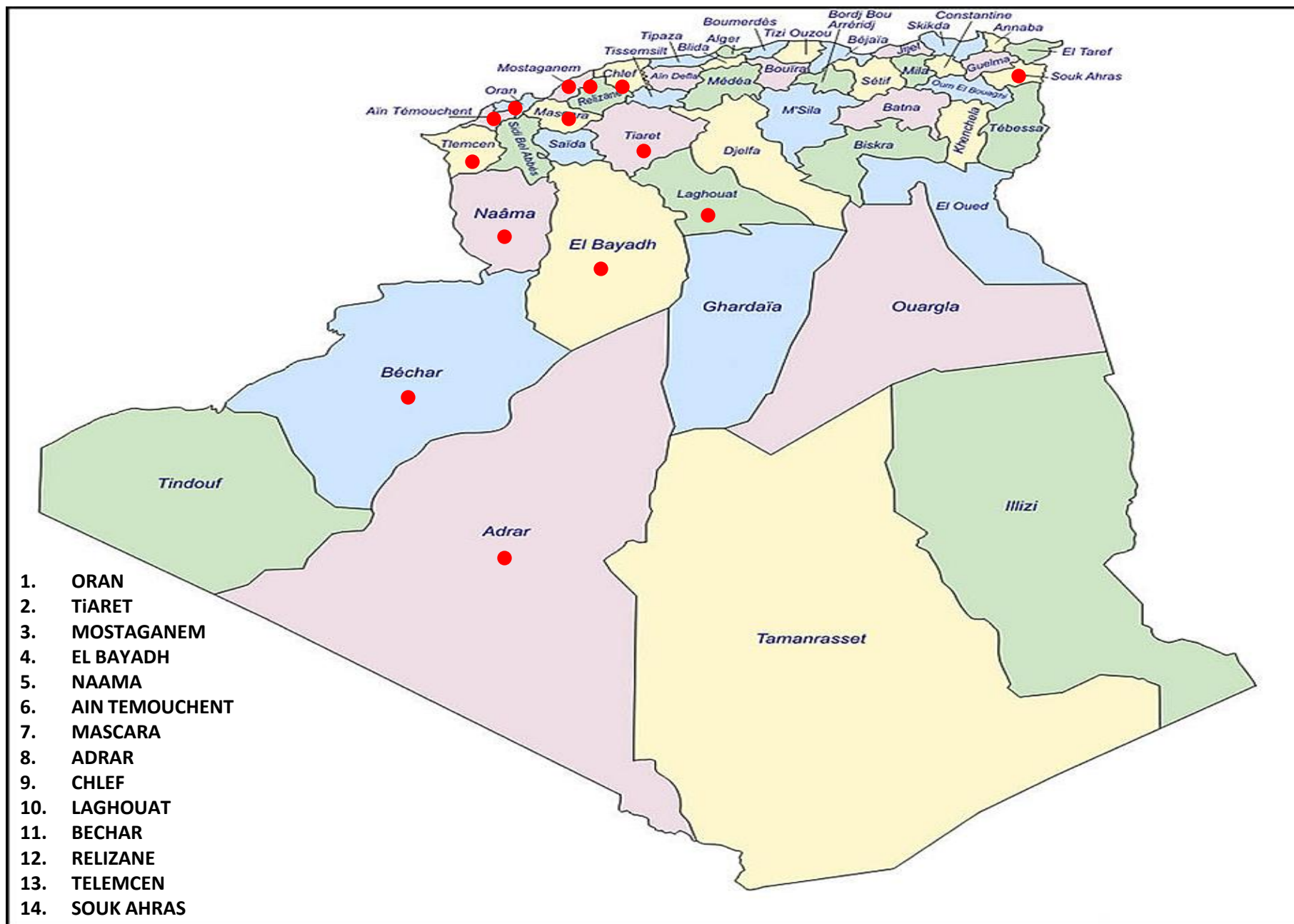
Diagnostic moléculaire, typage du transcrit *BCR-ABL* et suivi de la maladie résiduelle au cours de la LMC

3

Screening des patients suivis au niveau du service d'hématologie et de thérapie cellulaire de l'EHU Oran

Population d'étude





1. EXTRACTION DE L'ARN/ Conditions RNase free/ la glace

Automatique MAXWELL « Promega »

spectrophotomètre U.V:
DO260/DO280 : 1,8 -2**2. RT-PCR /Conditions RNase free/ la glace**EAC (Europe Against Cancer (*Leukemia* (2003), 17,2318-2354)

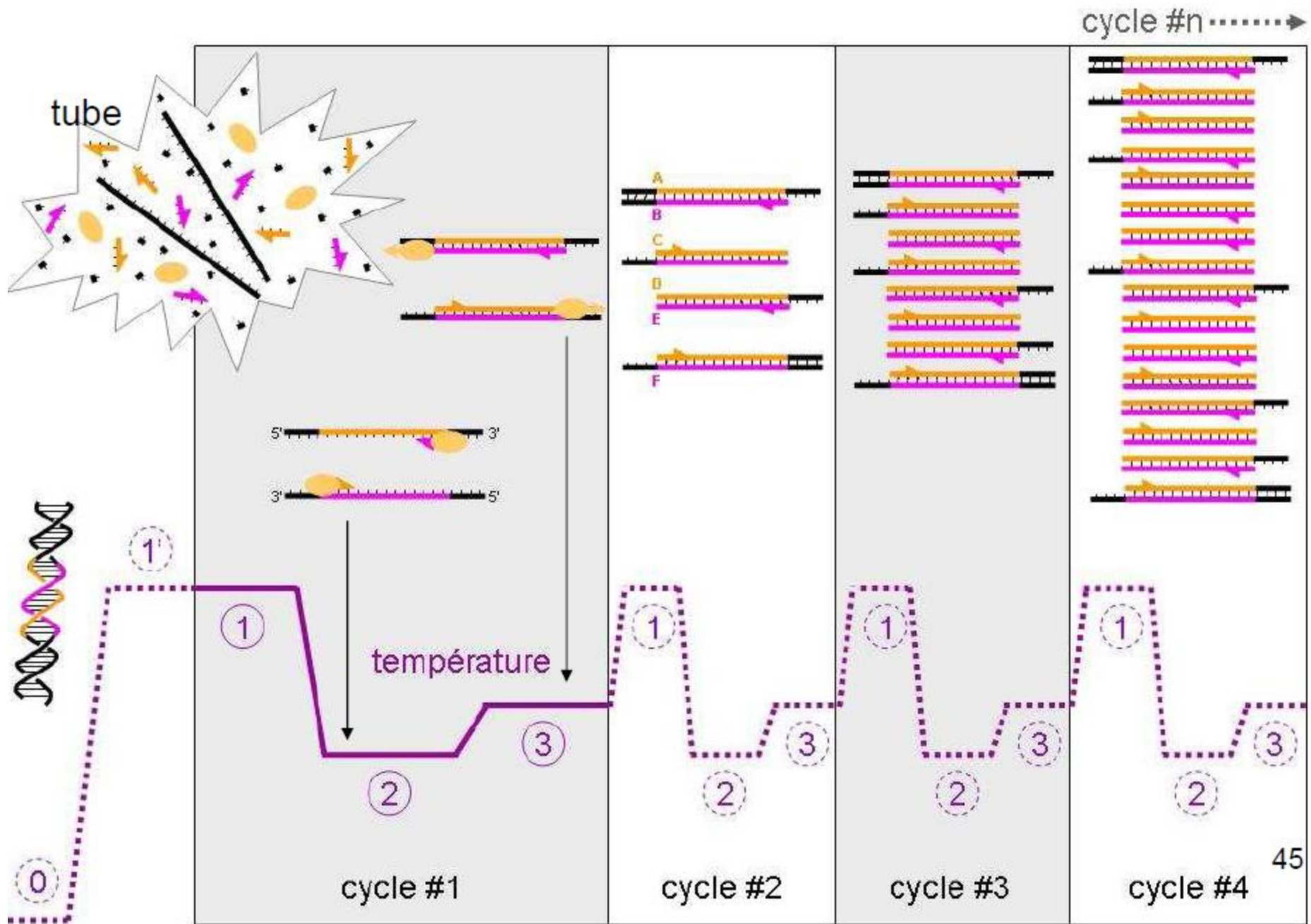
Rétro transcription

Ajustement de la [ARN] à 0.1ug/ul

Amplification par des amorces
spécifiques**3. Recherche qualitative sur gel d'Agarose**

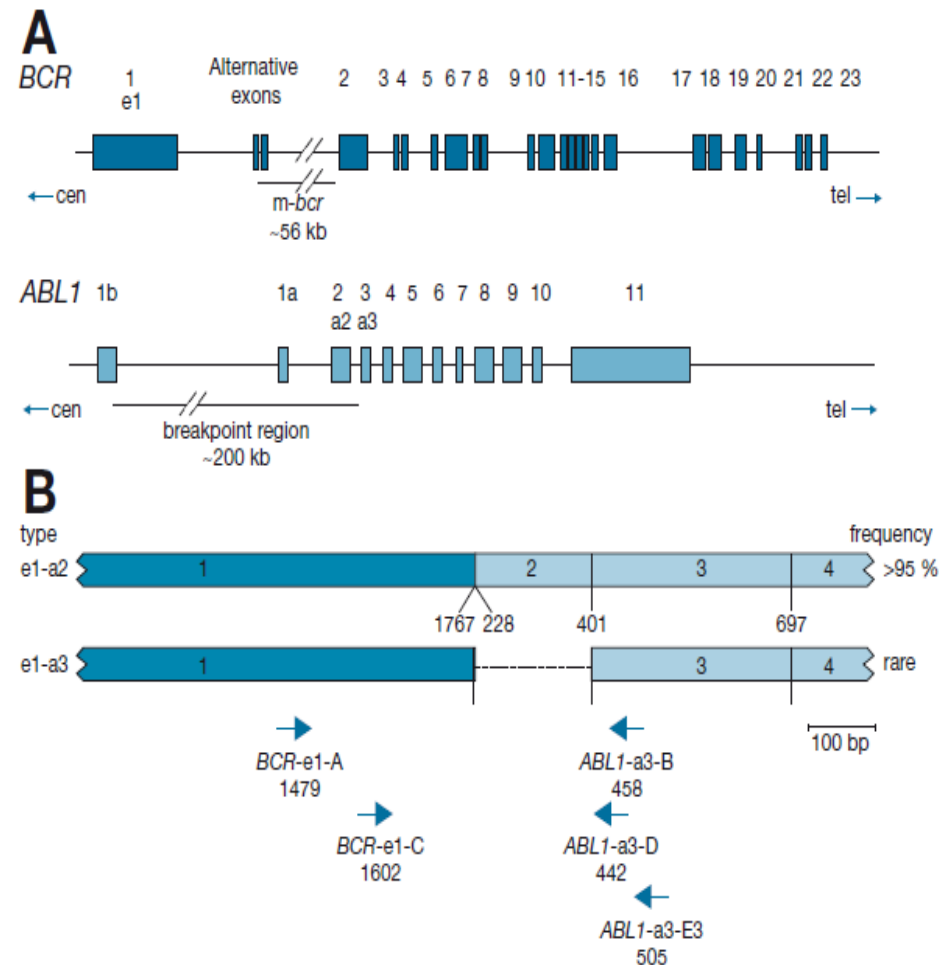
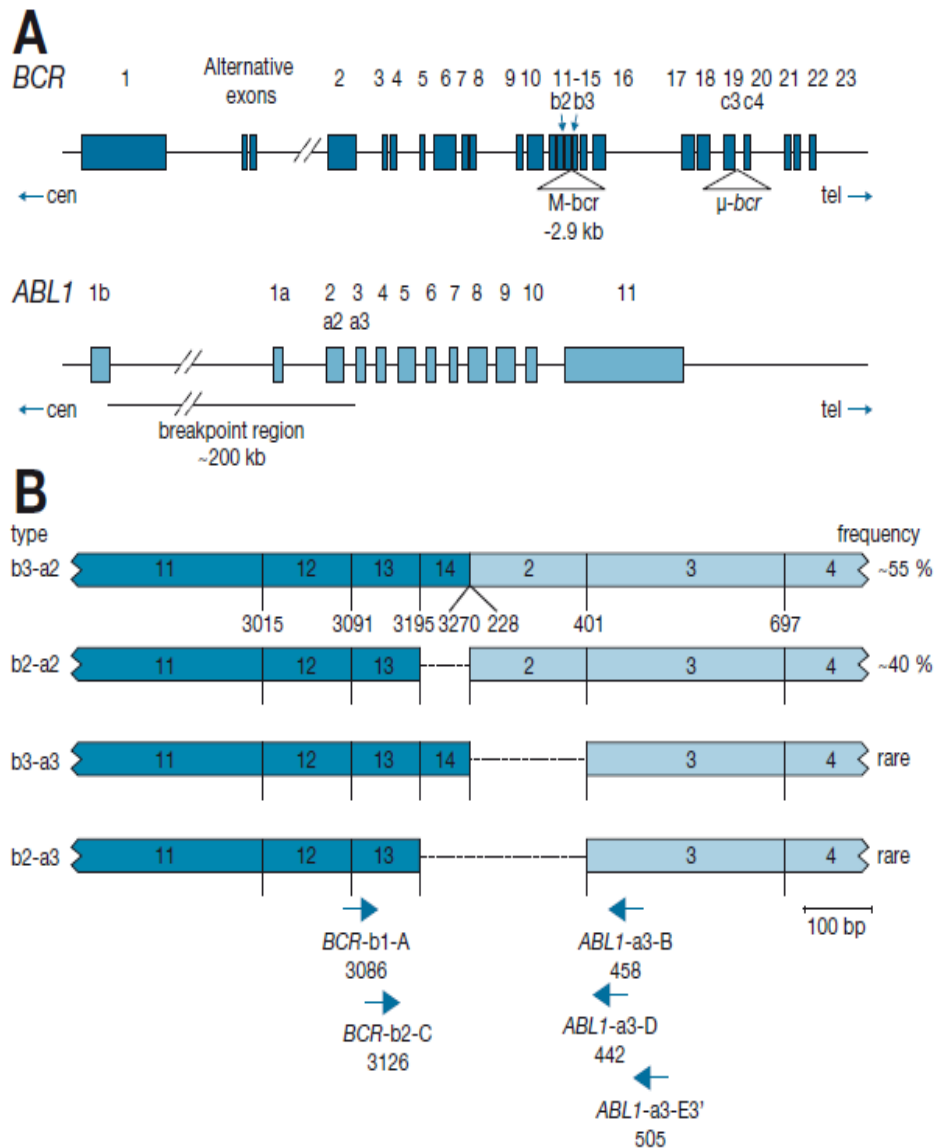
Kit Seeplex

Agarose 3%



Détection, typage

PRINCIPE PCR Multiplex



- ❑ **RT-PCR mutiplex** : Kit Seeplex® Leukemia BCR/ABL (SEEGENE).
- ❑ Technologie de double amorçage **DPO™** (Dual Priming Oligonucleotide)
- ❑ Huit types de transcrits : **Mb2a2, Mb3a2**, m e1a2 et les autres variant, b1a1, b3a3, b2a3, e1a3 et **c3a2 (e19a2)**.

Réactif + échantillon	Pour 1 tube
5XPM	4 µL
8MOP	3 µL
MMIX	10 µL
ADNc	3 µL
Volume final	20 ul

Phase 1 : 15 min à 94°C

Phase 2 : 30 Sec à 94 °C

Phase3 : 1 min 30 à 60 °C

Phase4 : 1 min 30 à 72 °C

•

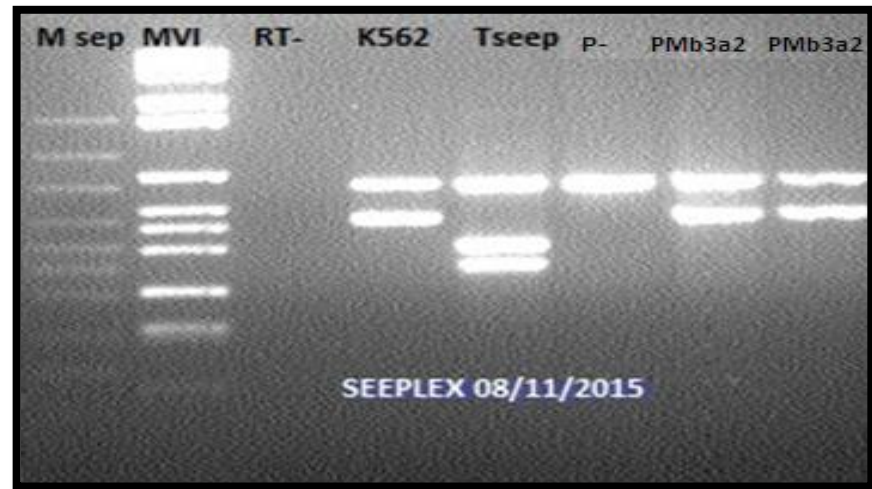
37 Cycles

Phase5 : 10 min à 72°C

Maintien T° à 8°C

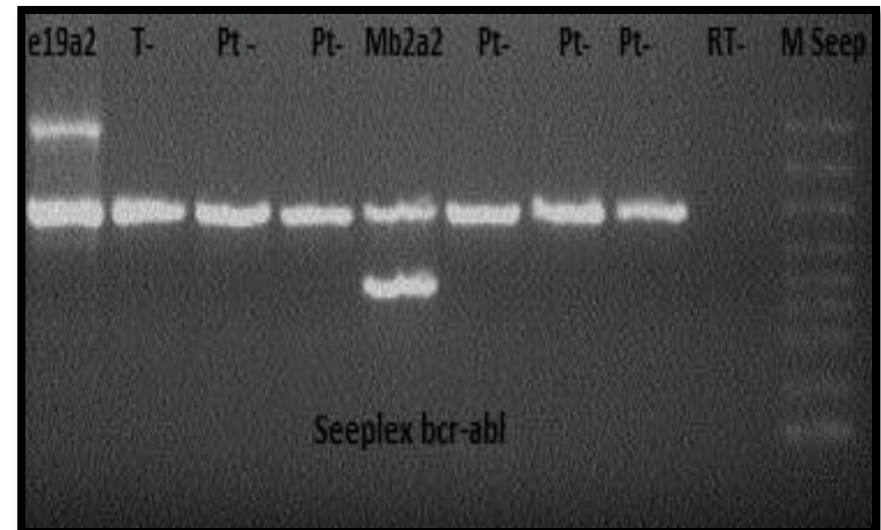
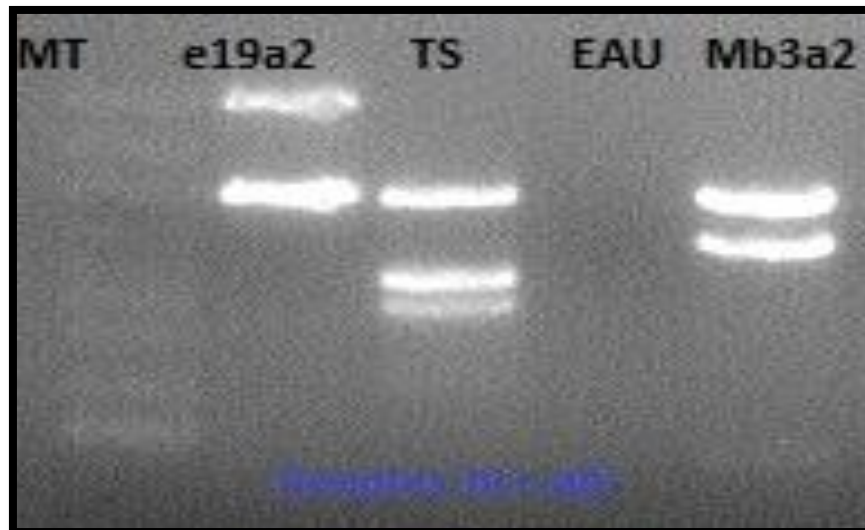
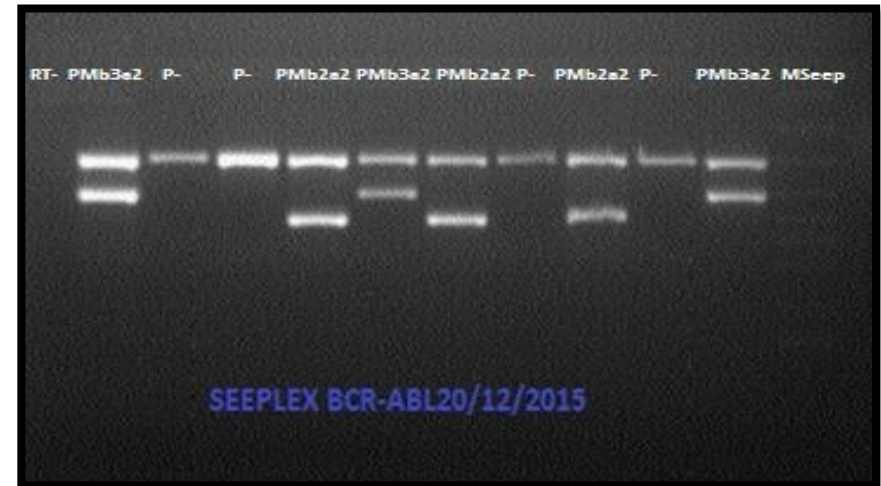
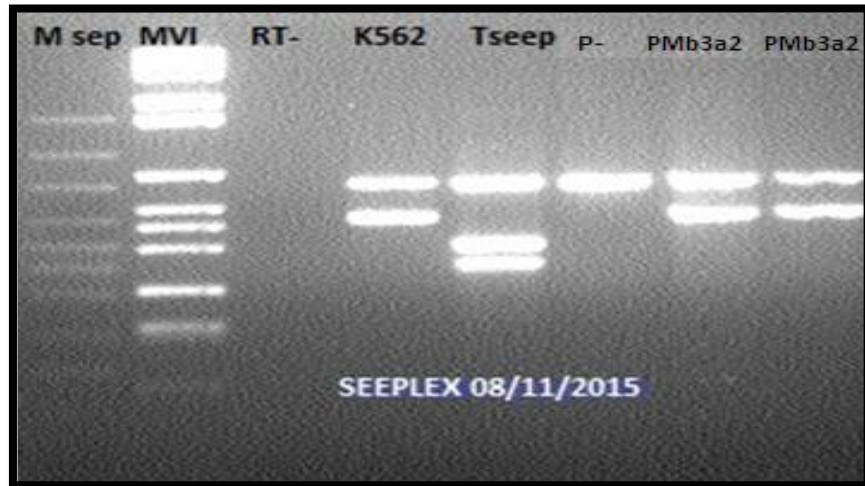
Séparation par électrophorèse de fragments d'ADN selon leur taille et leur charge électrique

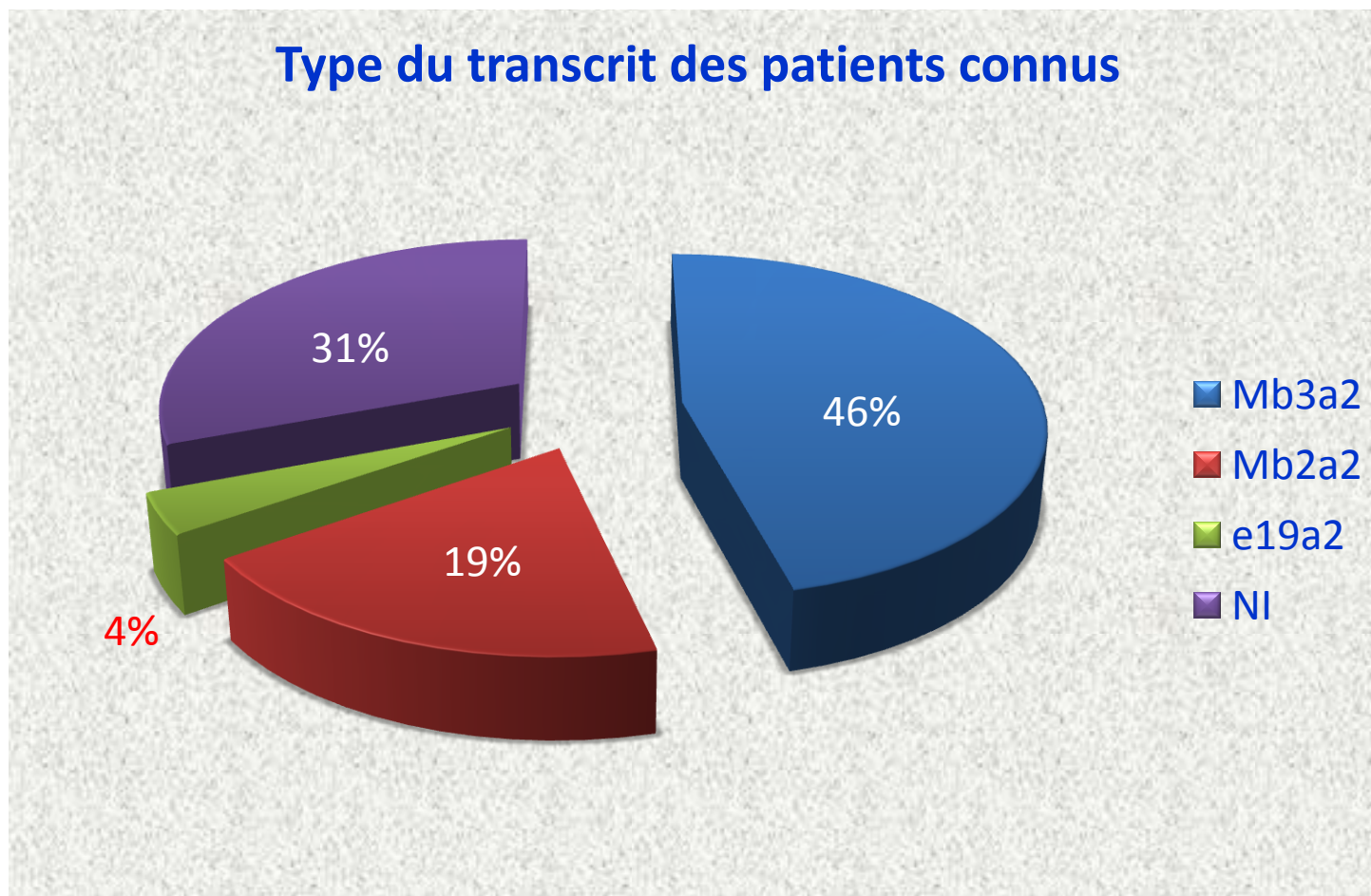
Cible	taille
Gene contrôle	600
C3a2(micro)	1012
B1a1	754
B3a2(Major)	476
B2a2(Major)	401
E1a2 (minor)	348
B3a3	299
B2a3	224
E1a3	174



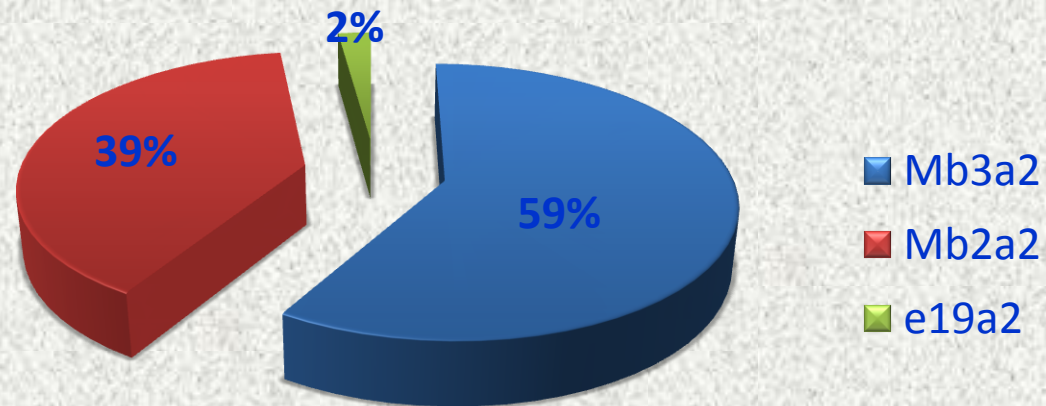
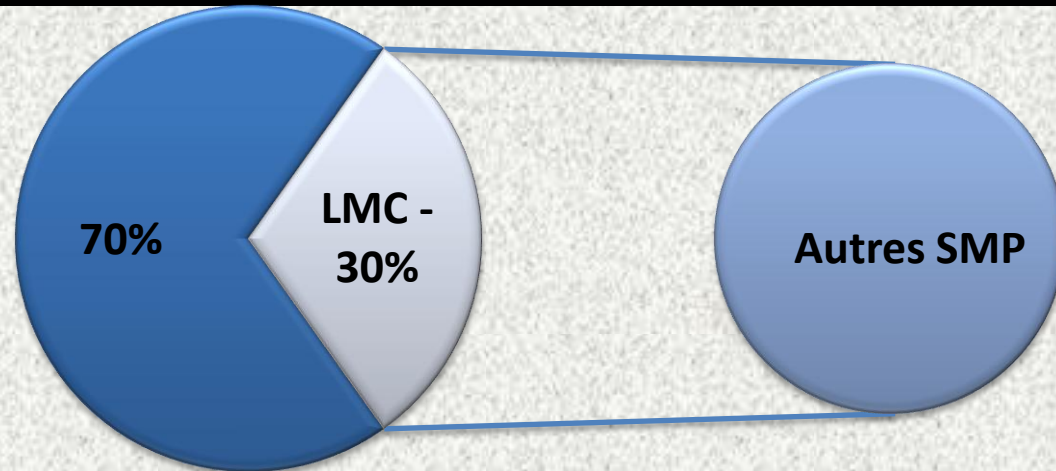
*Photo d'un gel PCR du Kit Seeplex "Seegene"
Service Biochimie/EHUOran*

Résultats & Discussion

Photos des gels Seeplex/Service biochimie/EHU Oran



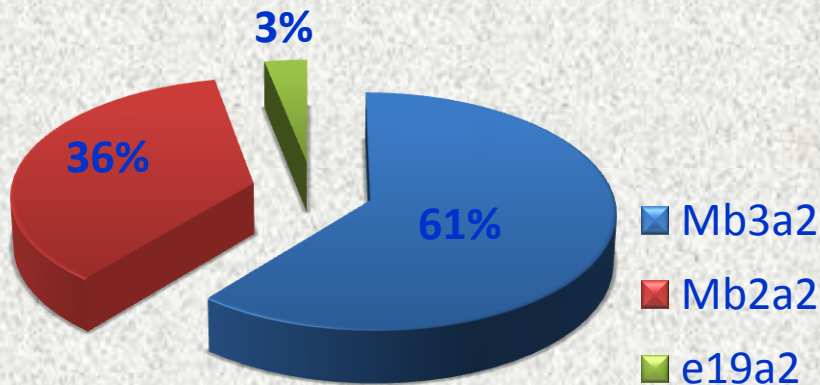
■ LMC + ■ LMC-



RÉSULTATS ET DISCUSSION

Type des Transcrits

Type du transcrit



Countries	b2a2 (%)	b3a2 (%)
Present study	46.7	51.1
India [19]	41.25	56.25
Tunisia [24] *	36.36	63.63
Korea [20]	32.34	67.66
Japan [21]	30.20	67.5
USA [15]	30.2	67.9
Thailand [22]	31	61
Austria [27]	31.6	68.4
Serbia [29]	25	73.5
Iran [23]	21	62
Sudan [7]	53.5	41.9
Germany [12]	38	36
Ecuador [6]	94.6	5.4
USA [30]	48	35
Argentina [31]	41.7	37.5

Incidence of b2a2 and b3a2 transcripts in Eastern, African, European and Western countries ³

NACHI M; CMH Alger, Sheraton, Alger

22

3. Walid Al-Achkar, et al . Correlation of p210 BCR-ABL transcript variants with clinical, parameters and disease outcome in 45 chronic myeloid leukemia patients. JBUON 2016; 21(2): 444-449

* Bennour A, Ouahchi I, Achour B et al. Analysis of the clinico-hematological relevance of the breakpoint location within M-BCR in chronic myeloid leukemia. Med Oncol 2013;30:348-354.

CONCLUSION

- La technique été implantée avec succès à l'EHU.ORAN. Elle nous a permis d'une part de confirmer le diagnostic de LMC et d'autre part, avec nos résultats préliminaires , de confirmer les données de la littérature, en montrant un taux élevé de transcrit Majeur (97%) avec un transcrit Mb3a2 plus élevé (61%) que celui de type Mb2a2 (36%).
- Par ailleurs, cette technique, nous a permis de mettre en évidence des transcrits plus rares (dans notre série deux cas (3%) de e19a2 ont été répertoriés).
- Cependant, devant une absence de détection des transcrits BCR-ABL1 chez un patient présentant une LMC« cytologique », il est indispensable de confirmer l'absence de fusion par FISH.

CONCLUSION

- Il faudra rendre systématique au diagnostic, la recherche qualitative des transcrits *bcr-abl1* par RT-PCR multiplex.
- Cette offre diagnostic de type multiplex permet non seulement de typer les transcrits fréquents mais aussi d'avoir des données suffisamment informatives pour les transcrits variant permettant donc de bien choisir les amorces spécifiques pour le suivi ultérieur de la réponse moléculaire sous traitements.



NACHI M; CMH Alger, Sheraton, Alger