

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



Université Mohamed Khider - Biskra -

Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Magister en Biologie

Option : Biologie appliquée

Thème

**Etude de l'association entre les polymorphismes génétiques
C677T du méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) et risque
de leucémie myéloïde chronique : à propos de cas cliniques d'une
population Algérienne**



Présenté par : MOHAMMEDI Kenza

Membres du jury

Président	BELHAMRA Mohamed	Prof. Université de Biskra
Examineurs	SATTA Dalila	Prof. Université de Constantine
	LAIADI Ziane	M.C. Université de Biskra
Rapporteur	BOURAS Mourad	M.C. Université de Batna

Année universitaire : 2014/2015

Remerciements

A Monsieur le Docteur BOURAS Mourad

Notre encadreur, pour l'orientation, la confiance, la patience qui ont constitués un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port. Qu'il trouve dans ce travail un hommage vivant à sa haute personnalité.

A Monsieur Le Professeur BELHAMRA Mohamed

Nous vous remercions sincèrement de l'honneur que vous nous faites en acceptant de présider ce jury. Nous vous assurons de notre respectueuse reconnaissance.

A Madame Le Professeur SATTA Dalila

Nous vous sommes extrêmement reconnaissant de l'intérêt et du temps que vous avez bien voulu consacrer à juger notre travail. Soyez assuré de notre gratitude et de notre profond respect.

A Monsieur le Docteur LAIADI Ziane

Qui nous fait l'honneur de participer à ce jury. Nous sommes heureuses de vous compter parmi notre jury et vous exprimons notre profonde gratitude.

A Monsieur le Docteur BOUSSOUAR Fayçal de l'Université de Grenoble

Nous avons eu le plaisir de travailler avec vous. Nous vous remercions infiniment pour votre précieuse collaboration et votre disponibilité. Ce mémoire est pour nous l'occasion de vous assurer de notre profonde reconnaissance et de notre amitié sincère.

A Madame Le Professeur SAIDI Mahdia, chef service d'hématologie, CHU BENFLIS Touhami, BATNA,

Nous vous remercions pour votre collaboration ainsi que pour la disponibilité et des échantillons.

A Madame le Docteur CHAIRA Safa

Pour son aide précieuse dans la collection des échantillons.

A Monsieur DEBACHE Karim et Mme FAROUDJ Sana

Pour leurs générosités scientifiques. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma profonde reconnaissance et mon profond respect.

A Monsieur Moussi Abdelhamid, chef de département des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Mohamed Khider -Biskra-, ainsi que tous Le personnel du laboratoire de biologie, en particulière Bengueraichi Fatima, pour leurs innombrables services durant la réalisation de la partie expérimentale.

A Ma promotion de magistère pour leur sympathie et convivialité.

A Mes parents, pour leur soutien durant mes longues études et pour leur patience dans ma vie quotidienne d'étudiante.

A Mes frères, mes sœurs, mon oncle Fayçal et mes tantes qui m'ont soutenues pendant toutes les étapes de ma vie.

A Toutes mes amies et tous ceux qui m'ont soutenues et que je n'ai pas cités parce qu'une page ne suffirait pas.

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

I. Partie bibliographique

I.1. Leucémie myéloïde chronique	3
I.1.1. Cancer	3
I.1.2. Leucémie	3
I.1.3. Leucémie myéloïde chronique	4
I.1.3.1. Définition.....	4
I.1.3.2. Épidémiologie	5
I.1.3.3. Étiologie.....	5
I.1.3.4. Évolution et symptomatologie.....	5
I.1.3.5. Biologie moléculaire.....	6
I.1.3.6. Voies de signalisations impliquées dans LMC	11
I.1.3.7. Diagnostic	14
I.1.3.8. Traitement	16
I.2. Folate et homocystéine	18
I.2.1. Folate	18
I.2.1.1. Définition et structure	18
I.2.1.2. Apport et besoin	18
I.2.1.3. Dérivés et formes actives	19
I.2.1.4. Fonctions biologiques	19
I.2.1.5. Conséquences du déficit en folates	20
I.2.2. Homocystéine (Hcy)	21
I.2.2.1. Définition	21
I.2.2.2. Métabolisme de l'Hcys	21
I.3. Mthfr et polymorphisme génétique C677T	23
I.3.1. Gène Mthfr	23
I.3.2. Protéine MTHFR	26
I.3.3. Polymorphismes du gène Mthfr	28
I.3.4. Polymorphisme C677T	28
I.3.4.1. Définition et fréquence	28

I.3.4.2. Cartographie et implication de la mutation C677T	29
I.3.4.3. Effets métaboliques	31

II. Partie expérimentale

II.1. Patients et témoins	32
II.2. Méthodes	32
II.2.1. Prélèvements sanguins	32
II.2.2. Hémolyse du sang	32
II.2.3. Recherche des transcrits du gène chimère bcr-abl	33
II.2.3.1. Extraction des ARN totaux au TRIzol	33
II.2.3.2. Détermination de la pureté et de la concentration d'ARN	34
II.2.3.3. RT-PCR	35
II.2.4. Recherche de la mutation C677T du gène Mthfr	38
II.2.4.1. Extraction de l'ADN	39
II.2.4.2. Détermination de la pureté et de la concentration d'ADN	40
II.2.4.3. PCR-RFLP	41
II.3. Résultats	44
II.3.1. Caractéristiques de la population étudiée	44
II.3.2. Résultats de la technique RT-PCR	44
II.3.3. Résultats obtenus après une PCR-RFLP	46
II.4. Discussion	50
II.4.1. Discussion analytique	50
II.4.1.1. Prélèvement	50
II.4.1.2. Hémolyse et extraction des acides nucléiques	50
II.4.1.3. Optimisation des techniques d'analyses	51
II.4.1.3.1. RT-PCR	52
II.4.1.3.2. PCR- RFLP	52
II.4.2. Discussion des résultats	55
II.4.2.1. RT-PCR	55
II.4.2.2. PCR- RFLP	56

Conclusion et perspectives

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

5-MTHF	5-MéthylTétraHydroFolate
5,10-MTHF	5,10-MéthylèneTetraHydroFolate
Abl	Le gène Abelson
ABL	La protéine Abelson
Bcr	Le gène <u>b</u> reakpoint <u>c</u> luster <u>r</u> egion
BCR	La protéine Breakpoint Cluster Region
BET	Bromure d’Ethidium
Chromosome Ph	Chromosome Philadelphie
CRKL	CRK-oncogene-like protein
DHF	DiHydroFolate
dNTP	désoxyriboNucléotides TriPhosphates
DO	Densité Optique
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
Grb2	Growth factor <u>r</u> eceptor- <u>b</u> ound protein-2
H4PteGlu	Tétra-Ptéroyl-Glutamate
Hcy	Homocystéine
JaK	Janus Kinase
LAL	Leucémie Aiguë Lymphoblastique
LINE-1	Long-Interspersed Nuclear Element-1
LLC	Leucémie Lymphoïde Chronique
LMA	Leucémie Myéloïde Aiguë
LMC	Leucémie Myéloïde Chronique
M-bcr	Major <u>b</u> reakpoint <u>c</u> luster <u>r</u> egion
m-bcr	<u>m</u> inor <u>b</u> reakpoint <u>c</u> luster <u>r</u> egion
Met	Méthionine
MLL	Leucémie de Lignée Mixte
Mthfr	Le gène de la Méthylène <u>t</u> étra <u>h</u> ydro <u>f</u> olate <u>r</u> éductase
MTHFR	La protéine MéthylèneTétraHydrofolate Réductase
Myc	Myelocytomatosis viral oncogene homolog
NADPH	Nicotinamide Adénosine Dinucléotide PHosphate
NFκB	Nuclear Factor <u>κ</u> -B
PCR	Polymerase Chain Reaction

PI-3 K	PhosphoInositide-3 Kinases
Ras	<i>Rat sarcoma</i> viral oncogene homolog
RNase	RiboNucléase
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
SAM	S-AdénosylMéthionine
SH	Src Homology
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
RT 5X	Tampon pour la Réverse Transcriptase, concentré 5 fois
TAE 1X	Tampon Tris, Acétate, EDTA, concentré une fois
THF	TétraHydroFolate
UTR	UnTranslated Region
μ-bcr	Micro breakpoint cluster region

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1.	Compartiments de l'hématopoïèse et de la leucémie myéloïde.	4
2.	Translocation t(9 ; 22)-(q34.1 ; q11.2) et les différents transcrits du gène chimère Bcr-Abl dans la LMC.	7
3.	Structure moléculaire de BCR et ABL.	10
4.	Différentes voies de signalisation participant à la leucémogénèse induite par BCR-ABL.	13
5.	Caryotype au moment de l'apparition initiale de la LMC.	15
6.	Une FISH montrant un spot de fusion localisé sur le chromosome 22q.	16
7.	Mode d'action des Inhibiteurs de la Tyrosine Kinase (ITK).	17
8.	Structure et dérivés de l'acide folique.	19
9.	Métabolisme des folates.	20
10.	Métabolisme intracellulaire de l'homocystéine.	22
11.	Gène, protéine et polymorphismes du gène Mthfr.	25
12.	Différents transcrits du gène Mthfr.	26
13.	Réactions catalysées par la MTHFR.	26
14.	Structure moléculaire de la MTHFR.	30
15.	Trois génotypes de la MTHFR affectant la méthylation et la synthèse de l'ADN à différentes mesures.	31
16.	Illustration schématique des étapes de la RT-PCR.	35
17.	Stratégie expérimentale illustrant l'étude du profil RFLP pour la mutation C677T du gène Mthfr.	39
18.	Site de restriction de l'enzyme <i>Hinf</i> I et les fragments obtenus après la digestion.	43
19.	Photographie du profil électrophorétique présentant les différents transcrits du gène chimère Bcr-Abl.	44
20.	Répartition des transcrits du gène chimère Bcr-Abl chez la population LMC.	45
21.	Photographie du profil électrophorétique de la séquence du gène Mthfr amplifiée par PCR sur gel d'agarose à 1,5 %.	46
22.	Photographie du profil RFLP obtenu chez les populations témoin et	47

	malade	
23.	Répartition des fréquences génotypiques du Mthfr chez les populations témoin et LMC.	49
24.	Répartition des fréquences alléliques du Mthfr chez les populations témoin et LMC.	49
25.	Photographie d'un exemple de profil électrophorétique montrant l'intégrité des ARNtotaux étudiés.	51
26.	Photographie d'un exemple de profil électrophorétique montrant l'intégrité des ADN de certains patients étudiés.	51
27.	Photographie du profil électrophoretique présentant le choix adéquat de la température d'hybridation pour les amorces de la séquence du gène Mthfr.	54
28.	Photographie du profil RFLP obtenu sur gel d'agarose à 3 % suivie d'une coloration au BET et visualisation sous U.V.	54

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
I.	Ensemble d'informations relatives à l'identification du gène Mthfr.	24
II.	Amorces sens et antisens choisies et les longueurs des fragments obtenus pour le gène chimère Bcr-Abl.	37
III.	Programme d'amplification par PCR des fragments d'ADNc obtenus.	37
IV.	Amorce sens et antisens choisies et la longueur du fragment obtenu pour le gène Mthfr.	41
V.	Programme d'amplification du fragment (198 pb) du gène Mthfr.	42
VI.	Sexe, effectifs et âge moyen des cas analysés.	44
VII.	Distribution des transcrits du gène chimère Bcr-Abl chez la population LMC.	45
VIII.	Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme C677T.	48

Introduction

Introduction

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est un syndrome myéloprolifératif clonal caractérisée par l'accumulation des précurseurs myéloïdes dans la moelle osseuse, le sang et les tissus du corps. C'est une maladie relativement rare dans le monde, représentant environ 15 % de toutes les leucémies. Elle est caractérisée par une anomalie génétique acquise : le chromosome Philadelphie (Ph), résultant de la translocation réciproque t(9 ; 22)-(q34 ; q11.2), et son équivalent moléculaire, l'oncogène Bcr-Abl. La protéine BCR-ABL présente une activité tyrosine kinase constitutive qui agit sur les voies de survie et de prolifération. La progression de la maladie vers la phase accélérée puis blastique s'accompagne d'anomalies génétiques additionnelles, marqueurs d'instabilité génomique croissante.

Etant donné que les leucémies sont dérivées d'une prolifération rapide de tissus, qui ont la plus grande exigence pour la synthèse d'ADN, il a été considéré qu'elles sont susceptibles d'être affectées par le devenir métabolique de l'acide folique de ce fait. Le métabolisme du folate joue un rôle essentiel dans la synthèse de l'ADN et les processus de méthylation, de sorte que tout changement dans son flux peut entraîner une instabilité génomique. Le métabolisme des folates nécessite l'activité optimale d'enzymes différentes. La MTHFR est l'une des enzymes importantes du cycle de folate et affecte, à la fois, la synthèse des nucléotides et les réactions de méthylation.

Au cours des dernières années, un intérêt considérable s'est développé dans l'interaction entre le folate et un polymorphisme particulier d'un seul nucléotide, le variant C677T du gène Mthfr. Des expériences *in vitro* ont montré que le génotype homozygote TT ne conserve que 30 % de l'activité normale de la MTHFR, tandis que le génotype hétérozygote CT conserve environ 60 % de cette activité. Cette diminution d'activité conduit à une hypométhylation globale de l'ADN, et cette dernière, au niveau du promoteur de l'élément transposable LINE-1, est fréquemment associée à la progression de la LMC.

L'objectif de cette étude est d'optimiser et valider des techniques de diagnostic par la biologie moléculaire, qui sont simples, fiables et reproductibles, particulièrement la RT-PCR et la PCR-RFLP, afin de détecter aussi bien pour les différents transcrits du gène chimère Bcr-Abl que de la mutation C677T du gène Mthfr, en comparant les profils RFLP des échantillons pathologiques et normaux après digestion par l'enzyme de restriction *Hinf*I.

L'intérêt que représente cette recherche, pour cette pathologie, est d'améliorer le diagnostic précoce dans la détection de la maladie par la mise au point de biomarqueurs génétiques, et en fonction de ça, on peut optimiser le traitement adéquat aux patients atteints de la LMC. Une

Introduction

continuité de cette thématique pourrait mettre en évidence une corrélation effective entre le variant C677T du gène Mthfr et la LMC, ainsi un élargissement sur la recherche de nouveaux marqueurs supplémentaires susceptibles de mieux cerner cette pathologie est envisageable.

Partie
bibliographique

I.1. Leucémie myéloïde chronique

I.1.1. Cancer

Le cancer est une maladie résultant d'altérations de l'ADN cellulaire. Les cellules atteintes par ces altérations (cellules malignes) ne suivent plus le processus normal de mort cellulaire programmée, l'apoptose, et deviennent immortelles. Elles se nourrissent par formation de nouveaux vaisseaux sanguins ; on appelle ce processus l'angiogenèse. Ces cellules ont la capacité d'envahir et de coloniser les tissus environnants. Le développement d'un cancer est le résultat d'une combinaison entre, d'une part, l'activation de la prolifération cellulaire et, d'autre part, l'inhibition de signaux restreignant le potentiel prolifératif des cellules ; différents agents conduisent au développement d'un cancer. Classiquement, on distingue les agents initiateurs et les agents promoteurs. Les agents initiateurs sont des agents génotoxiques qui induisent une lésion définitive de l'ADN. Par contre, les agents promoteurs n'induisent pas de lésions de l'ADN mais favorisent l'expression d'une lésion, préalablement induite par un agent initiateur (1).

I.1.2. Leucémie

Les leucémies, en tant que groupe, sont des cancers résultant de la lignée cellulaire hématopoïétique (2). Des translocations, des inversions, ou des délétions génétiques dans les cellules hématopoïétiques perturbent la fonction normale des gènes dans ces emplacements, en modifiant le développement des cellules du sang normal (3). En conséquence, les cellules leucémiques dysfonctionnelles ou non différenciées s'accumulent dans l'espace de la moelle osseuse et remplacent progressivement les cellules hématopoïétiques normales. Les leucémies peuvent être soit aiguës ou chroniques, et ils peuvent résulter de lignées cellulaires myéloïdes ou lymphoïdes, ou les deux, comme dans le cas de Leucémie myéloïde/lymphoïde ou Leucémie de Lignée Mixte (MLL). Les quatre principales formes de leucémie sont la Leucémie Aiguë Lymphoblastique (LAL), la Leucémie Myéloïde Aiguë (LMA), la Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) et la Leucémie Myéloïde Chronique (LMC) (2).

I. Partie Bibliographique

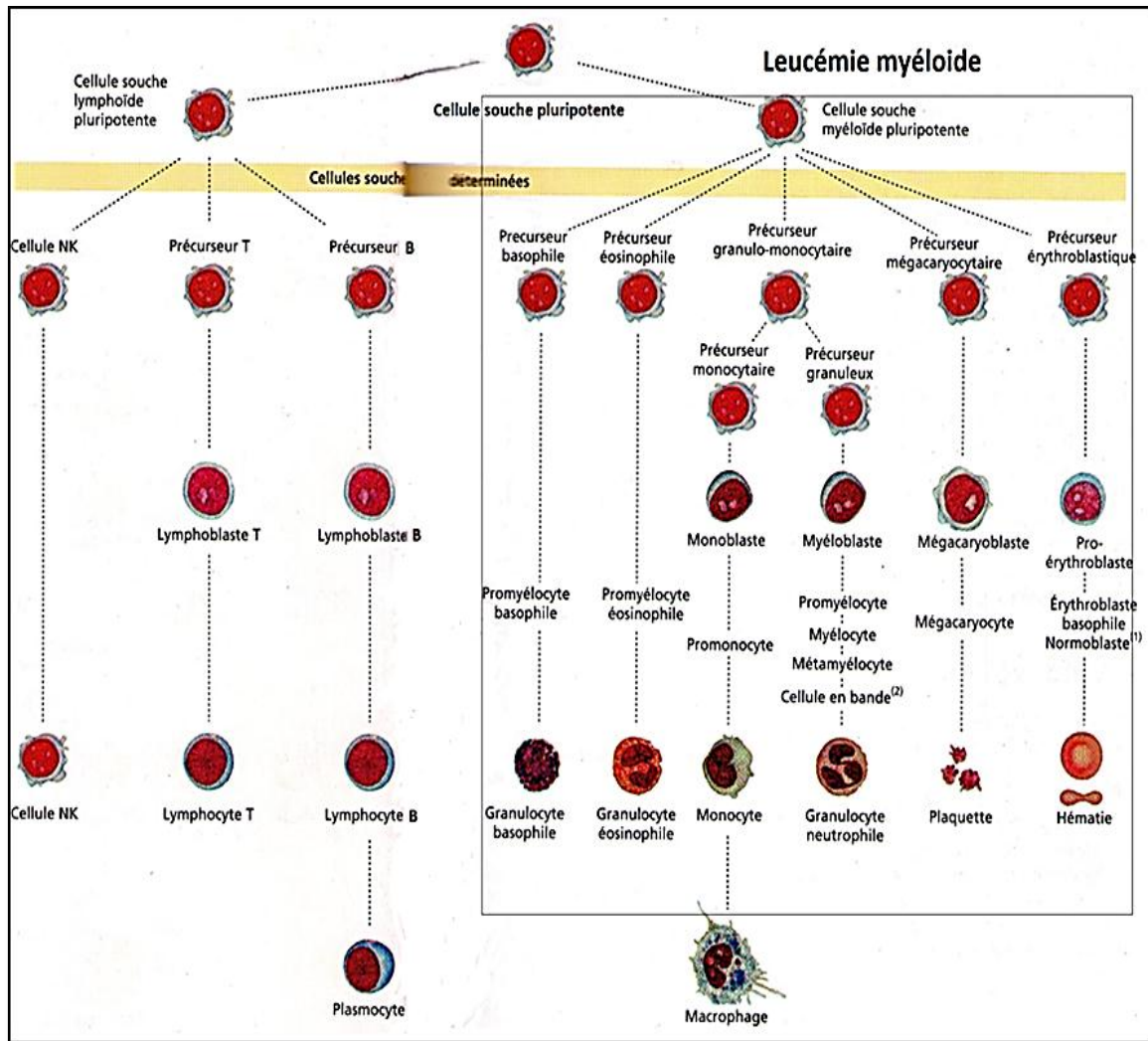


Figure 1. Compartiments de l'hématopoïèse et de la leucémie myéloïde (4).

I.1.3. Leucémie myéloïde chronique

I.1.3.1. Définition

La LMC est une maladie hématologique résultant de la transformation maligne de cellules souches hématopoïétiques et est caractérisée par la prolifération excessive des cellules myéloïdes (5). Le trait caractéristique de la LMC est la présence du chromosome Philadelphie (Ph) dans les cellules hématopoïétiques, qui est causée par la translocation réciproque de $t(9 ; 22)$ (5, 6). Au niveau moléculaire, cet événement forme un gène hybride appelé Bcr-Abl (7), dont le rôle, dans le développement de la maladie, a été démontré *in vitro*, ainsi que dans plusieurs modèles animaux (8).

I.1.3.2. Épidémiologie

La LMC est un syndrome myéloprolifératif rare représentant 2 à 5 % des leucémies de l'enfant (9) et 15 % des leucémies de l'adulte, avec environ dix nouveaux cas par an pour un million d'habitants (10). Cette affection touche préférentiellement les hommes (9).

L'incidence de la LMC en Algérie en 2004 est de 130 cas, avec un taux d'incidence annuel en progression puisqu'il passe de 0,19/100.000 habitants en 1994 à 0,4/100.000 habitants en 2004 (10).

L'âge moyen au diagnostic est de 44 ans, ce qui fait de la LMC une affection de l'adulte jeune. Mais, elle peut se voir dans toutes les tranches d'âge (10). L'absence de registre national rend cependant l'évaluation de son incidence approximative.

I.1.3.3. Étiologie

Aucun facteur génétique, familial, géographique, ethnique ou économique n'est fortement associé avec l'occurrence de la LMC (11). Cependant, l'exposition à des radiations ionisantes et l'exposition prolongée au benzène pourraient jouer un rôle favorisant (12).

I.1.3.4. Évolution et symptomatologie

L'histoire naturelle de la LMC comprend trois phases évolutives : une première phase dite «chronique», paucisymptomatique, suivie d'une deuxième phase, caractérisée par une accélération de la maladie, et enfin une troisième phase, appelée « transformation aiguë », prenant l'aspect d'une leucémie aiguë secondaire, résistante ou réfractaire au traitement, conduisant au décès du patient (9).

- Phase chronique

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

- une altération de l'état général, liée à l'hypermétabolisme, associant asthénie, amaigrissement et, plus rarement, une fébricule et des sueurs ;
- un syndrome tumoral, largement caractérisé par une splénomégalie (50 %), parfois responsable d'une symptomatologie digestive ;

I. Partie Bibliographique

- des signes de leucostase, avec en particulier un priapisme, sont aujourd'hui assez exceptionnels (9).

- Phase d'accélération

Elle correspond à la transition entre la phase chronique et la phase blastique. Sa durée est de 12 à 18 mois en moyenne. Elle peut, cependant, être quasi inexistante, la phase blastique étant alors « explosive » (environ 20 % des cas) (9). Elle peut être insidieuse ou présente une aggravation de l'anémie, une splénomégalie et une infiltration d'organes (13).

- Phase blastique

Elle survient avec un délai médian de 4 ans et se définit par la présence de plus de 20 % de blastes médullaires ou plus de 30 % de blastes et promyélocytes sanguins ou médullaires. Elle s'accompagne en général d'une majoration des signes cliniques d'accélération (altération de l'état général, splénomégalie, anémie, thrombopénie, fibrose médullaire) et parfois d'une symptomatologie propre : fièvre, hépatomégalie, adénopathies et douleurs osseuses. Comme toute leucémie aiguë, elle est possiblement accompagnée d'un syndrome tumoral et de signes d'insuffisance médullaire. Des localisations blastiques extramédullaires peuvent également se voir, notamment une atteinte méningée ou des chloromes des tissus mous (9).

I.1.3.5. Biologie moléculaire

I.1.3.5.1. Chromosome de Philadelphie (Ph)

Le chromosome Ph est un chromosome 22 raccourci résultant d'une translocation réciproque $t(9 ; 22)-(q34 ; q11.2)$, entre les bras longs des chromosomes 9 et 22 (Fig. 2) (14). C'est une caractéristique de la LMC et se trouve dans jusqu'à 95 % de patients (15), 5 % ont des translocations variantes qui peuvent être simples (impliquant le chromosome 22 et un chromosome autre qu'un chromosome 9) ou complexes (comportant un ou plusieurs chromosomes, en plus des chromosomes 9 et 22). Les patients avec des variantes de Ph ont une réponse au traitement et un pronostic similaire à LMC Ph positif (13).

Les mécanismes donnant naissance à la translocation $t(9 ; 22)-(q34 ; q11.2)$ sont peu connus, ils pourraient être facilités par une grande proximité entre les chromosomes 9 et 22 dans les cellules en interphase (16) ou par une réparation aberrante de cassure double brin (Double Strand Break (DSB)) (17).

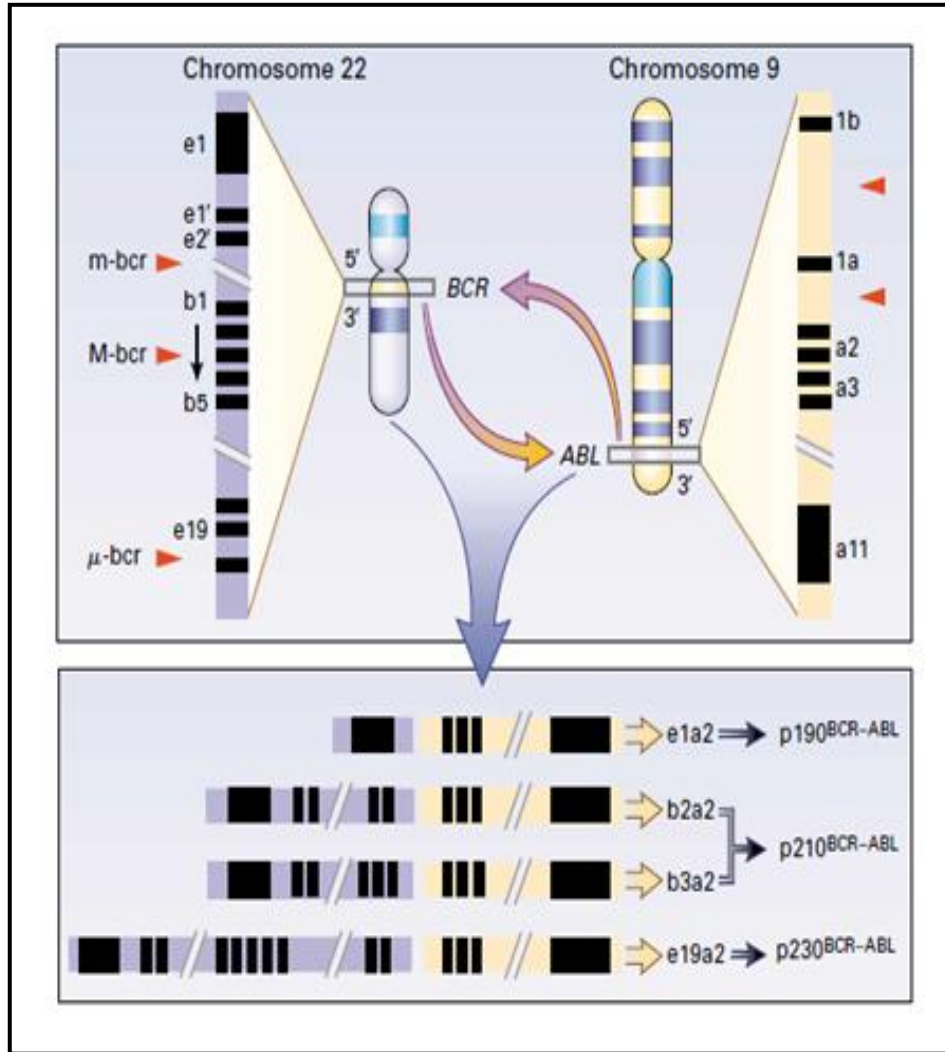


Figure 2. Translocation t(9 ; 22)-(q34.1 ; q11.2) et les différents transcrits du gène chimère Bcr-Abl dans la LMC (15).

I.1.3.5.2. Gène chimère Bcr-Abl

- Gène Bcr

Le gène Breakpoint cluster region (Bcr), positionné sur le bras long du chromosome 22, a été découvert en clonant la région appelée Major-breakpoint cluster region (M-bcr) où ont lieu la majorité des points de cassure dans la LMC. Il s'étend sur 135 kb, comprend 23 exons (9). Trois zones de cassures ont été identifiées au sein du gène Bcr : M-bcr dans la LMC, m-bcr dans la LAL à chromosome Ph et μ -bcr dans les LMC à polynucléaires neutrophiles (Fig. 2) (16).

I. Partie Bibliographique

- **Gène Abl**

L'oncogène Abl est l'homologue humain du gène v-Abl identifié chez le virus leucémogène d'Abelson. Le gène Abl comporte 11 exons et comprend un site alternatif d'initiation de la transcription entre les exons 1a et 1b (Fig. 2) (16).

- **Gène Bcr-Abl**

Les remaniements entre les gènes Bcr (chromosome 22) et Abl (chromosome 9) ont pour conséquence la formation du gène chimérique Bcr-Abl sur le chromosome 22q- (chromosome Ph) et du gène réciproque Abl-Bcr sur le chromosome 9q+ (Fig. 2) (16).

Les transcrits de fusion Bcr-Abl peuvent varier en fonction du site de point de cassure dans le gène Bcr. La majorité des patients atteints de LMC ont des cassures dans la région (M-bcr) (18) soit l'exon 13 (ou b2) soit l'exon 14 (ou b3) (16), qui fusionnent à l'exon 2 du gène Abl résultant les transcrits b2a2 et b3a2 qui codent pour une protéine de 210 kDa. Une deuxième région de cassure mineure (m-bcr) entre les exons alternatifs 1 et 2 du gène Bcr entraînant le transcrit e1a2 codant pour une protéine de 190 kDa, principalement associée à la LAL et est également détectée dans certains cas de LMC. Très rarement, les patients atteints de LMC présentent également une protéine BCR-ABL de 230 kDa résultant de la fusion entre l'exon 19 du gène Bcr (région de μ -bcr) et l'exon 2 du gène Abl (Fig. 2) (18).

Bien qu'il ait été initialement estimé que les transcrits Bcr-Abl sont spécifiques de la leucémie, de manière surprenante, d'autres études ont suggéré que de petites quantités de ces transcrits peuvent être trouvés chez des individus normaux si des techniques de PCR très sensibles sont utilisées (19).

I.1.3.5.3. Protéine de fusion BCR-ABL

- **Protéine BCR**

Le gène Bcr permet la transcription de deux types d'ARN messagers dont les poids moléculaires sont respectivement de 4,5 et 6,7 kb et qui codent une protéine de 160 kDa, d'expression ubiquitaire. Cette protéine, de localisation cytoplasmique, lorsque la cellule n'est pas en cycle, est exprimée de manière périchromosomique lors de la mitose, ce qui suggère qu'elle joue un rôle dans le cycle cellulaire (Fig. 3) (20).

I. Partie Bibliographique

- Protéine ABL

Le gène Abl peut être transcrit en deux types d'ARNm (16) de tailles, respectivement, 6 et 7 kb. Deux variétés de protéines d'environ 145 kDa sont synthétisées en fonction du premier exon, 1a ou 1b (Fig. 3) (9). Ces protéines sont exprimées dans la plupart des cellules de l'organisme (16). La protéine contenant l'exon 1b est « myristoylée » (c'est-à-dire modifiée par un groupement lipide de type acide gras saturé sur un résidu glycine), ce qui entraîne sa localisation au niveau de la membrane plasmique. L'absence de ce résidu glycine dans la forme 1a (majoritaire) entraîne une localisation nucléaire prédominante (9).

La structure de la protéine cellulaire ABL est hautement conservée. Comme la plupart des protéines induisant un signal intracellulaire, la protéine ABL possède des domaines d'homologie SH (Src Homology) semblables à ceux de la protéine Src (Fig. 3) (9).

On peut remarquer que la protéine ABL est dotée d'une dualité structurale et fonctionnelle, avec des domaines de régulation qui lui permettent de jouer un rôle à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme de la cellule et de transiter entre les deux compartiments. Son action dépend de sa localisation nucléaire ou cytoplasmique (21). Dans le compartiment nucléaire, ABL joue un rôle de régulateur négatif du cycle cellulaire. Lors de la phase G₀, ABL se lie à l'ADN et forme un complexe avec des protéines inhibitrices du cycle telles que pRb (protéine du Rétinoblastome). Lors de la transition G₁/S, la protéine pRb est phosphorylée et se dissocie d'ABL, ce qui permet son activation. Quand elle est localisée dans le cytoplasme, la protéine ABL joue un rôle important dans la croissance et la prolifération cellulaire, participant à la transduction du signal initiée par certains récepteurs aux facteurs de croissance (9).

- Protéine BCR-ABL

La protéine BCR-ABL comprend l'essentiel d'ABL à l'exception de l'extrémité N-terminale, remplacée par la moitié N-terminale de la protéine partenaire BCR (16).

Ensembles, les protéines P210^{BCR-ABL} et P190^{BCR-ABL} ont une activité enzymatique tyrosine kinase activée constitutivement, avec des niveaux plus élevés d'activité dans la protéine p190. Fait intéressant, la plupart des tyrosines autophosphorylées se produisent dans le segment BCR de BCR-ABL (19). De plus, ce segment est à l'origine de dimères ou de tétramères BCR-ABL qui facilitent l'autophosphorylation de l'oncoprotéine et son activation (16). L'activité de la tyrosine kinase est attribuable au domaine de kinase trouvé dans le segment Abl de la protéine de fusion (Fig. 3) (19).

I. Partie Bibliographique

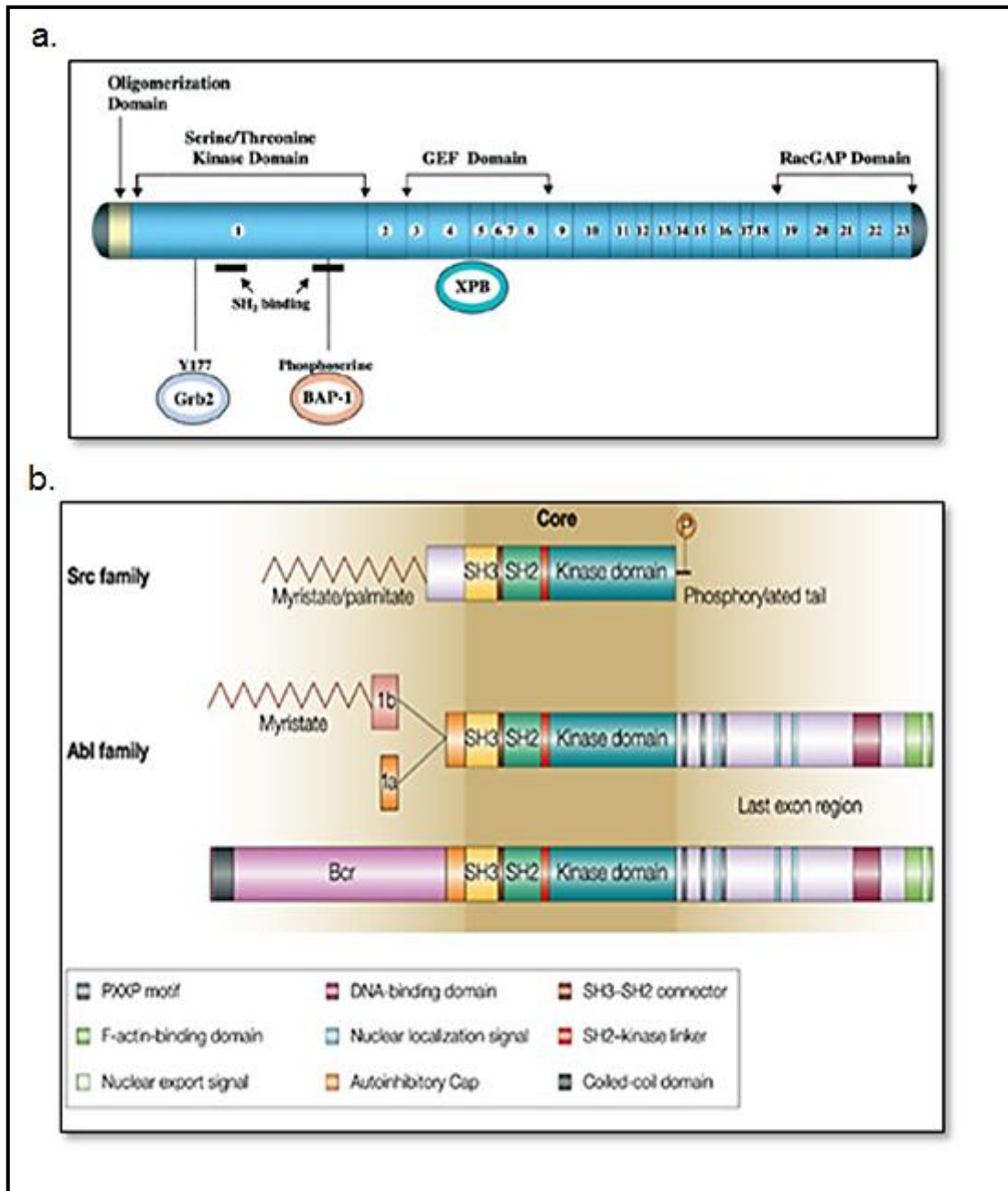


Figure 3. Structure moléculaire de BCR et ABL. **a.** Structure moléculaire de la protéine BCR. Dans le premier exon réside le domaine kinase, deux zones riches en sérine/thréonine contenant des domaines de liaison SH2 (Src Homology-2) et un domaine d'oligomérisation. La région centrale présente le domaine GEF (Guanine Exchange Factor). La partie C-terminale de BCR, absente dans la protéine de fusion BCR-ABL, a une fonction GAP (GTPase Activating Protein) pour les protéines G de type Rac. La protéine 14-3-3 (Bap-1 : BCR-associated protein-1) interagit également avec le site de liaison à SH2. Grb2 (Growth factor receptor-bound protein-2) associée avec un site de liaison à SH2 proximale supplémentaire contenant une phosphotyrosine à la position 177. Le domaine GEF interagit avec XPB (protéine de réparation d'ADN) (19). **b.** Superposition des structures des protéines Src, ABL, BCR-ABL. Le domaine SH1 (Domaine kinase) porte l'activité tyrosine kinase. Il comporte classiquement le site de fixation de l'ATP, le site catalytique et la boucle d'activation avec le site majeur d'autophosphorylation (Y393). Le domaine SH2 permet l'interaction avec des protéines comportant des résidus tyrosines phosphorylés. Le domaine SH3 est à l'origine d'interactions avec des séquences riches en proline. Dans sa moitié C-terminale, ABL possède des sites de fixation à l'ADN, à l'actine et à des signaux de localisation et d'exportation nucléaire (21).

I.1.3.6. Voies de signalisations impliquées dans LMC

La phosphorylation d'un grand nombre de substrats par la protéine p210^{BCR-ABL} est directement responsable des caractéristiques de cette cellule leucémique (16), ce qui la distingue d'une cellule normale. En effet, l'autoactivation et la perte de la régulation de l'activité tyrosine kinase entraînent l'activation, directe ou indirecte, et le recrutement de voies de signalisation impliquées dans les processus de prolifération, d'apoptose, de différenciation et d'adhésion cellulaire (9).

I.1.3.6.1. Altérations des propriétés d'adhésion cellulaire

Les cellules tumorales immatures présentent une diminution de leur adhésion au stroma médullaire et à la matrice extracellulaire. L'adhésion cellulaire est médiée par différentes familles de molécules comme les intégrines. L'expression de ces molécules d'adhésion n'est pas modifiée mais leur fonction et le signal qu'elles induisent sont dérégulés. Ainsi, la phosphorylation par BCR-ABL de protéines comme CRKL (CRK-oncogene-like protein), la paxilline ou la talline, jouerait un rôle important dans cette dérégulation (Fig. 4) (9).

I.1.3.6.2. Activation de signaux mitotiques

L'autophosphorylation du résidu tyrosine 177 de la protéine BCR-ABL permet la fixation de la protéine Grb-2 qui, liée à Sos (Son-of-sevenless), stabilise la forme activée de Ras (Rat *sarcoma* viral oncogene homolog). Cependant, deux autres protéines, substrats de BCR-ABL, peuvent aussi activer Ras : SHC (Src Homology 2-Containing protein) se liant à SH2 et CRKL se liant à SH3. Ras activée peut, *via* les protéines Raf (v-Raf murine *sarcoma* viral oncogene homolog B), Mek (Mitogen-activated extracellular-signal regulated kinase) et Erf (Ethylene response factor), activer à son tour d'autres gènes induisant un signal prolifératif (Fig. 4) (22).

Une autre voie, celle de JaK (Janus Kinase), joue aussi un rôle important. En effet, BCR-ABL peut activer, *via* Grb-2, les protéines STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) sans passer par la phosphorylation des JaK. De même, la voie des PI-3 K (PhosphoInositide-3 Kinases) peut, aussi, être activée *via* Grb2, induisant un signal prolifératif et antiapoptotique *via* Akt (v-Akt murine *thymoma* viral oncogene) (9, 23).

Une autre cible nucléaire postulée de l'activité transformative de la protéine BCR-ABL est le proto-oncogène Myc (Myelocytomatosis viral oncogene homolog), qui est exprimé à un niveau élevé dans les cellules de LMC. L'activation de Myc semble être indépendante de la voie Ras mais directement régulée positivement par la région SH2 d'ABL (23).

I.1.3.6.3. Inhibition de l'apoptose

BCR-ABL bloque le relargage du cytochrome C par la mitochondrie, ce qui induit l'inactivation de la voie des Caspases (Cysteiny-l-aspartate-activating proteases). Cet effet est dû en partie à la phosphorylation de la protéine proapoptotique Bad (Bcl-2 associated death promoter) ou à l'hyperexpression de la protéine antiapoptotique Bcl-2 (B cell lymphoma-2) *via* des voies de signalisation Ras ou PI-3 K-dépendantes. D'autres partenaires moléculaires, telles les protéines STAT ou encore la voie NFκB (Nuclear Factor kappa-B), interviennent dans l'inhibition d'apoptose induite par BCR-ABL (9, 22).

I.1.3.6.4. Dégradation de protéines par le protéasome

La protéine BCR-ABL, comme la protéine ABL, induit la dégradation *via* le protéasome des protéines Abi-1 (ABL-Interactor protein-1) et Abi-2, inhibiteurs physiologiques de l'activité kinase d'ABL. Elle induit aussi la dégradation de protéines participant à la réparation de l'ADN (9). Une autre cible de dégradation importante est la p27 de la cellule, un inhibiteur essentiel de la progression de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire (22), ce qui pourrait expliquer en partie l'instabilité génétique que présentent les cellules leucémiques Bcr-Abl positives (9).

I.1.3.6.5. Instabilité génomique ou génétique

Cette instabilité génétique est illustrée par la progression de la maladie vers les crises blastiques (9).

Il est généralement admis que le clone Ph-positif a une susceptibilité accrue aux changements moléculaires supplémentaires, qui expriment la progression de la maladie (11). Si c'est le cas, des modifications cytogénétiques non aléatoires identifiées dans 60 à 80 % de patients atteints de la maladie dans la transformation blastique (7, 24) -notamment +8, +Ph, +19, et i(17)q- devraient fournir des indices sur l'activation d'oncogènes (autre que Bcr-Abl) ou la suppression de gènes suppresseurs de tumeur dans la transformation de la phase chronique au stade avancé de la maladie. Toutefois, dans seulement une minorité de cas, la transformation a été réellement liée à des mutations, délétions ou expression altérée des gènes connus, notamment p53, p16, pRb, et EVI-1 (Ecotropic Viral Integration-1). En général, aucun modèle spécifique ne peut être discerné. Dans l'ensemble, il semble probable que la diversité des mécanismes moléculaires, plutôt qu'une anomalie d'un seul gène, conduisant à l'arrestation de la maturation qui se produit dans un sous-clone de cellules Ph-positives et se manifeste dans la phase blastique de la maladie. L'avènement des techniques puissantes de puces à ADN, qui permettent les

I. Partie Bibliographique

comparaisons de profils d'expression génique, devrait permettre l'identification des gènes impliqués dans cette transformation (20).

I.1.3.6.6. Régulation négative de BCR-ABL par BCR

La protéine BCR peut former un hétérotétramère avec la protéine BCR-ABL à travers les domaines d'oligomérisation NH₂-terminale des deux protéines. En outre, BCR se lie aux domaines SH2 d'ABL normal et se co-précipite avec L'ABL normal. Le résultat de l'interaction entre BCR et BCR-ABL peut être une rétrorégulation fonctionnelle. En effet, la phosphorylation de tyrosine 360 de BCR par BCR-ABL inhibe l'activité kinase de BCR, tandis que la phosphorylation de la sérine dans le premier exon de BCR inhibe l'activité kinase d'ABL (19).

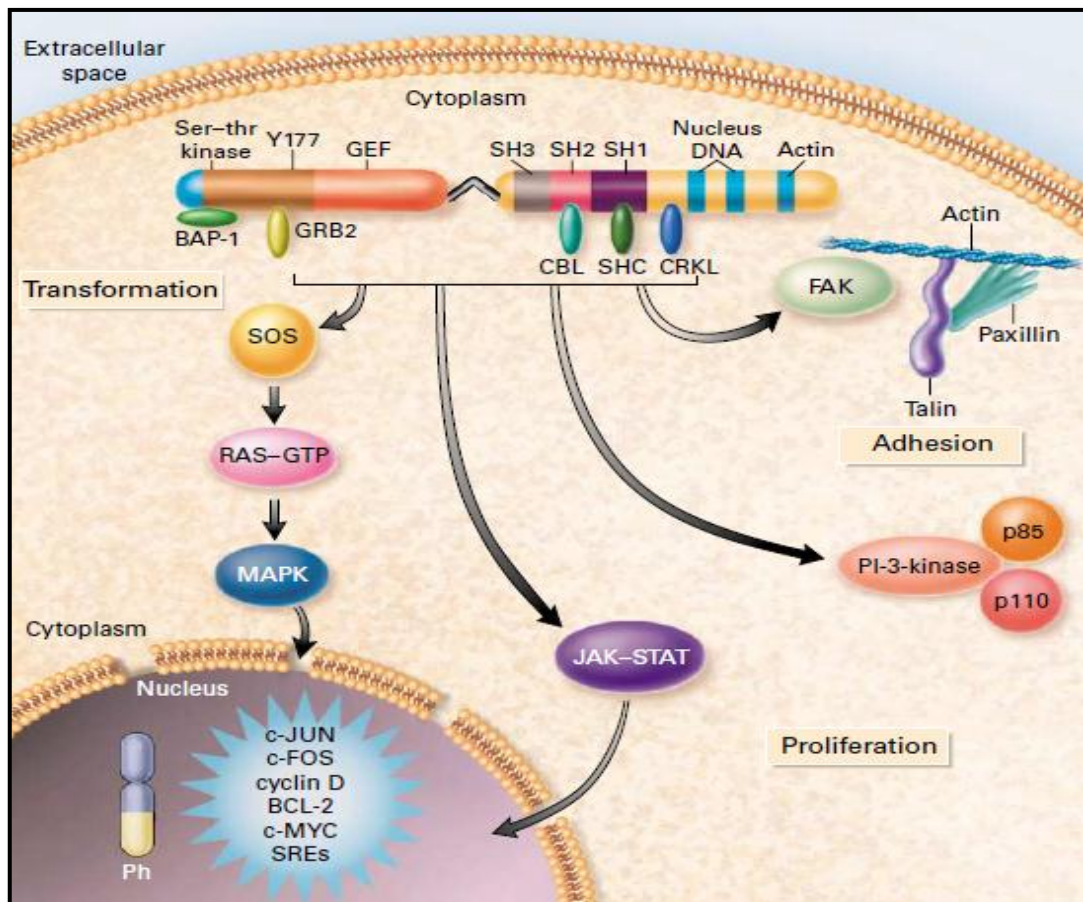


Figure 4. Différentes voies de signalisation participant à la leucémogénèse induite par BCR-ABL. Plusieurs régions de BCR-ABL servent comme des éléments de contrôle importants pour Ras, qui est au centre des voies de signalisation les plus importants dans la LMC. L'activation de Ras est médiée par une série de protéines adaptatrices, comme Grb2, CBL (Casitas B-lineage Lymphoma protein), SHC, et CRKL. Des protéines adaptatrices relient également p210^{BCR-ABL} à des complexes focaux d'adhésion, PI-3 K et d'autres systèmes de messagerie comme JaK-STAT. Les événements de signalisation en aval de Ras sont moins bien caractérisés. Ils semblent impliquer principalement MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinase), de préférence la voie JaK. FAK (focal adhesion kinase), SRE (stimulated response element), Ser-Thr (Serine-Threonine), Y177 (un résidu tyrosine conservé) (15).

I.1.3.7. Diagnostic

Le diagnostic nécessite : un hémogramme, un myélogramme, une biopsie ostéomédullaire et une étude en biologie moléculaire.

- **Hémogramme**

L'hémogramme ou Numération Formule Sanguine (NFS) est l'examen le plus important car il permet à lui seul de poser le diagnostic (25) :

- l'hyperleucocytose est franche, supérieure à $20 \times 10^9/l$, majoritairement composée de polynucléaires neutrophiles, associée à une basophilie et à une éosinophilie. La myélémie est constante et harmonieuse, sans hiatus de différenciation, et la blastose est faible lors de la phase chronique ($< 5\%$) ;
- l'anémie (normocytaire et normochrome) est peu courante et modérée ;
- la thrombocytose est habituelle et souvent supérieure à $500\,000/mm^3$. Parfois très élevée, elle est rarement responsable d'incidents thrombotiques par thrombopathie associée (9).

- **Myélogramme**

Il montre une moelle dont la richesse cellulaire est augmentée, avec une hyperplasie granuleuse marquée et une blastose médullaire inférieure à 10 % en phase chronique. On peut trouver, comme dans le sang, une basophilie, voire une éosinophilie. Les mégacaryocytes sont souvent en nombre augmenté et de petites tailles. Inutile pour le diagnostic de LMC, le myélogramme permet, cependant, de confirmer la phase de la maladie et de réaliser le caryotype initial (9).

- **Biopsie ostéomédullaire**

Inutile au diagnostic de LMC, elle affirme le diagnostic de syndrome myéloprolifératif, caractérisé par une hyperplasie du tissu hématopoïétique et de la lignée myéloïde en particulier, comblant la totalité des espaces médullaires, avec disparition des cellules adipeuses. Une fibrose réticulinique discrète peut se voir, mais rarement dès le diagnostic. L'apparition d'une fibrose fait partie des signes d'accélération de la maladie (9).

- **Examens nécessaires au diagnostic**

Le critère fondamental du diagnostic est la présence du gène de fusion Bcr-Abl détecté par biologie moléculaire.

I. Partie Bibliographique

- La Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) met en évidence le transcrit de fusion Bcr-Abl dans les cellules médullaires (25) ou, plus facilement, à partir d'un prélèvement sanguin. Elle permet de définir le sous-type moléculaire produit. Cet examen est aujourd'hui indispensable au diagnostic de LMC ;
- Le caryotype, réalisé sur échantillon médullaire, met en évidence dans 95 % des cas la présence du chromosome Ph, classiquement présent dans toutes les cellules. Indispensable au diagnostic, il permet aussi de détecter des anomalies cytogénétiques surajoutées et donc de préciser la phase de la maladie. C'est pour cette raison qu'il doit être effectué à partir de cellules de la moelle osseuse ;

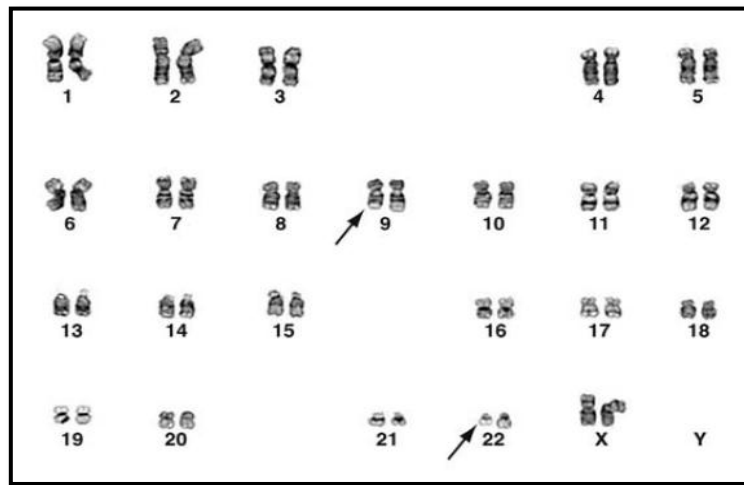


Figure 5. Caryotype au moment de l'apparition initiale de la LMC (26).

- L'hybridation *in situ* ou FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridation) visualise directement le gène de fusion Bcr-Abl sur les noyaux (13), qu'il y ait translocation visible en cytogénétique ou pas. L'avantage de cette technique est de détecter les remaniements Bcr-Abl sans chromosome Ph et d'être plus sensible que le caryotype. Elle ne permet pas, en revanche, de mettre en évidence des anomalies cytogénétiques additionnelles. Cependant, elle peut être utile pour rechercher une délétion du chromosome 9, reconnue comme facteur pronostique péjoratif (9).

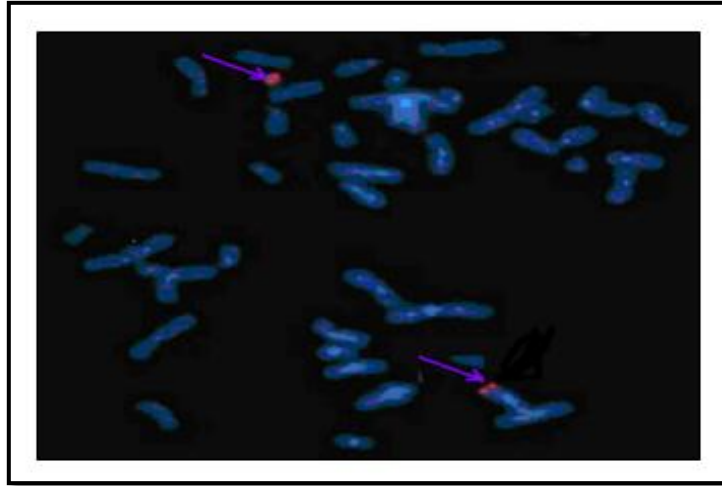


Figure 6. Une FISH montrant un spot de fusion localisé sur le chromosome 22q (27).

I.1.3.8. Traitement

Le traitement de la LMC a, durant de nombreuses années, évolué au gré des améliorations de la prise en charge des patients et des découvertes thérapeutiques. L'objectif thérapeutique de la LMC est la rémission hématologique ainsi que la rémission cytogénétique et la présence d'un marqueur moléculaire a rendu cette évaluation plus facile (9).

La seule thérapeutique curative de la LMC reste à l'heure actuelle l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Malgré l'amélioration de la réanimation hématologique, la mortalité liée à la greffe reste d'environ 15 % et tous les patients ne peuvent bénéficier de ce traitement en raison de l'absence de donneur et/ou de leur âge. Jusqu'au début des années 2000, le traitement standard de la LMC en phase chronique était l'association interféron-alpha et cytarabine (16).

En 1996, une molécule de la famille des aminopyrimidines (l'imatinib mésylate) a montré une forte activité anti-tyrosine kinase (Fig. 7). Cette molécule a ensuite été testée chez des patients atteints de LMC et résistants au traitement standard (interféron-alpha/cytarabine) et a montré sa supériorité en terme de réponses cytogénétiques et moléculaires. L'imatinib (Glivec®) est un inhibiteur compétitif de l'ATP actif sur la protéine BCR-ABL, mais aussi sur ABL. Cette molécule se lie au site de fixation de l'ATP du domaine kinase uniquement lorsque la protéine est dans sa forme inactive. Il présente une efficacité thérapeutique remarquable dans la phase chronique de la LMC (taux de survie de 87 % à 5 ans). Son efficacité est plus faible dans les phases avancées de la maladie. De plus, l'imatinib ne permet pas d'éradiquer les cellules souches hématopoïétiques les plus quiescentes, ce qui sous-entend que cette molécule ne peut à elle seule entraîner une disparition totale des cellules leucémiques et donc parvenir à une guérison de la

I. Partie Bibliographique

maladie. Les résultats de l'essai clinique IRIS (International Randomized IFN vs STI571) démontrant sa supériorité par rapport à l'association interféron-alpha/cytarabine, l'imatinib (400 mg/j) est devenu le traitement de première ligne chez tous les patients atteints de LMC (16).

Si l'imatinib montre une excellente efficacité, des résistances apparaissent chez une minorité de patients (environ 20 %). Cette notion de résistance à l'imatinib a été clairement définie au niveau hématologique, cytogénétique et moléculaire (28).

Récemment, la deuxième génération des inhibiteurs de tyrosine kinase ; le nilotinib et le dasatinib ont été testés et approuvés en deuxième ligne (29). Ils ont montré leur efficacité chez les malades résistants ou intolérants à l'imatinib (30).

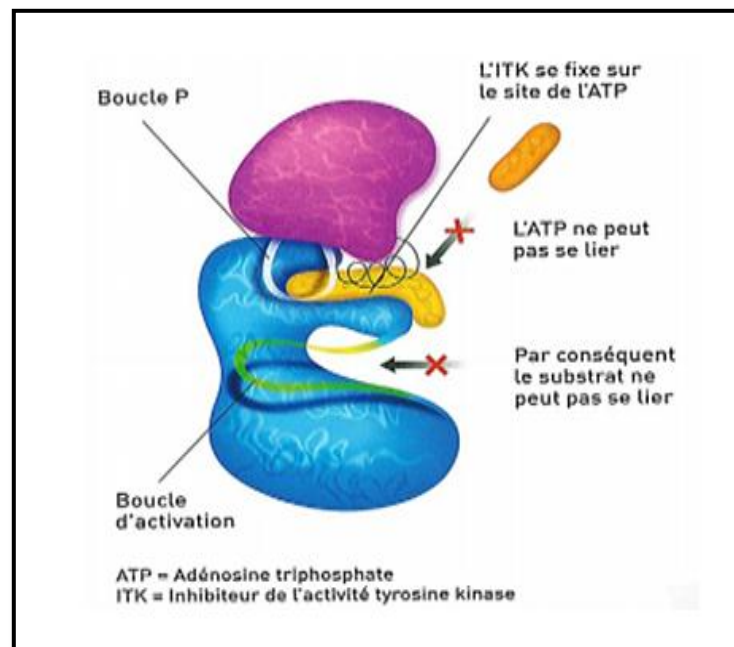


Figure 7. Mode d'action des Inhibiteurs de la Tyrosine Kinase (ITK) (31).

I.2. Folate et homocystéine

I.2.1. Folate

I.2.1.1. Définition et structure

Le folate est le nom de groupe nommé pour une classe de composés vitamines bioactives (32).

L'acide folique est une vitamine B hydrosoluble. Le nom de l'acide folique est dérivé du mot latin folium, ou feuille. Il a d'abord été isolé à partir de feuilles d'épinards en 1941 (33) et a été synthétisé en 1946. Son nom chimique est l'acide ptéroylmonoglutamique. Le terme acide folique est utilisé pour sa forme synthétique présente dans les multivitamines, comprimés d'acide folique et les aliments fortifiés (34).

L'acide folique est une petite molécule de poids moléculaire égal à 441 KDa (35), formé d'un anneau ptéridine aromatique lié par un pont méthylène à l'Acide Para-AminoBenzoïque (PABA), qui est à son tour attaché à l'acide glutamique par une liaison peptidique (fig. 8) (36).

La forme naturelle est appelé folate (Folacine), qui se produit naturellement comme des dérivés polyglutamate avec les groupements glutamates liés par des liaisons peptidiques γ -carboxyliques (34).

I.2.1.2. Apport et besoin

L'organisme n'est pas capable de synthétiser les folates (37), donc ils sont obligatoirement apportés par l'alimentation, sous forme de polyglutamates que l'on retrouve entre autres dans les légumes à feuilles, certains fruits, la levure, les laitages, le foie... (38).

Les folates alimentaires existent principalement en 5-MéthylTétraHydroFolate (5-MTHF) et formyl-TétraHydroFolate (formyl-THF). Le 5-MTHF est le folate alimentaire prédominant et est facilement oxydé en 5-méthyl-5,6-DiHydroFolate (5-méthyl-5,6-DHF). Dans cette forme oxydée, il peut représenter une part importante du folate alimentaire totale (39).

Dans la plupart des pays, l'apport nutritionnel recommandé (ANR) pour le folate est de 300 $\mu\text{g}/\text{jour}$ pour les adultes et 400 $\mu\text{g}/\text{jour}$ pour les femmes en âge de procréer (40). Les recommandations sont plus facilement atteintes par la consommation d'aliments enrichis en acide folique, du fait de la meilleure stabilité et la biodisponibilité de l'acide folique synthétique par rapport aux folates alimentaires natives (41) (les folates naturels sont de 30 % à 80 % moins biodisponibles que l'acide folique (42)).

I. Partie Bibliographique

I.2.1.3. Dérivés et formes actives

Pour être métaboliquement active, la molécule d'acide folique doit être convertie en la forme bioactive naturellement, Le THF, qui se produit à travers deux réactions de réduction catalysée par la DiHydroFolate-Réductase (DHFR) (43). Les THF sont méthylés ou formylés, par addition des unités monocarbonées à leur azote N5 ou N10 (Fig. 8) (39).

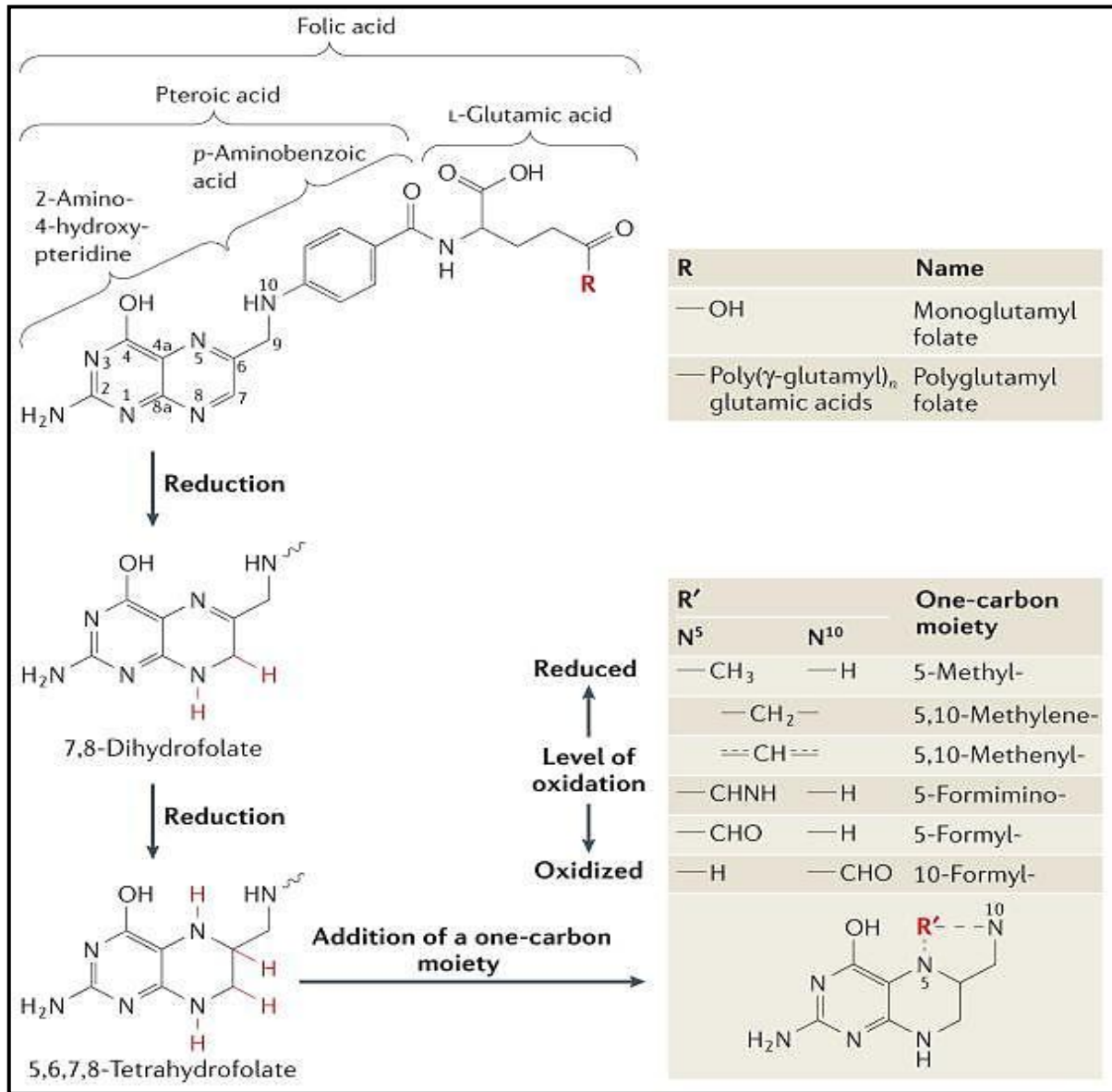


Figure 8. Structure et dérivés de l'acide folique (43)

I.2.1.4. Fonctions biologiques

Les folates ont un rôle important dans le métabolisme des monocarbonés, principalement dans les synthèses des purines et pyrimidines, et donc de l'ADN, ainsi que dans la reméthylation de l'homocystéine (Hcy) en méthionine (Met) qui, conjuguée à l'adénosine, forme la S-

I. Partie Bibliographique

AdénosylMéthionine (AdoMet ou SAM), le donneur universel dans les transméthylations (Fig. 9). Par ce biais, les folates jouent un rôle essentiel dans les régulations épigénétiques de l'expression des gènes (38).

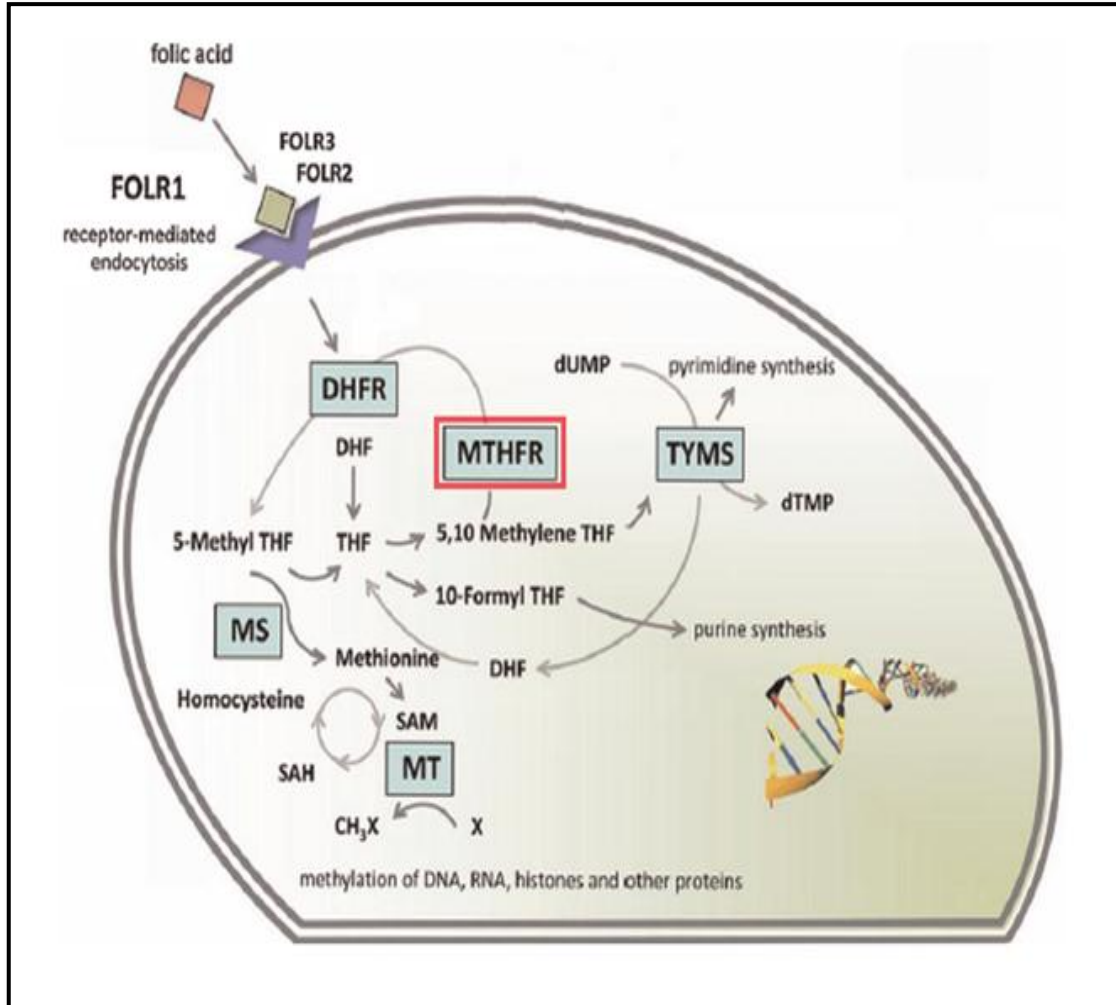


Figure 9. Métabolisme des folates. Abréviations : MTHFR : Méthylène Tétrahydrofolate Réductase ; DHFR : DiHydrofolate Réductase ; TYMS : Tymidylate Synthase ; MT : Méthyl Transférase ; MS : Méthionine Synthase ; DHF : DiHydrofolate ; THF : Tétrahydrofolate ; SAM : S-AdénosylMéthionine ; SAH : S-AdénosylHomocystéine ; dUMP : désoxyUridine MonoPhosphate ; dTMP : désoxyThymidine MonoPhosphate (35).

I.2.1.5. Conséquences du déficit en folates

Un déficit en folates, par carence d'apport ou en rapport avec des polymorphismes nucléotidiques se traduit par une diminution de la synthèse et de la réparation de l'ADN, par une hypométhylation de l'ADN et d'autres molécules, ainsi que par une accumulation d'homocystéine. Cette situation a été associée à de nombreuses pathologies cardiovasculaires, neurodégénératives et obstétricales (38). Néanmoins, l'apport excessif en acide folique pourrait interagir avec différents médicaments (44).

I.2.2. Homocystéine (Hcy)

I.2.2.1. Définition

L'Hcy est un acide aminé soufré (45), non utilisée dans la synthèse des protéines (46), synthétisée par toutes les cellules de l'organisme (45). C'est un intermédiaire clé dans le métabolisme de la méthionine. Elle est synthétisée comme sous-produit de réactions de transfert de méthyle, qui sont importants pour la synthèse des acides nucléiques, des protéines méthylées, des neurotransmetteurs, et des phospholipides (47).

I.2.2.2. Métabolisme de l'Hcy

L'Hcy peut être catabolisée selon deux voies métaboliques, décrites dans la Figure 10, la voie de la transulfuration et la voie de la reméthylation. En cas d'apport protéique excessif, la voie de la transulfuration est favorisée par rétrocontrôle positif de la Cystathionine Bêta-Synthase (CBS) et rétro-contrôle négatif de la 5, 10-MéthylèneTétraHydroFolate Réductase (MTHFR), le régulateur allostérique étant la SAM. A l'inverse, en cas de déficit protéique, la voie de la reméthylation est favorisée et l'Hcy est recyclée afin de maintenir un pool cellulaire suffisant de méthionine (45).

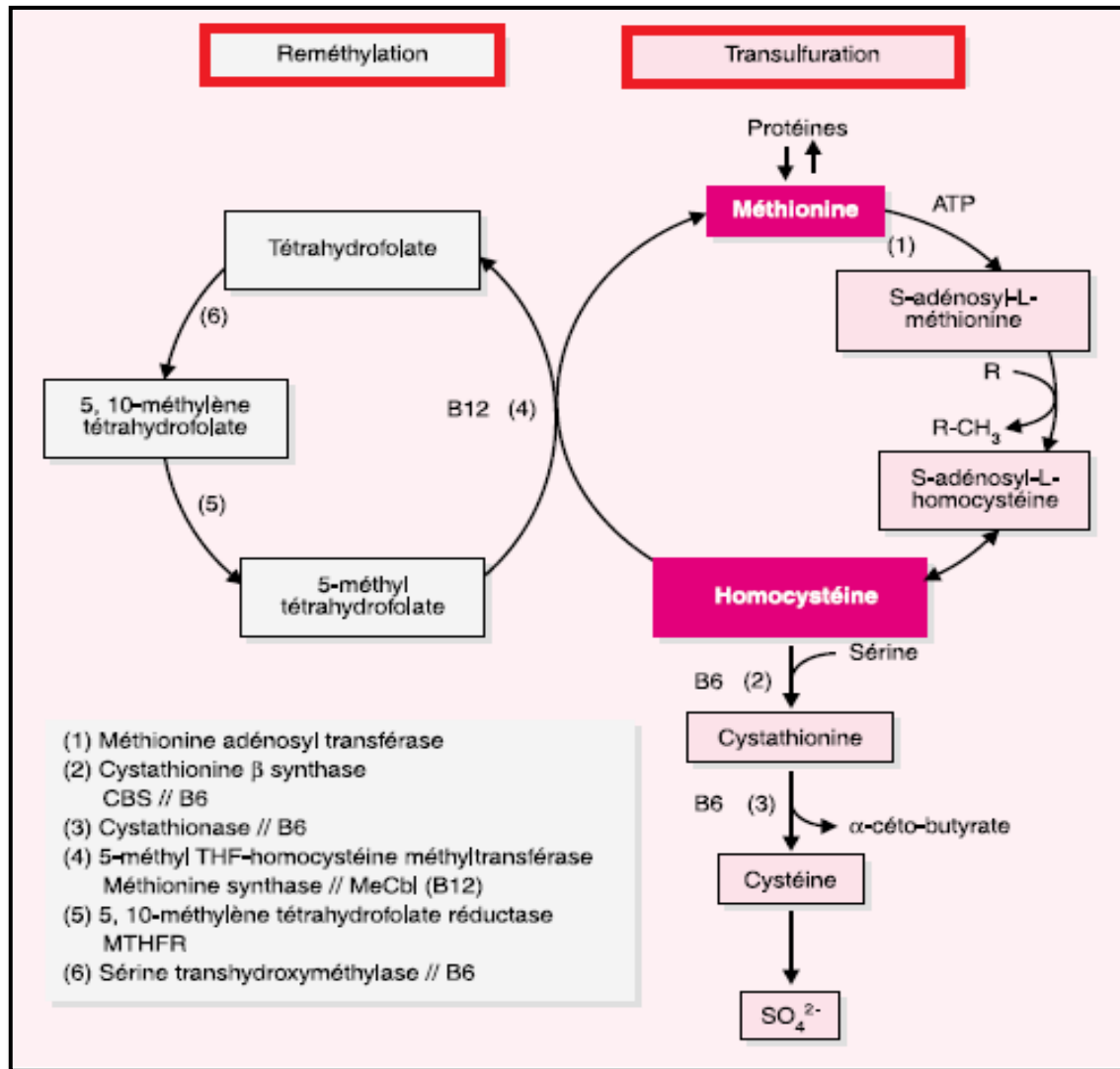


Figure 10. Métabolisme intracellulaire de l'homocystéine. L'Hcy est dérivée de la Met après son utilisation comme un donneur de groupe méthyle dans les réactions de méthylation biologiques. Dans ce cycle, la Met est couplée à l'adénosine fournie par l'Adénosine TriPhosphate (ATP) grâce à la méthionine adényl transférase pour former la SAM. Chacune de ces réactions produit la S-AdénylHomocystéine (AdoHcy ou SAH). Par la suite, la S-AdénylHomocystéine Hydrolase (SAHH) hydrolyse la SAH en adényl et Hcy dans une réaction réversible qui favorise la SAH sur la production de l'Hcy. **La voie de la reméthylation :** l'Hcy peut être reméthylée pour former la Met, sa reméthylation nécessite la présence de 5-MTHF provenant de la réduction du 5,10-MTHF par une des enzyme-clés de ce métabolisme, la 5,10-MTHF Réductase (MTHFR). Alternativement, le groupement méthyle peut être fourni également par la bétaine grâce à la Bétaine Homocystéine MéthylTransférase (BHMT). Contrairement à la première réaction, qui a lieu de façon ubiquitaire, l'activité de la BHMT semble être limitée au tissu hépatique et rénal. **La voie de la transulfuration :** sous l'influence de la CBS dont le cofacteur est le phosphate de pyridoxal (vit B6), l'Hcy se condense ensuite avec la sérine pour former la cystathionine, elle-même clivée et désaminée en cystéine et en alphacéto-butyrat (45).

I.3. Mthfr et polymorphisme génétique C677T

I.3.1. Gène Mthfr

I.3.1.1. Structure et localisation

En 1994, l'ADNc codant pour la MTHFR humaine était isolé et séquencé, et une séquence d'acides aminés de l'enzyme a été établie (48).

Le gène de la MTHFR humaine est de 20 kb de long (20,336 pb) et localisé sur le bras court (p) du chromosome 1 en position 36.3 (Tableau I). L'ADNc de la MTHFR humaine est de 2.2 kb de taille. Il a été initialement rapporté par Goyette *et al* (1998) qu'il a 11 exons rangés selon leur taille de 102 pb à 432 pb. Les tailles des introns sont rangées de 250 paires de bases jusqu'à 1.5 kb avec une exception d'un intron de 4.2 kb (Fig. 11). Cependant, des études récentes ont signalé plus que 11 exons (49).

Deux promoteurs majeurs du gène Mthfr ont été identifiés, promoteur en amont et un autre en aval situés en amont d'un ensemble de site d'initiation de transcription (50).

L'analyse génomique de la séquence du gène Mthfr montre que la région promotrice du gène ne contient pas de TATA box. Cependant, elle contient des îlots CpG, une région CAAT et plusieurs séquences consensus pour les sites de liaison potentiels de facteurs de transcription tels que SP1, AP1 et AP2 (51, 52). Sur l'exon 1 du gène, il y a un site d'épissage alternatif ; la région UTR (UnTranslated Region) est longue, montrant la complexité dans la régulation de ce gène. L'exon 11 contient le codon de terminaison (48), l'extrémité 3' de cet exon a été désignée pour la localisation de multiples sites de polyadénylation, qui sont choisis de manière tissu-spécifique et les différentes longueurs qui en résultent semblent jouer un rôle dans la stabilité de l'ARNm et dans l'initiation et l'efficacité traductionnelle (53).

I. Partie Bibliographique

Tableau I. Ensemble d'informations relatives à l'identification du gène Mthfr.

Nom officiel	Méthylènetétrahydrofolate réductase (NAD(P)H)	Localisation
Symbole officiel	MTHFR	1p36.3
Symboles et noms précédents	5,10-méthylènetétrahydrofolate réductase (NADPH)	
Identifiants dans les différentes bases de données		
Entrez Gene ¹	<u>4524</u>	
HGNC ²	<u>7436</u>	
Ensembl ³	<u>ENSG00000177000</u>	
Region in detail Sequence Vega ⁴	<u>OTTHUMG00000002277</u>	
Region in detail Sequence UCSC ⁵	<u>uc001atc.2</u>	
UniProt ⁶	<u>P42898</u>	
RefSeq (mRNA) ⁷	<u>NM_005957.4</u>	
OMIM ⁸	607093	

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4524>

² http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?hgnc_id=7436

³ http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000177000;r=1:118457-80-11866977

⁴ http://vega.sanger.ac.uk/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=OTTHUMG00000002277;r=1:11845780-11866977#

⁵ http://genome.cse.ucsc.edu/cgi-bin/hgGene?org=Human&hgg_chrom=none&hgg_type=knownGene&hgg_gene=uc001atc.2

⁶ <http://www.uniprot.org/uniprot/P42898>

⁷ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_005957

⁸ <http://www.omim.org/entry/607093>

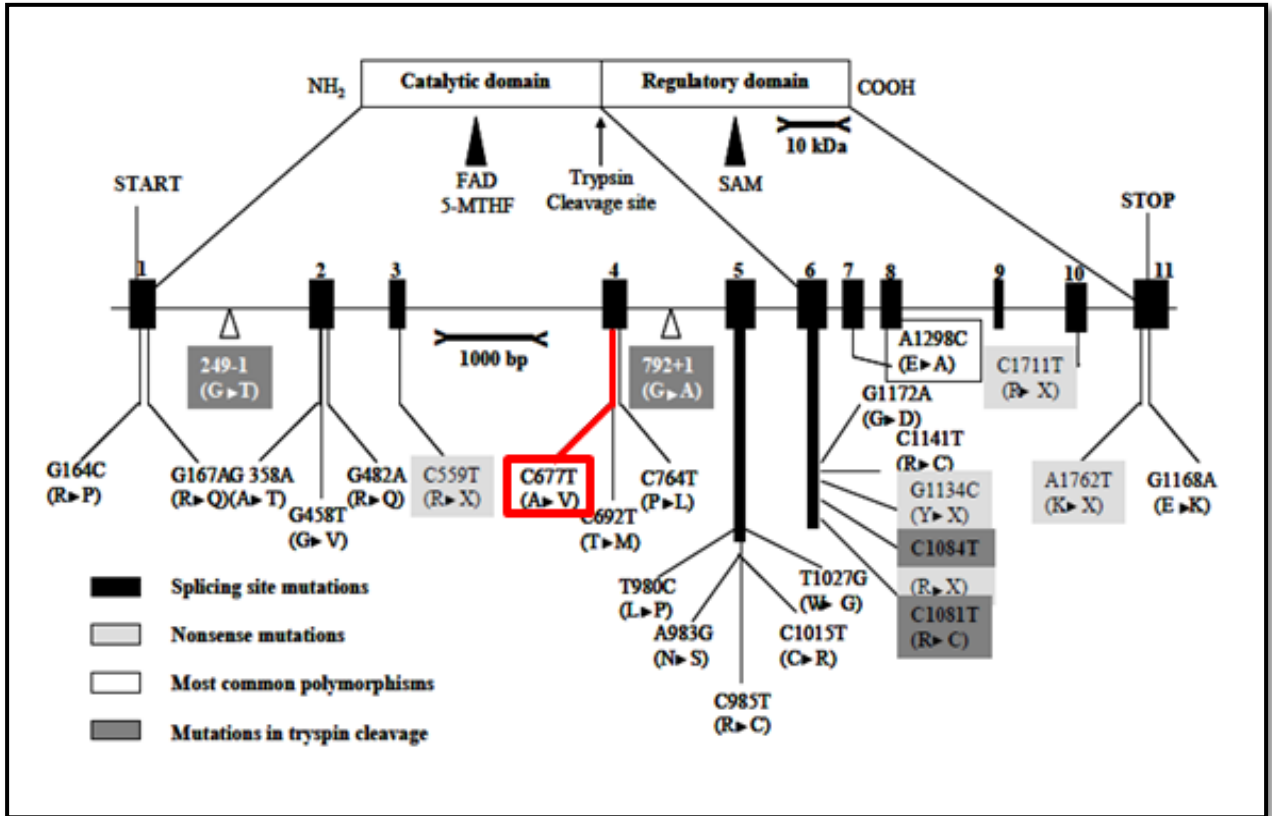


Figure 11. Gène, protéine et polymorphismes du gène Mthfr (48).

I.3.1.2. Transcrits du gène Mthfr

La transcription du gène Mthfr produit trois transcrits différents (MTHFR 1, 2 et 3), respectivement, de 2.8, 7.2 et 9.8 kb (51), qui diffèrent dans leurs premiers exons (Fig. 12). En outre, le transcrit MTHFR 1 a été retrouvé dans deux variantes, qui ont été discriminées par l'absence ou la présence de trois nucléotides, en raison de l'implication alternative de deux signaux d'épissage consensus adjointes, sans affecter les séquences polypeptidiques déduites. Chacun des trois transcrits majeur MTHFR 1, 2 et 3 avait un premier codon ATG individuel codant éventuellement pour des polypeptides de 657, 698 et 680 résidus d'acides aminés, respectivement (52).

I. Partie Bibliographique

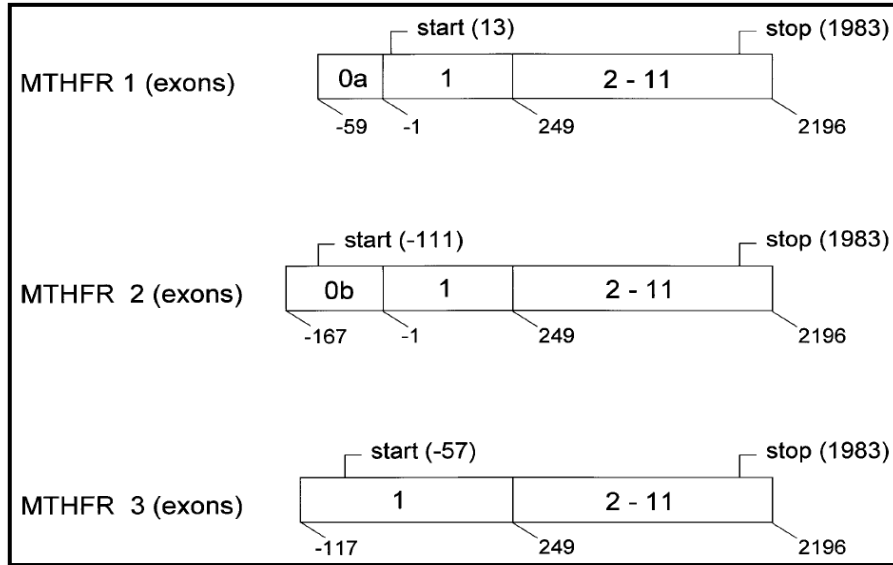


Figure 12. Différents transcrits du gène *Mthfr* (52).

I.3.2. Protéine MTHFR

I.3.2.1. Structure et fonction

La MTHFR est une enzyme clé qui régule le métabolisme des folates (39, 54). La MTHFR est une flavoprotéine qui convertit irréversiblement le 5,10-MTHF en 5-MTHF, en utilisant le NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) comme agent réducteur (Fig. 13) (55, 56).

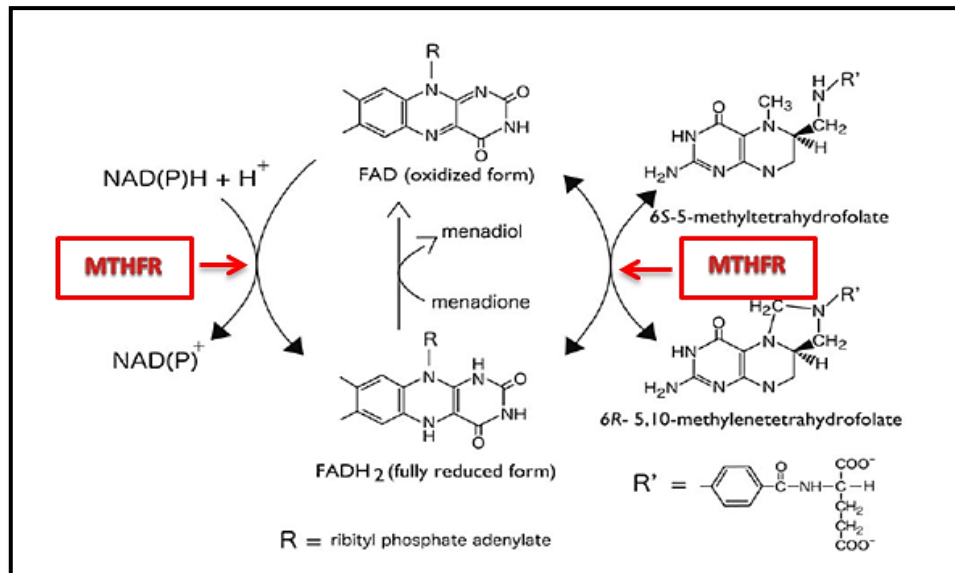


Figure 13. Réactions catalysées par la MTHFR. La MTHFR lie de manière non covalente le FAD comme un cofacteur essentiel. Le NADPH et le 5,10-MTHF sont des substrats physiologiques. NADPH réduit le FAD, le FAD réduit assure la réduction du 5,10-MTHF. Le 5-MTHF peut réduire le FAD oxydé (*in vitro*). Le FAD réduit peut être oxydé par une ménadione comme accepteur d'électrons, qui est couramment utilisé pour des essais *in vitro* (57).

I. Partie Bibliographique

La protéine humaine possède deux isoformes. L'un de poids moléculaire de 77 kDa et l'autre de 70 kDa dont la plus petite a été découverte uniquement dans le foie d'adulte ainsi que dans le foie et les reins fœtaux (48).

Cette enzyme a fait l'objet de nombreux travaux et il est actuellement démontré qu'elle fonctionne sous forme d'un homodimère (58), dont chacun des monomères possède deux domaines : le domaine catalytique, représenté par l'extrémité N-terminal de poids moléculaire de 40 kDa, liant le FAD (cofacteur), le NADPH (donneur d'électrons), le 5,10-MTHF et le domaine de régulation à l'extrémité C-terminale, de poids moléculaire de 37 kDa qui interagit avec la SAM, principal facteur de régulation inhibant l'activité de l'enzyme (Fig. 14) (48, 58). Entre ces deux domaines se trouve une forte région hydrophobe avec une séquence d'acides aminés Lys-Arg-Arg-Glu-Glu constituant un site de clivage par la trypsine. La digestion de la MTHFR par la trypsine ne provoque pas la perte de l'activité catalytique réductrice de l'enzyme. Par contre, la protéine devient sensible à la régulation allostérique (Fig. 11) (48).

Une activité normale de la protéine MTHFR maintient un pool adéquat en folates circulants et prévient de l'augmentation des concentrations de l'homocystéine (49, 59).

I.3.2.2. Régulation de l'expression des deux isoformes de la MTHFR

Pickell L *et al.* (2011) ont proposé que les deux promoteurs puissent être responsables de la régulation différentielle des deux isoformes de la MTHFR. Basé sur le dogme que le plus court favorise une traduction plus efficace, l'initiation de la transcription du promoteur en amont suivie par une traduction à partir du site d'initiation ATG du promoteur en aval conduirait à la traduction de la petite isoforme de la MTHFR de 70 kDa. Alternativement, l'initiation de la transcription du promoteur en aval se lirait directement dans le site d'initiation ATG du promoteur en amont et permet la traduction de l'isoforme de la MTHFR de 77 kDa. Ils ont aussi trouvé des preuves de régulation de la MTHFR temporelle et tissu-spécifique par ses deux principaux promoteurs, en particulier dans l'embryon précoce, le cerveau postnatal et les tissus reproducteurs mâles (50). Leclerc D et Rozen R (2008) ont démontré que la MTHFR peut être régulée par le NF- κ B, un médiateur important de la survie de la cellule, qui est activé par le stress du réticulum endoplasmique (ER) (60). Pickell L *et al.* (2005) ont présenté des preuves que NF- κ B augmente l'expression de la MTHFR et que cet effet est médié, au moins en partie, par un site de liaison à son promoteur en aval (50).

I.3.2.3. Régulation de la signalisation de la MTHFR

La MTHFR peut être réglée dans un certain nombre de façons. Des quantités excessives de DHF et SAM sont responsables pour inhiber son activité (61). En outre, la modification post-traductionnelle de la MTHFR par phosphorylation résulte en une activité réduite et une susceptibilité accrue à l'inhibition par SAM (62).

I.3.3. Polymorphismes du gène Mthfr

Plusieurs polymorphismes ont été identifiés dans ce gène jusqu'ici, parmi lesquels, 2 cas sont présentés pour être d'une grande importance dans la littérature. Le polymorphisme C677T, dans l'exon 4, est le plus fréquemment étudié dans ce gène (63). Les personnes avec le génotype homozygote 677TT de la MTHFR ont une activité enzymatique de moins 30 % par rapport à ceux ayant l'allèle sauvage, tandis que l'activité de l'enzyme est de moins 60 % chez les personnes hétérozygote 677CT (2).

Un autre polymorphisme important, bien étudié dans le gène Mthfr, est A1298C dans l'exon 7, qui provoque la substitution du glutamate en alanine au niveau du codon 249 (63). Ce polymorphisme est situé dans le domaine régulateur où se lie la SAM. La liaison de SAM à l'enzyme MTHFR conduit à des changements de conformation dans la structure de l'enzyme et inhibe son activité, donc le polymorphisme A1298C diminue également l'activité de la MTHFR mais pas tant que C677T (2).

Bien sûr, d'autres polymorphismes ont été identifiés dans le gène codant l'enzyme MTHFR comme l'allèle T1317C, qui n'entraîne pas le changement de l'acide aminé dans la protéine, ou l'allèle G1793A résultant de la substitution arginine en glutamine au niveau du codon 594. L'association entre ces allèles polymorphes et l'activité enzymatique n'a pas encore été clarifiée (63).

I.3.4. Polymorphisme C677T

I.3.4.1. Définition et fréquence

Frosst P *et al.* (1995) ont identifié une mutation commune C677T, autosomique récessive, provenant du remplacement d'une cytosine en position 677 par une thymine, et à l'origine de la substitution d'une alanine par une valine en position 222 (64). Cet allèle est communément appelée thermolabile parce que son activité diminue au-dessus de 37°C (49, 59). Le polymorphisme C677T provoque le changement d'acide aminé au niveau du site de liaison du

I. Partie Bibliographique

cofacteur de l'enzyme MTHFR, le FAD. Ce polymorphisme facilite la séparation de l'enzyme de son cofacteur, et, par conséquent, la diminution de l'activité enzymatique (63, 65).

L'allèle 677T, du polymorphisme du gène *Mthfr*, montre une variation ethnique et géographique remarquable. Dans une étude sur 7000 nouveau-nés issus de 16 régions à travers le monde, l'allèle 677T variait de 26,6 % à 46 % en Italie et 25,7 % au Moyen-Orient à 44,2 % dans le nord de la Chine (66). En outre, dans une étude au Liban, la fréquence de génotype homozygote 677TT de la MTHFR était 7,66 % et 13,08 % chez les musulmans arabes et chrétiens, respectivement (67).

Dans les pays du Maghreb, les résultats ont montré une fréquence allélique pour l'allèle T de 30,5 % en Algérie (64), 18 % en Tunisie (68) et 26.3 % en Maroc (69).

I.3.4.2. Cartographie et implication de la mutation C677T

Pour obtenir la structure du domaine catalytique de la MTHFR, et pour examiner les propriétés de la substitution Ala→Val, Pejchal *et al.* (2006) ont utilisé la MTHFR d'*Escherichia coli* comme un système modèle (qui est 30 % identique au domaine catalytique de l'enzyme humaine). Cette MTHFR bactérienne, avec seulement 296 résidus, est beaucoup plus petite que les MTHFRs des mammifères. Elle n'est pas régulée par la SAM, et agrège pour former un tétramère plutôt que d'un dimère (Fig. 14) (70). Sheppard (1998) a caractérisé une MTHFR d'*E. coli* portant la substitution Ala177Val qui correspond la substitution Ala222Val dans l'enzyme humaine (65, 70).

La substitution A177V affecte la liaison du FAD, mais modifie un résidu qui n'est pas une partie du site de liaison avec le FAD. Ala 177 est situé près du bas du cylindre $\alpha 8\beta 8$ (entre l'hélice $\alpha 5$ et le feuillet $\beta 6$), hors du contact direct avec le FAD ou les résidus conservés qui peuvent être essentiel pour l'activité ou la liaison du folate (65). Une hypothèse a été émise que le polymorphisme conduirait à un mouvement de l'hélice $\alpha 5$, qui a de nombreuses interactions avec le cofacteur FAD (Fig. 14). Il semble également possible que les variations de cette même hélice pourraient influencer sur les interactions entre les chaînes chargées responsables de la détention du tétramère ensemble (70).

Les propriétés de la MTHFR mutante Ala177Val ont été comparées avec ceux de l'enzyme de type sauvage ; la substitution n'affecte pas la cinétique de la réduction de 5,10-MTHF en 5-MTHF mais elle l'a fait conduire à une diminution de l'affinité de l'enzyme pour son cofacteur FAD (55, 65). Une étude récente, faite par Shahzad *et al.* (2013), a suggéré que l'acide aminé

I. Partie Bibliographique

substitué de la MTHFR humaine affecte les sites de phosphorylation de la structure protéique en effectant le site de liaison du FAD (71).

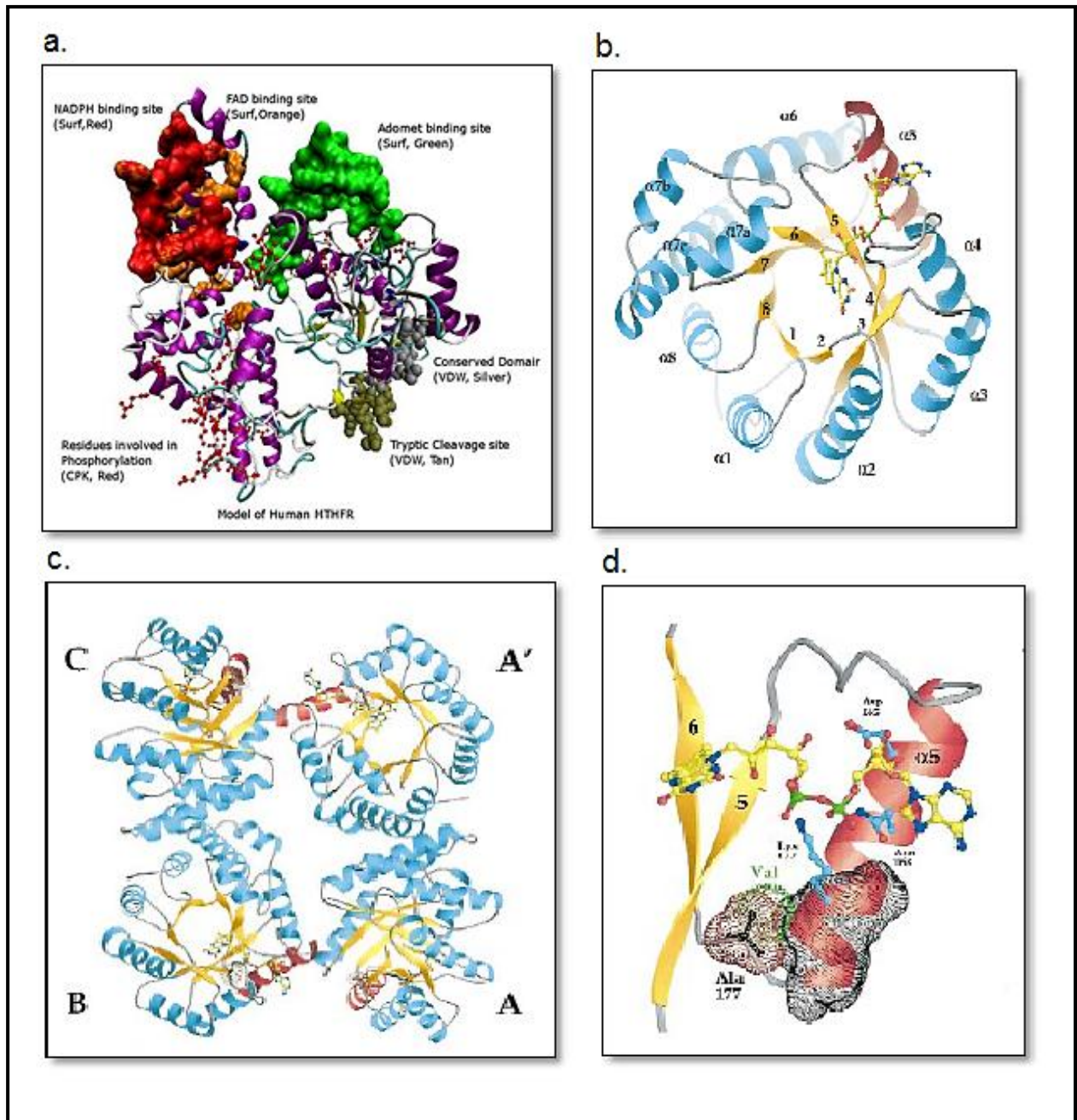


Figure 14. Structure moléculaire de la MTHFR. **a.** Modèle de la structure de la MTHFR humaine (71). **b.** Structure de la sous-unité de la MTHFR d'*E. coli*. Une vue le long de l'axe du cylindre $\alpha 8\beta 8$ en regardant vers les extrémités C-terminales des feuillets β . FAD est établi en mode "boule-et-bâton". L'hélice $\alpha 5$, qui précède le site correspondant à la substitution A \rightarrow V, est coloré en rouge. **c.** Tétramère de la MTHFR d'*E. coli*. **d.** Localisation et Environnement de l'Ala 177 qui correspond au site de l'Ala 222 de la MTHFR humaine. Des surfaces de points noirs tracent le squelette de l'hélice à partir de 171-176 ; les surfaces rouges représentent le volume d'alanine à la position 177, et les surfaces vertes, la substitution de valine en position 177. Les chaînes latérales de Lys 172, Asn 168 et Asp 165 qui interagissent avec le FAD sont dessinées en mode "boule-et-bâton" avec les carbones en cyan (65).

I. Partie Bibliographique

I.3.4.3. Effets métaboliques

Les individus homozygotes pour cette mutation ont une élévation très significative de la concentration de l'homocystéine plasmatique (72), associée à une baisse du taux des folates. En revanche, des taux élevés en folates plasmatiques semblent neutraliser les effets dus à cette mutation. En plus, le polymorphisme C677T influence l'état de méthylation de l'ADN génomique par l'entremise de son interaction avec le métabolisme des folates (Fig. 15) (73).

Sur le plan clinique, des études épidémiologiques non confirmées voire parfois controversées, en fonction de la population et de la région géographique, ont rapporté la corrélation de la mutation C677T avec plusieurs processus pathologiques (74), notamment ceux dépendants du métabolisme des folates. Il s'agit de la schizophrénie (75) ; des maladies cardiovasculaires (76) ; des cancers (77) ; des anomalies de développement embryonnaire dont l'insuffisance de fermeture du tube neural (59). Cependant, des résultats contradictoires ont été reportés (59, 78). Cette controverse a été partiellement expliquée par de récentes études qui ont démontrées que la fréquence du polymorphisme C677T du gène Mthfr diffère largement dans différentes populations en fonction de l'aire géographique et des ethnies (66).

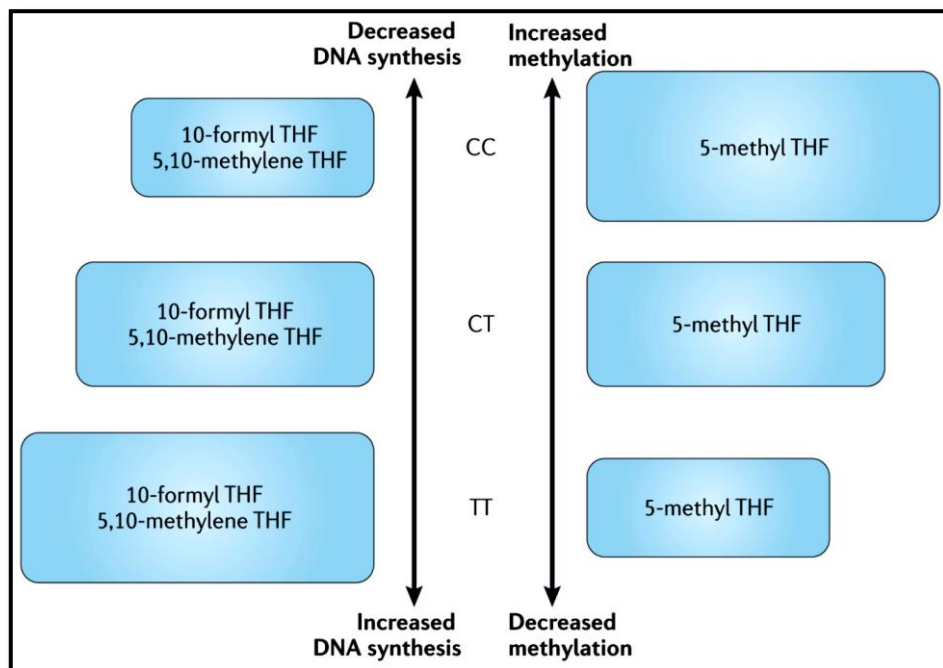


Figure 15. Trois génotypes de la MTHFR affectant la méthylation et la synthèse de l'ADN à différentes mesures (43).

Partie
expérimentale

II. Partie Expérimentale

II.1. Patients et témoins

L'étude que nous avons entreprise est transversale de type cas-témoins ; elle a été réalisée sur deux types de populations :

- une population de 30 malades (atteinte de la LMC en phase chronique, avec Ph (+) en cytogénétique), traitée par l'imatinib, fournis par le service d'hématologie du CHU-Batna;
- une population de 11 témoins, saine de différentes tranches d'âge et des deux sexes.

II.2. Méthodes

II.2.1. Prélèvements sanguins

Des prélèvements sanguins de 4 ml sont réalisés sur des tubes EDTA, un anti-coagulant, qui est un chélateur ou un inhibiteur de l'action des enzymes DNase ou nucléase préservant l'intégrité de l'ADN et de l'ARN.

II.2.2. Hémolyse du sang

L'hémolyse du sang consiste en l'isolement de leucocytes du sang total par une lyse hypotonique des globules rouges.

Le sang prélevé est divisé en deux tubes, l'un pour l'extraction d'ADN et l'autre pour l'extraction d'ARN, ensuite, ils sont traités de la même façon selon les étapes suivantes :

- ajouter le tampon de lyse 1 (700 µl de tampon de lyse avec 500 µl de sang) ;
- incuber 20 à 30 min à 4°C ;
- centrifuger à 12000 tr/min pendant 15 min à 4°C ;
- éliminer le surnageant et recueillir le culot ;
- ajouter 500 µl de tampon de lyse 1 au culot, bien agiter, vortexer et incuber 20 min à 4°C ;
- centrifuger dans les mêmes conditions que précédemment ;
- éliminer le surnageant et recueillir le culot ;
- effectuer la même opération sur ce culot une autre fois ;
- au dernier lavage le culot doit être bien blanc et débarrassé de toute trace d'hémoglobine ;
- à la fin, laisser les tubes sécher 5 min à température ambiante.

Le culot obtenu des leucocytes sera utilisé pour l'extraction de l'ADN et de l'ARN.

II. Partie Expérimentale

II.2.3. Recherche des transcrits du gène chimère Bcr-Abl

Pour détecter la présence des transcrits du gène chimère Bcr-Abl, nous avons procédé à l'extraction des ARN totaux au TRIzol suivie par une RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction), (Fig. 16) qui comporte deux étapes :

- une première étape de rétrotranscription, où l'ARN est transformé en ADN complémentaire (ADNc) beaucoup plus stable ;
- une deuxième étape de PCR, où l'ADNc correspondant au gène cible est amplifié.

Après amplification, les produits de PCR ont été contrôlés par une électrophorèse sur gel d'agarose à 3 % afin d'évaluer les paramètres de l'amplification.

II.2.3.1. Extraction des ARN totaux au TRIzol

- Reprendre le culot cellulaire dans 300 µl de TRIzol : 1 ml de TRIzol pour 50 à 100 mg de culot cellulaire. Il faut bien agiter par pipetage en va et vient ;
- Incuber 5 min à température ambiante ;
- Ajouter 70 µl de chloroforme ;
- Agiter vigoureusement par inversion de 15 sec à 3 min ;
- Incuber à température ambiante 3 min ;
- Centrifuger le tube à 12000 tr/min pendant 15 min à 4°C ;

Après centrifugation, on obtient 2 phases, bien séparées, une phase inférieure, contenant le phénol chloroforme, et une autre phase supérieure, aqueuse, contenant l'ARN extrait (environ 200 µl).

- Récupérer la phase aqueuse dans un nouveau tube sans prélever l'anneau de la zone à l'interface ;
- Rajouter 160 µl d'isopropanol ;
- Centrifuger le tube à 12000 tr/min pendant 15 min à 4°C ;
- Enlever le surnageant ;
- Laver le culot avec 300 µl d'éthanol 70 % (1 ml d'éthanol pour 1 ml de TRIzol) ;
- Vortexer et centrifuger 12000 tr/min pendant 15 min à température ambiante ;
- Enlever le surnageant par inversion et laisser sécher à température ambiante ;
- Reprendre le culot dans 35 µl d'H₂O bidistillée ;
- Incuber 10 min à 55-60°C ;
- Séparer 2 à 4 µl de solution d'ARN pour le dosage par spectrophotométrie ;

II. Partie Expérimentale

- Aliquoter le reste de la solution d'ARN et congeler à -20°C , puis à -80°C (solution de stockage).

II.2.3.2. Détermination de la pureté et de la concentration d'ARN

Les acides nucléiques ont un spectre d'absorption maximum en U.V à 260 nm. Cette absorption est proportionnelle à la concentration des acides nucléiques (ADN et ARN). La mesure de la densité optique de chaque échantillon à 260 nm et 280 nm a été effectuée. Le rapport $\text{DO}_{260\text{nm}}/\text{DO}_{280\text{nm}}$ doit être compris entre 1.8 et 2, afin de pouvoir estimer le degré de pureté de l'ARN.

L'intégrité de l'ARN a été évaluée par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 %, après coloration au BET et visualisation des différentes sous-unités (18S, 28S) sous U.V.

La densité optique à 260 nm permet de calculer la concentration de l'ARN, sachant que :

- 1 unité de $\text{DO}_{260\text{nm}} = 40 \mu\text{g/ml}$ d'ARN ;
- l'ARN obtenu est dilué à 1/250.

$$[\text{C}] \text{ de l'ARN } (\mu\text{g/ml}) = \text{facteur de dilution (250)} \times \text{DO}_{260} \times 40 \mu\text{g/ml.}$$

II. Partie Expérimentale

II.2.3.3. RT-PCR

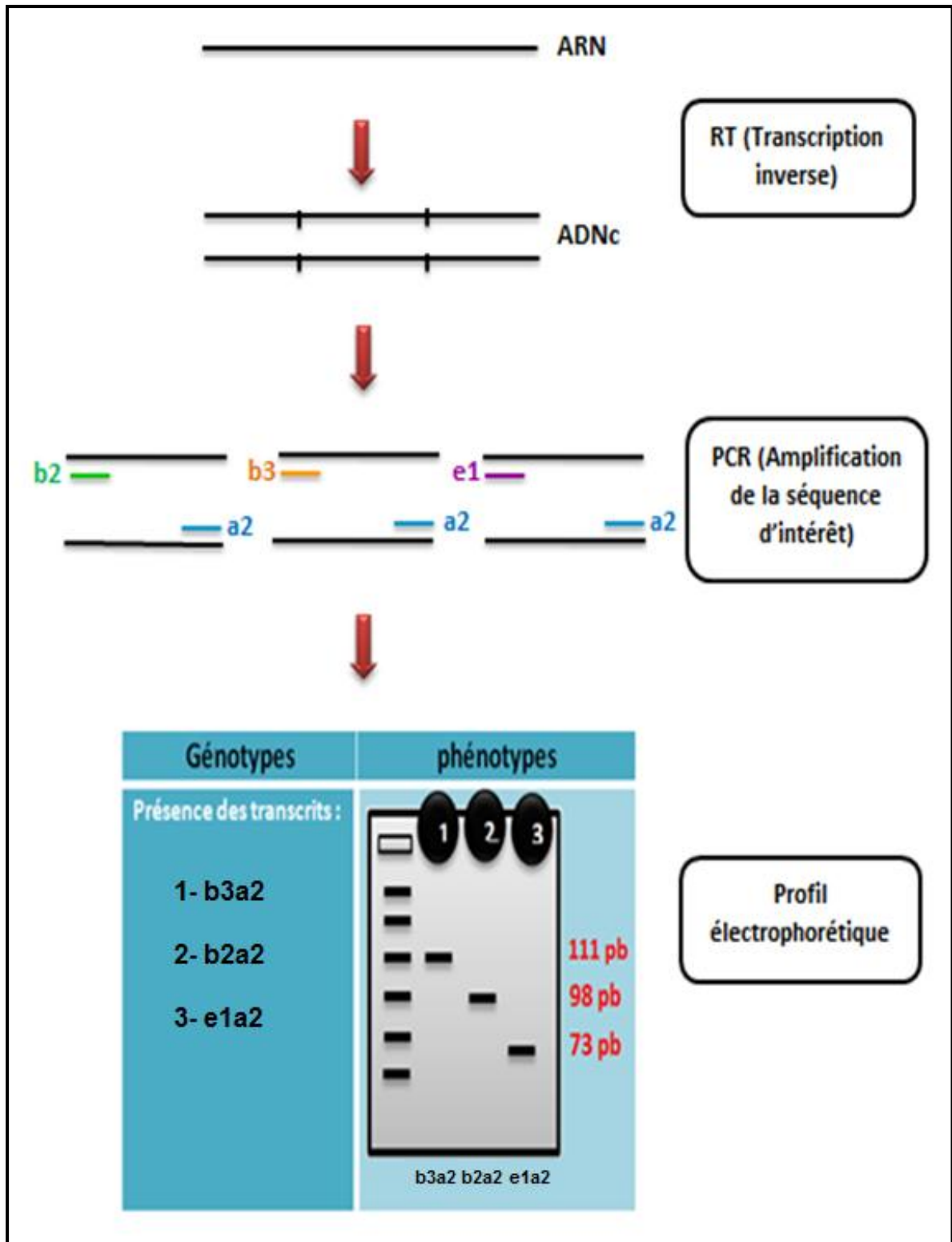


Figure 16. Illustration schématique des étapes de la RT-PCR.

II. Partie Expérimentale

II.2.3.3.1. Synthèse d'ADN complémentaire

Dans un tube Eppendorf 0,2 µl de PCR stérile, ajouter :

- volume contenant 1 µg d'ARN ;
- 1,5 µl d'oligo (dT) ;
- 1,5 µl d'hexamère ;
- 4 µl de mix dNTP ;
- H₂O bidistillée qsp 14 µl.

Chauffer le mix pendant 3-5 minutes à 65-80°C. Centrifuger brièvement et placer rapidement dans la glace.

Rajouter :

- 4 µl de RT 5X ;
- 1 µl d'inhibiteur de la RNase ;
- 1 µl de transcriptase inverse M-MuLV.

On obtient un volume final de 20 µl, puis :

- incuber à 42°C pendant 1 H ;
- inactiver l'enzyme à 90°C pendant 10 min ;
- diluer la solution d'ADNc obtenue à 1/30 ;
- stocker les produits à -20°C ou passer directement à l'étape suivante d'amplification par PCR.

II.2.3.3.2. Amplification par PCR

Cette technique permet d'amplifier *in vitro* les régions cibles dans l'ADNc à l'aide d'un thermocycleur en quantité suffisante afin de réaliser toutes les analyses prévues. Les amorces utilisées ont été choisies pour délimiter et amplifier les régions b2a2, b3a2 et e1a2 (Tableau II). La spécificité de ces amorces a été préalablement validée par une étude antérieure (87), c'est-à-dire que l'amplification ne donne qu'une seule bande de taille attendue pour chaque amplicon.

II. Partie Expérimentale

Tableau II. Amorces sens et antisens choisies et les longueurs des fragments obtenus pour le gène chimère Bcr-Abl (79).

Séquence des amorces (5'→3')				Longueur du fragment
Sens		Antisens		
b3	ATCCGTGGAGCTGCAGATG	a2	TCAGATGCTACTGGCCGCT GAA	111 pb
b2	GAGTCTCCGGGGCTCTATGG			98 pb
e1	AGATCTGGCCCAACGATGGC GA			73 pb

Le mélange réactionnel a été réalisé dans un volume final de 25 µl contenant :

- 4 µl d'ADNc
- 0,5 µl de mix dNTP
- 3 µl de tampon de PCR
- 0,2 µl de *Taq* polymérase
- 1,5 µl d'amorce sens
- 1,5 µl d'amorce antisens
- 14,3 µl d'H₂O bidistillée

La quantité de chaque composant est multipliée par le nombre d'échantillons à amplifier. Un témoin négatif est inclus dans chaque série de PCR et qui ne comporte que H₂O à la place de l'ADNc.

Les conditions d'amplification par PCR sont présentées dans le Tableau III.

Tableau III. Programme d'amplification par PCR des fragments d'ADNc obtenus.

Nombre de Cycles	Étape	Température (°C)	Durée
	Dénaturation initiale	95	10 min
x 40	Dénaturation	95	30 sec
	Hybridation	62	1 min
	Elongation	72	1 min
	Elongation finale	72	10 min

II. Partie Expérimentale

Les produits de PCR obtenus sont contrôlés par une électrophorèse sur gel d'agarose (3 %) préalablement préparé en présence du tampon de migration TAE 1X.

Dans chaque puits du gel, la préparation à déposer comporte :

- 10 µl de produit d'amplification + 4 µl de bleu de bromophénol ;
- 3 µl de marqueur de taille (1 Kb DNA Ladder).

Les dépôts se font du côté cathode (-). Le système soumis à une migration sous un courant initial de 30 volts pendant 10 min évoluant à 100 volts pendant une demi-heure.

La visualisation des produits amplifiés a été réalisée sous U.V à la suite d'une coloration au BET. Le résultat est concrétisé par une prise de photo du gel contenant les bandes visualisées.

Cette analyse permet aussi de déceler si une éventuelle contamination de l'ADNc est survenue au cours de la PCR ou d'autres amplifications non spécifiques.

II.2.4. Recherche de la mutation C677T du gène Mthfr

Pour détecter la présence de la mutation C677T du gène Mthfr, on a réalisé l'extraction de l'ADN génomique à partir du culot leucocytaire obtenu après hémolyse, puis une technique de PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) a été appliquée. Cette technique comporte les étapes suivantes :

- amplification par PCR de la séquence d'intérêt (séquence porteuse du site de la mutation C677T) ;
- digestion des produits de PCR par l'enzyme de restriction *Hinf*I ;
- séparation des produits de digestion par migration électrophorétique sur un gel d'agarose et caractérisation des différents génotypes.

II. Partie Expérimentale

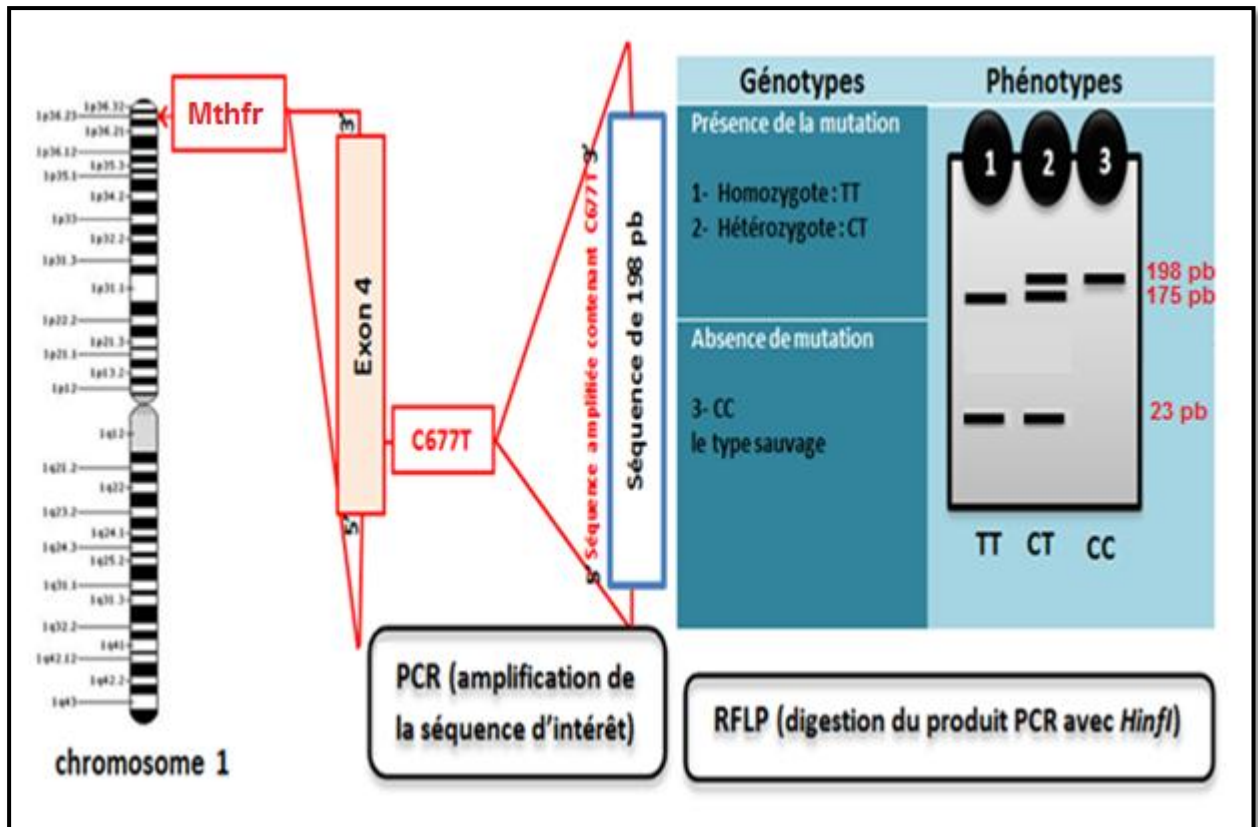


Figure 17. Stratégie expérimentale illustrant l'étude du profil RFLP pour la mutation C677T du gène Mthfr.

II.2.4.1. Extraction de l'ADN

Il existe plusieurs techniques utilisées pour l'extraction d'ADN, celle employée dans notre étude est la technique au NaCl (6 M), comme suit :

- ajouter au culot 315 μ l de tampon de lyse 2, vortexer avant de le transférer dans un nouveau tube Eppendorf 1,5 ml ;
- ajouter 5 μ l de la protéinase K à 20 mg/ml (la protéinase K va dégrader les protéines de la membrane cellulaire) ;
- incuber à 55°C pendant 1 h 30 en vortexant les tubes chaque 5 min ;
- ajouter 100 μ l de NaCl 6 M : le rôle de NaCl est de précipiter les protéines ;
- vortexer chaque échantillon pendant 6 min ;
- centrifuger le tube à 12000 tr/min pendant 10 min à température ambiante ;
- pipeter 250 μ l du surnageant (fraction contenant l'ADN) et le mettre dans un nouveau tube Eppendorf 1,5 ml ;
- ajouter 250 μ l d'isopropanol (pour précipiter l'ADN), mélanger délicatement la solution ;

II. Partie Expérimentale

- centrifuger le tube à 12000 tr/min pendant 10 min à température ambiante ;
- éliminer l'isopropanol ;
- laver l'échantillon avec 300 µl d'éthanol 70 % ;
- centrifuger pendant quelque secondes à température ambiante ;
- éliminer complètement l'éthanol ;
- sécher 3 à 5 min à température ambiante ;
- reprendre le culot dans 52 µl d'H₂O bidistillée ;
- Incuber 10 min à 55-60°C ;
- séparer 2 à 4 µl de solution d'ADN pour le dosage par spectrophotométrie ;
- aliquoter le reste de la solution d'ADN en 10 µl/tube et conserver à -20°C.

II.2.4.2. Détermination de la pureté et de la concentration d'ADN

La mesure de la DO de l'ADN à 260 nm et 280 nm a été effectuée. Le rapport DO_{260nm}/DO_{280nm} doit être compris entre 1.8 et 2, afin de pouvoir estimer le degré de pureté de l'ADN.

L'intégrité de l'ADN a été vérifiée par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 % avec une coloration au BET.

La concentration de l'ADN (sachant que 1 unité de $DO_{260nm} = 50 \mu\text{g/ml}$ d'ADN double brin) a été déduite grâce au calcul suivant :

$$[C] \text{ de l'ADN } (\mu\text{g/ml}) = \text{facteur de dilution (250)} \times DO_{260} \times 50 \mu\text{g/ml.}$$

II. Partie Expérimentale

II.2.4.3. PCR-RFLP

II.2.4.3.1. PCR

Les amorces utilisées ont été choisies pour délimiter et amplifier une séquence dans l'exon 4 du gène Mthfr (Tableau IV), contenant la mutation C677T. Les validations ont été réalisées *in silico* en réalisant une comparaison avec les données disponibles sur le site NCBI (Annexe 2).

Tableau IV. Amorce sens et antisens choisies et la longueur du fragment obtenu pour le gène Mthfr.

Séquence des amorces (5'→3')		Longueur du fragment
Sens	TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGG	198 pb
Antisens	AGGACGGTGCGGTGAGAGTG	

Le mélange réactionnel a été réalisé dans un volume final de 25 µl, comme suite :

- volume contenant 100 ng d'ADN ;
- 0,5 µl de mix dNTP ;
- 3 µl de tampon de PCR ;
- 0,2 µl de Taq polymérase ;
- 1,5 µl d'amorce sens ;
- 1,5 µl d'amorce antisens ;
- H₂O bidistillée qsp 25 µl.

La quantité de chaque composant est multipliée par le nombre d'échantillons à amplifier. Un témoin négatif est inclus dans chaque série de PCR.

Les conditions d'amplification par PCR sont présentées dans le Tableau V.

II. Partie Expérimentale

Tableau V. Programme d'amplification du fragment (198 pb) du gène Mthfr.

Nombre de Cycles	Étape	Température (°C)	Durée
	Dénaturation initiale	94	5 min
x 30	Dénaturation	94	30 sec
	Hybridation	66	1 min
	Elongation	72	1 min
	Elongation finale	72	10 min

La qualité des produits de PCR obtenus est contrôlée par une électrophorèse sur gel d'agarose (1.5 %). Après coloration au BET, les bandes sont visualisées sous U.V, et leurs tailles sont estimées par rapport au standard de poids moléculaire.

Dans chaque puits du gel, la préparation à déposer comporte :

- 10 µl de produit d'amplification + 4 µl de bleu de bromophénol ;
- 3 µl de marqueur de taille (1 Kb DNA Ladder).

Le système est soumis à une migration sous un courant initial de 30 volts pendant 10 min évoluant à 100 volts pendant une demi-heure.

La visualisation des produits amplifiés a été réalisée sous U.V. La séquence amplifiée de taille 198 pb a été visualisée après coloration au BET.

II.2.4.3.2. Digestion des produits de PCR par l'endonucléase de restriction

L'ADN est soumis à une digestion enzymatique clivant la molécule à des endroits précis appelés sites de restriction.

La mutation C677T crée un site de reconnaissance pour l'enzyme de restriction *Hinf* I. Cette modification de l'ADN est détectée par une variation du nombre et de la longueur des fragments de restriction obtenus après digestion enzymatique (Fig. 18).

II. Partie Expérimentale

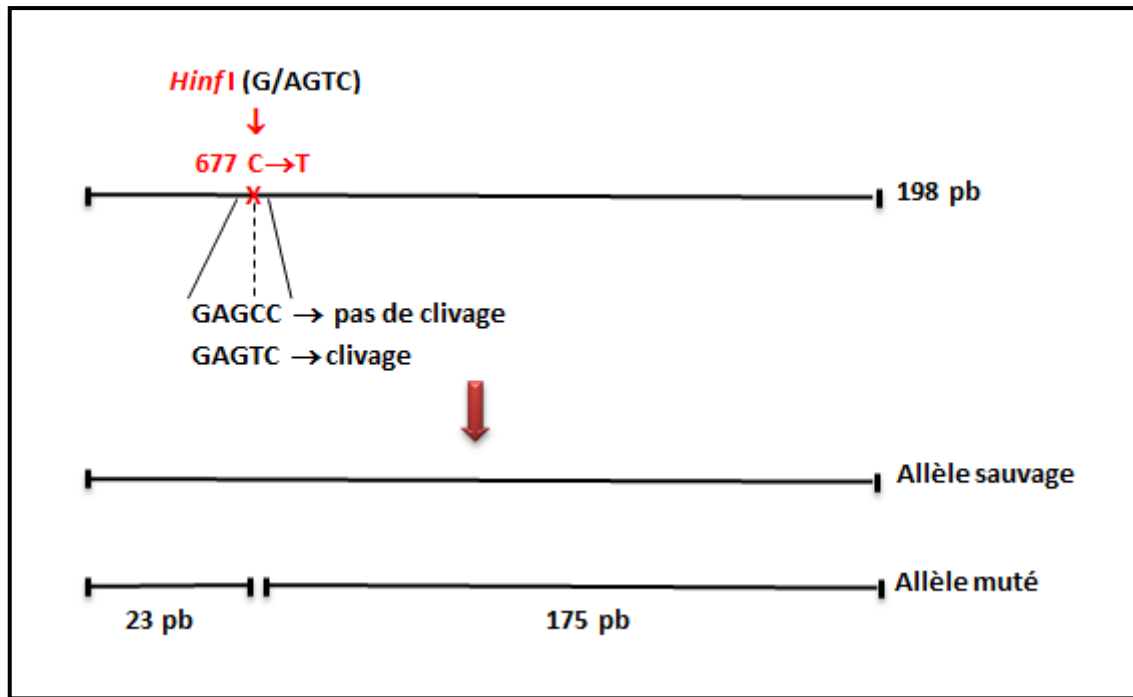


Figure 18. Site de restriction de l'enzyme *Hinf* I et les fragments obtenus après la digestion.

Le mélange réactionnel de la digestion a été réalisé dans un volume final de 20 μ l contenant :

- 10 μ l d'ADN (produit de PCR) ;
- 3 μ l de l'enzyme *Hinf* I ;
- 6 μ l de tampon de l'enzyme *Hinf* I ;
- H₂O bidistillée qsp 20 μ l.

Les tubes sont ensuite incubés pendant une nuit dans un bain marie à 37°C.

II.2.4.3.3. Electrophorèse des produits digérés

À la fin de la digestion, la migration et la visualisation des fragments de restriction obtenus ont été effectuées dans les mêmes conditions que celles des produits PCR. Cependant, la petite taille des fragments de restriction générés a nécessité la préparation d'un gel d'agarose plus résolutif (agarose à 4 %) et un temps de migration plus long afin de bien séparer les fragments digérés.

II. Partie Expérimentale

II.3. Résultats

II.3.1. Caractéristiques de la population étudiée

Tableau VI. Sexe, effectifs et âge moyen des cas analysés.

	Témoins sains		LMC	
	M	F	M	F
Sexe				
Effectifs	6	5	11	7
Age moyen (ans)	24	33	50	45

Notre étude a été démarrée par 30 patients et 11 témoins sains, cependant l'analyse moléculaire n'a été appliquée que sur 18 patients et 11 témoins. Les acides nucléiques des 12 autres patients n'étaient pas exploitables vu la qualité du sang prélevé ainsi que la quantité, qui était très insuffisante. Une continuité de ce travail est envisageable par une augmentation du nombre d'échantillons dans les deux types de population.

II.3.2. Résultats de la technique RT-PCR

- Amplification des transcrits du gène chimère Bcr-Abl

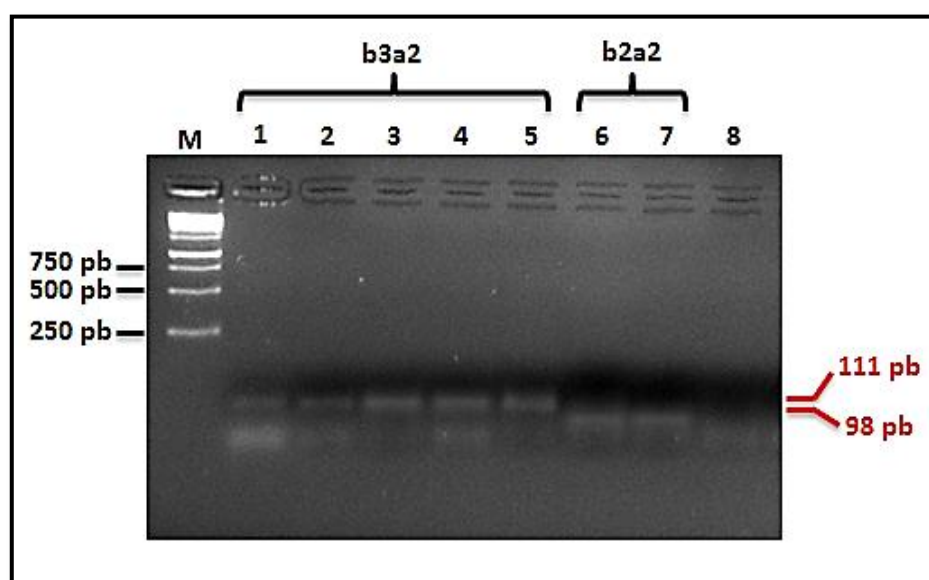


Figure 19. Photographie du profil électrophorétique présentant les différents transcrits du gène chimère Bcr-Abl. Ce profil est obtenu après électrophorèse sur gel d'agarose à 3 % suivie d'une coloration au BET et visualisation sous U.V.

M : marqueur de poids moléculaire ; ligne 1, 2, 3, 4, et 5 : bandes de 111 pb, correspondant au transcrite b3a2 ; ligne 6 et 7 : bandes de 98 pb, correspond au transcrite b2a2 ; ligne 8 : témoin négatif.

II. Partie Expérimentale

- Distribution des transcrits du gène chimère Bcr-Abl

Tableau VII. Distribution des transcrits du gène chimère Bcr-Abl chez la population LMC.

Type de transcrit	N	%
b2a2	2	11
b3a2	10	55,6
e1a2	0	0
b2a2+b3a2	1	5,6
Pas de transcrits	5	27,8
Total	18	100

N : Nombre de cas

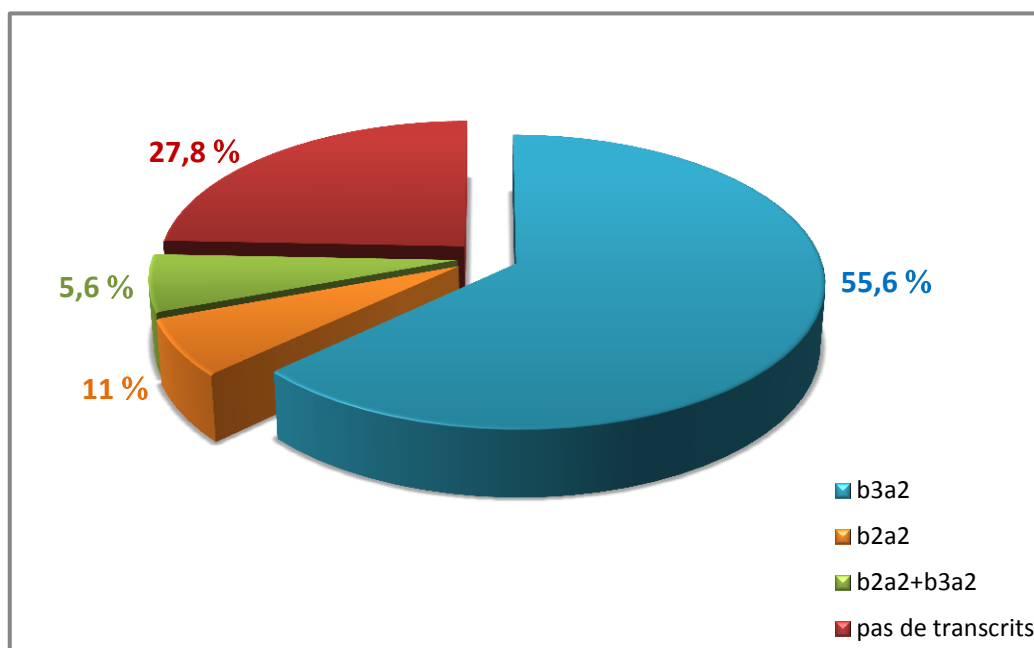


Figure 20. Répartition des transcrits du gène chimère Bcr-Abl chez la population LMC.

II. Partie Expérimentale

II.3.3. Résultats obtenus après une PCR-RFLP

- Profil électrophorétique du gène Mthfr

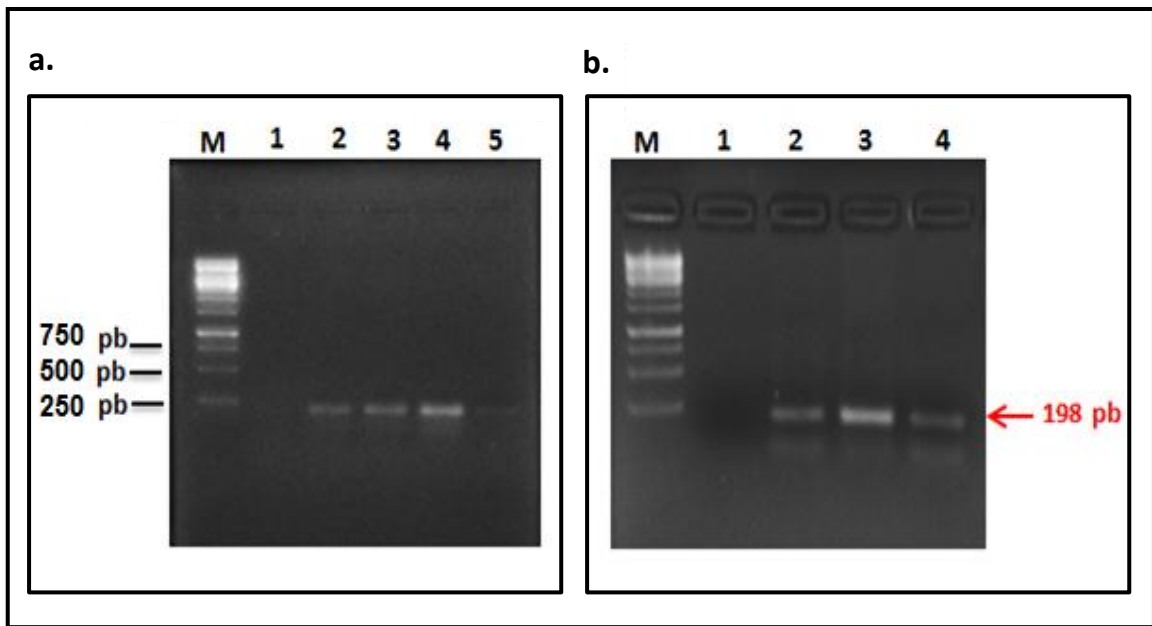


Figure 21. Photographie du profil électrophorétique de la séquence du gène Mthfr amplifiée par PCR sur gel d'agarose à 1,5 %. **a.** Profil électrophorétique de la séquence du gène Mthfr des témoins sains.

M : marqueur de poids moléculaire ; ligne 1 : témoin négatif ; ligne 2, 3, 4 et 5 : bandes de 198 pb.
b. Profil électrophorétique de la séquence du gène Mthfr chez la population malade. Ligne 1 : témoin négatif ; ligne 2, 3 et 4 : bandes de 198 pb.

II. Partie Expérimentale

- Profil RFLP obtenu

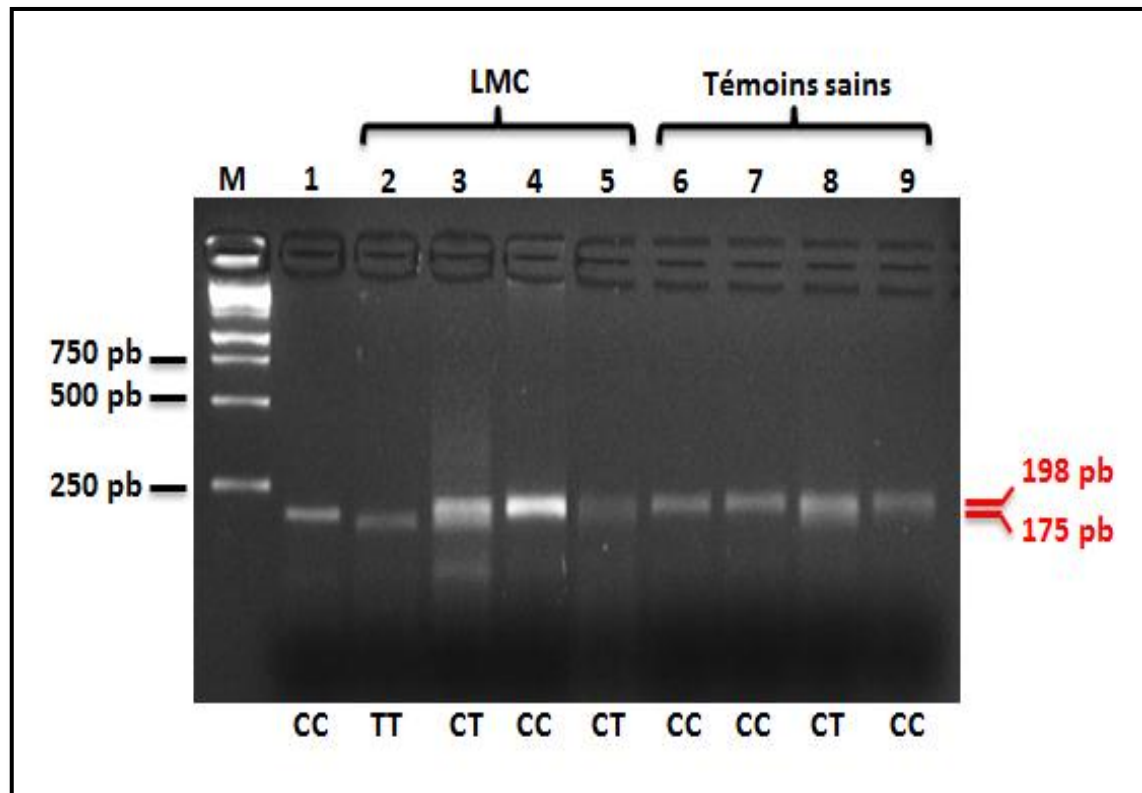


Figure 22. Photographie du profil RFLP obtenu chez les populations malade et témoin. Ce profil est obtenu après électrophorèse sur gel d'agarose à 4 % suivie d'une coloration au BET et visualisation sous U.V.

M : marqueur de poids moléculaire ; ligne 1 : témoin positif (une bande de 198 non digérée) ; ligne 2 : bande de 175 pb (homozygote muté) ; ligne 3, 5 et 8 : deux bandes superposées, de 198 pb et de 175 pb (hétérozygote sauvage CT) ; ligne 4, 6, 7 et 9 : bandes de 198 pb (homozygote sauvage CC).

II. Partie Expérimentale

- Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme C677T

Notre analyse moléculaire a permis de mettre en évidence la mutation C677T du gène Mthfr et les fréquences génotypiques et alléliques des différentes formes dans l'ensemble de nos échantillons.

Tableau VIII. Fréquences génotypiques et alléliques du polymorphisme C677T.

		Témoins		LMC	
		N	%	N	%
Génotype	CC	10	90,9	15	83,33
	CT	1	9,1	2	11,11
	TT	0	0,0	1	5,55
	Total	11	100	18	100
Allèle	C	21	95,45	32	88,88
	T	1	4,55	4	11,11
	Total	22	100	36	100

N : Nombre de cas

II. Partie Expérimentale

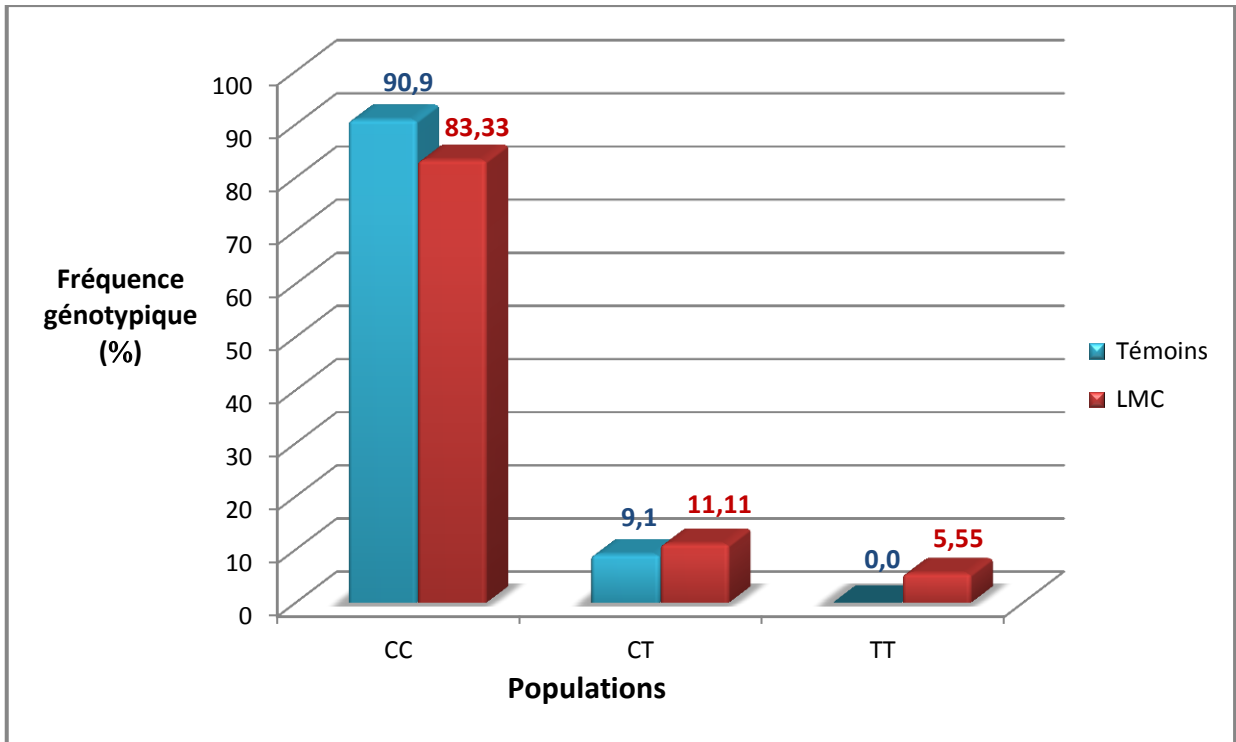


Figure 23. Répartition des fréquences génotypiques du Mthfr chez les populations témoin et LMC.

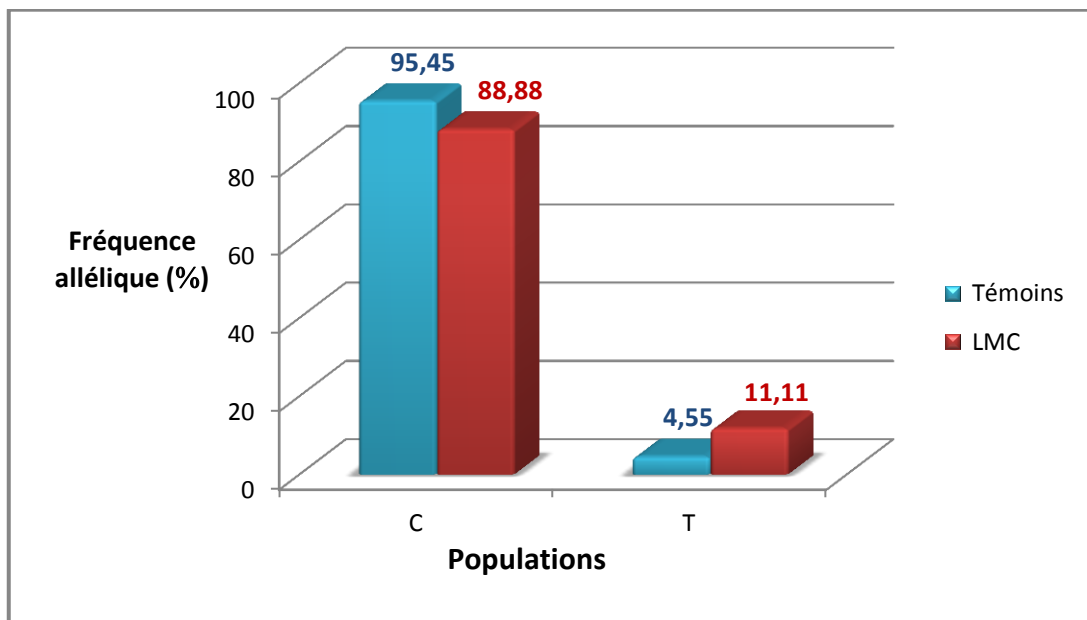


Figure 24. Répartition des fréquences alléliques du Mthfr chez les populations témoin et LMC.

II.4. Discussion

L'objectif de cette étude est la recherche d'anomalies génétiques potentielles, impliquées dans le développement de la LMC, par la mise au point de protocoles sensibles et reproductibles basés sur les techniques de biologie moléculaire, comme la RT-PCR et de PCR-RFLP. Les détections des différents transcrits du gène chimère Bcr-Abl (b2a2, b3a2 et e1a2) ainsi que la mutation C677T du gène Mthfr, chez une population atteinte de LMC, est d'une importance primordiale aussi bien dans le diagnostic que dans la prise en charge thérapeutique des patients atteints. Les résultats obtenus permettront aussi d'établir une association entre ces deux anomalies détectées quant à la progression de la maladie.

II.4.1. Discussion analytique

II.4.1.1. Prélèvement

La fréquence des prélèvements sanguins obtenus, concernant ce type de pathologie, était faible. C'est pour cette raison que le nombre d'échantillons étudiés était conséquent. Ces prélèvements ont été conservés à -80°C au fur et à mesure de leur recueillement auprès du service d'hématologie. Ensuite, ils ont été transférés au laboratoire (Université de Biskra) en vue de l'extraction d'ADN et d'ARN. Lors du transfert, nous avons beaucoup veillé à la non rupture du cycle thermique de conservation.

II.4.1.2 Hémolysé et extraction des acides nucléiques

Lors des étapes d'hémolyse et d'extraction de l'ADN et de l'ARN, tous les protocoles ont été scrupuleusement respectés en faveur d'obtenir un rendement optimal en ADN et en ARN.

II. Partie Expérimentale

II.4.1.3 Optimisation des techniques d'analyses

En premier lieu, nous avons vérifié l'intégrité de l'ARN et de l'ADN.

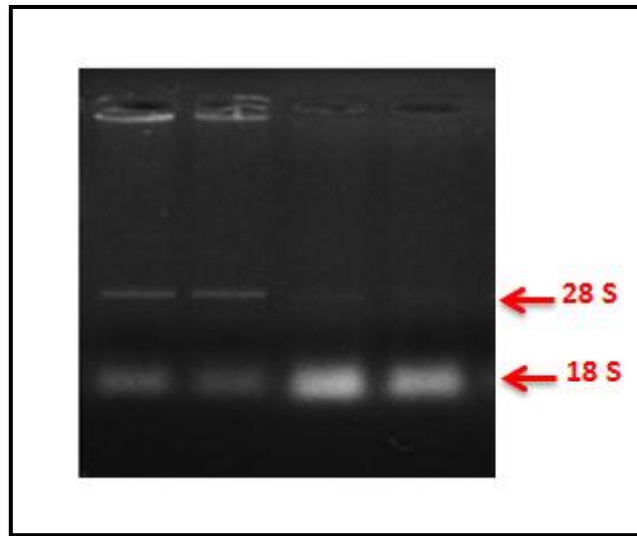


Figure 25. Photographie d'un exemple de profil électrophorétique montrant l'intégrité des ARN totaux étudiés. Ce profil est obtenu après électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % et coloration au BET et visualisation sous U.V. Les bandes représentant les différentes sous unités de l'ARN ribosomique sont représentées.

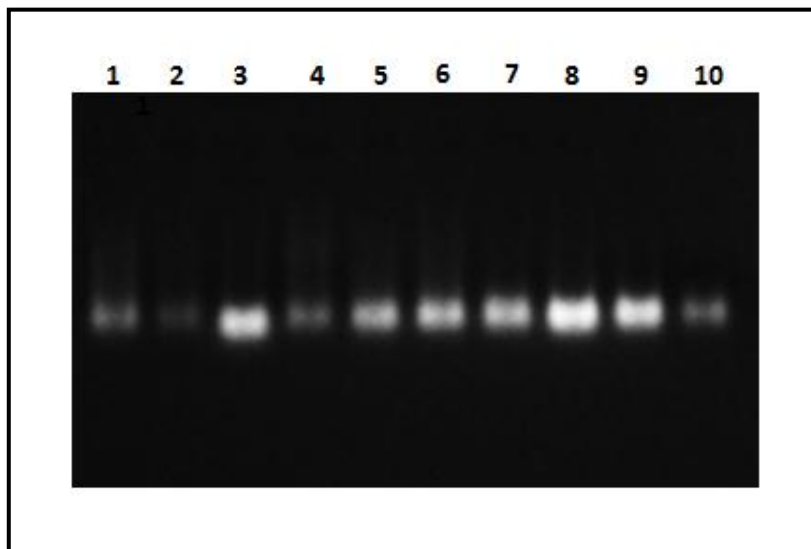


Figure 26. Photographie d'un exemple de profil électrophorétique montrant l'intégrité des ADN de certains patients étudiés. Ce profil est obtenu après électrophorèse sur gel d'agarose à 1 % suivie d'une coloration au BET et visualisation sous U.V.

II.4.1.3.1. RT-PCR

- Programme d'amplification

Nous avons utilisé un programme de PCR pour le gène chimère Bcr-Abl qui a permis d'amplifier le maximum de fragments (Tableau III).

Les amorces et la température d'hybridation utilisées dans la PCR ont été adoptées selon Bock O. et al. 2006.

Le nombre de cycles a été optimisé à 40 cycles selon l'intensité du signal obtenue.

- Faux positifs et faux négatifs

Le contrôle de la qualité d'ARN sur gel d'agarose, après extraction, a permis de résoudre le problème des faux négatifs, qui peut être dû à une dégradation des ARN totaux ou à une mauvaise transcription inverse. Afin d'éviter le problème des faux positifs, toutes les solutions ont été préparées avec RNase-free avant la réaction de transcription inverse.

- Intensité des bandes

Les bandes d'ADNc correspondant aux transcrits du gène chimère Bcr-Abl (Fig. 19), n'ont pas le même signal à cause d'une mauvaise mesure d'absorbance. Nous avons essayé de réaliser la mesure à partir de différents spectrophotomètres mais le problème n'a pas été résolu, ce qui explique la discontinuité du signal.

II.4.1.3.2. PCR- RFLP

- Choix des amorces

Les amorces utilisées pour l'amplification de la séquence du gène Mthfr, qui porte la mutation C677T, ont été choisies selon les références (3, 11, 63) et validées *in silico* (Annexe 2).

- Programme d'amplification

L'amplification a été réalisée à l'aide d'un programme standard de PCR (Tableau V), et afin de choisir la bonne température d'hybridation des amorces, une série de PCR a été optimisée dans un intervalle de température situé entre 60°C et 66°C (60°C, 62°C, 64°C et 66°C). Le programme correspondant à la température 66°C a donné la bonne intensité du signal d'amplification par PCR (Fig. 27).

II. Partie Expérimentale

Les produits amplifiés par PCR, ont permis l'obtention d'une bande cible individualisée et bien différenciée après détection sous U.V lors de l'électrophorèse contrôle. Une absence d'amplification de bandes non spécifiques était régulièrement observée.

- Digestion enzymatique

La création du site de clivage pour l'endonucléase de restriction *Hinf* I, en cas de présence de la mutation C677T, a été confirmée *in silico* (Annexe 3).

Les conditions de digestion ont été modifiées afin de permettre une bonne interprétation des résultats.

La digestion a été initialement réalisée dans un temps d'incubation de 4 h et les produits de digestion ont été migrés dans un gel d'agarose à 3 %. Les résultats de la digestion sont présentés dans la figure 28.

D'après les résultats du profil de la figure 28, tous les échantillons migrés sont de type homozygote sauvage (CC). Afin de confirmer ces résultats, une deuxième digestion, des mêmes échantillons, a été réalisée dans un temps d'incubation plus long (une nuit) et une migration dans un gel plus résolutif (agarose à 4 %) afin d'éviter les digestions incomplètes et, lorsqu'il y a une digestion, de pouvoir séparer les bandes de tailles très proches. Les résultats de la deuxième digestion sont présentés dans la figure 22. Les différents génotypes ont été trouvés (CC, CT, TT).

II. Partie Expérimentale

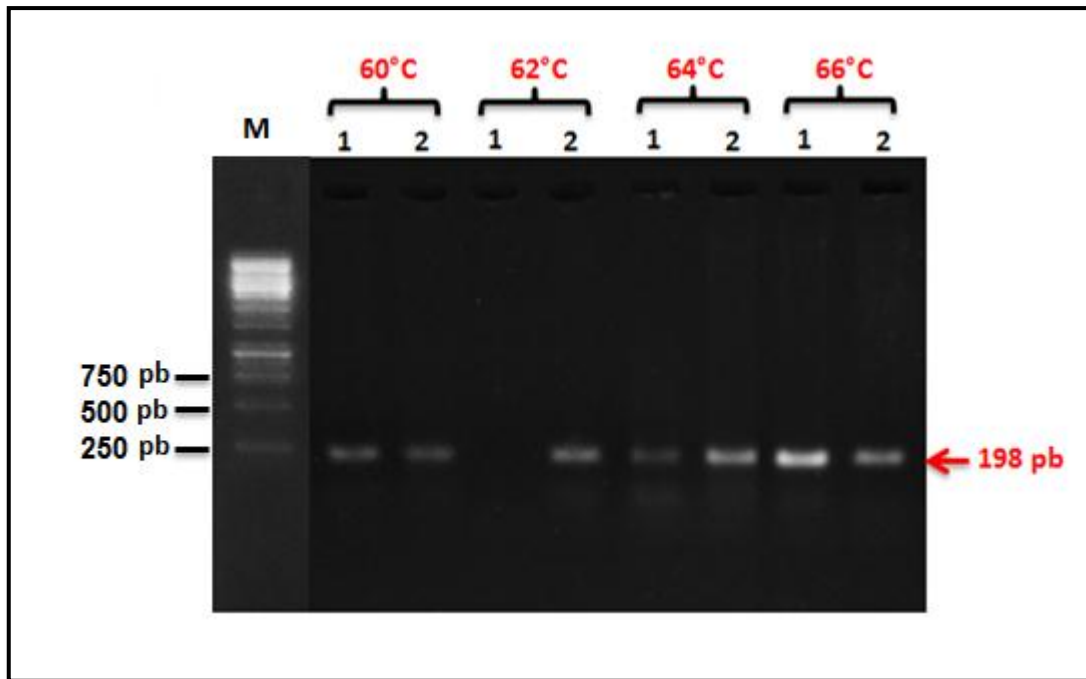


Figure 27. Photographie du profil électrophorétique présentant le choix adéquat de la température d'hybridation pour les amorces de la séquence du gène *Mthfr*. Ce profil est obtenu après électrophorèse sur gel d'agarose à 1,5 % suivie d'une coloration au BET et visualisation sous U.V.

M : marqueur de poids moléculaire ; ligne 1 et 2 : bande de 198 pb.

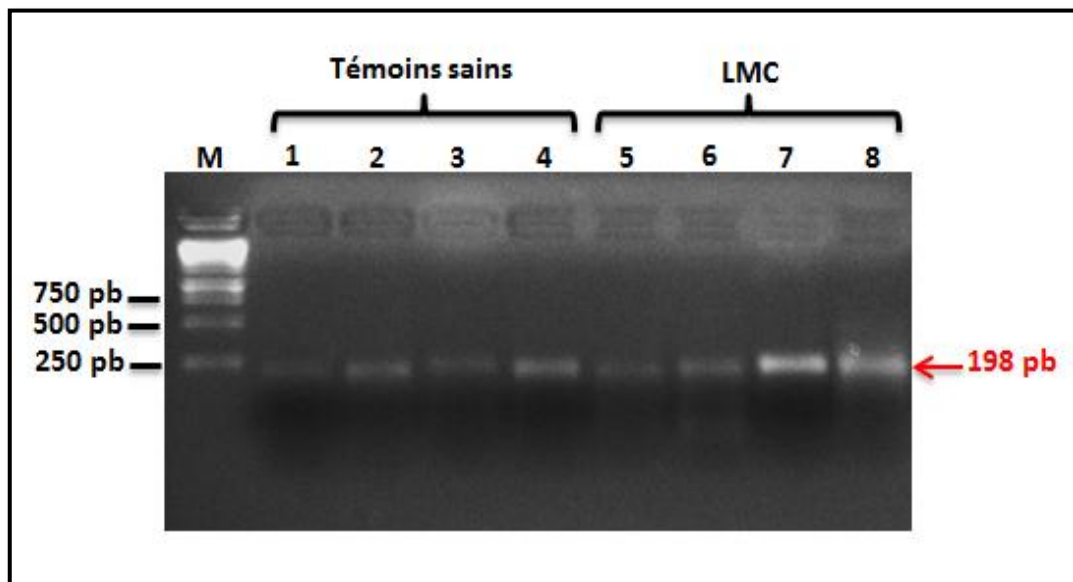


Figure 28. Photographie du profil RFLP obtenu sur gel d'agarose à 3 % suivie d'une coloration au BET et visualisation sous U.V.

M : marqueur de poids moléculaire ; lignes 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8 : bande de 198 pb.

II.4.2. Discussion des résultats

II.4.2.1. RT-PCR

La RT-PCR est une technique très sensible ($1/10^6$ cellules) par rapport à la cytogénétique (sensibilité de 1 à 3 % environ). Elle permet une recherche rapide et sensible du réarrangement Bcr-Abl dans le sang des patients suspectés de LMC en parallèle - ou même avant - la réalisation du myélogramme avec le caryotype (80).

Deux facteurs peuvent limiter la technique de RT-PCR, qui sont, la précarité du matériel de départ (ARNm) et que l'application de cette technique nécessite la présence d'un marqueur moléculaire dans la pathologie étudiée.

La configuration moléculaire de la jonction Bcr-Abl, détectée au sein de l'ARNm de nos patients, est de type : b2a2 et b3a2. Nous avons remarqué la prédominance du transcrit b3a2, ce qui convient avec l'étude de El Andaloussi A *et al.* (2004) (81) et Leguay T *et al.* (2005) (9). Le transcrit e1a2 n'a pas été détecté, il a été observé associé principalement à la LAL.

Chez certains patients, aucun transcrit n'a été détecté. Ce résultat pourrait être expliqué par une rémission moléculaire potentielle chez ces patients.

Afin de suivre la présence des transcrits, le sang de l'un de nos patients, qui présente le transcrit b3a2, a été prélevé après un mois sous traitements par l'imatinib mésylate est le résultat de la RT-PCR sur ce patient était positive (présence du transcrit b3a2), ce qui pourrait être justifié par la présence d'une résistance au traitement à l'imatinib.

L'importance de la technique de RT-PCR dans la LMC représente, d'une part, un outil indispensable dans la confirmation du diagnostic par la détection des transcrits du gène chimère Bcr-Abl et, d'autre part, le choix adéquat de la thérapeutique appliquée sur le malade. Cependant, la limite du suivi de la maladie est que la détection à une échelle moléculaire est qualitative, pendant que, dans le cadre du suivi de la maladie résiduelle, il est nécessaire de réaliser une PCR quantitative, qui consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle (en temps réel) grâce à un marqueur fluorescent. Elle permet, par son principe, de réaliser des mesures quantitatives, malheureusement, cette technique nécessite un thermocycleur spécifique avec des réactifs très chers.

II. Partie Expérimentale

II.4.2.2. PCR-RFLP

Seuls très peu d'études ont abordé la relation entre les génotypes de la MTHFR et le risque de la LMC, mais leurs résultats ne sont pas seulement incohérent, mais parfois aussi contradictoires, même si elles ont été réalisées au sein de la même ethnie (82, 83).

Une activité réduite de la MTHFR peut diminuer la méthylation de l'Hcy en Met et, par retour, le niveau de SAM, résultant en une hypométhylation des régions promotrices de l'ADN (84). Il est également reconnu que la SAH fonctionne comme un inhibiteur de produit puissant des méthyltransférases SAM-dépendantes. Des élévations modérées de la concentration d'homocystéine plasmatique ont été signalées être associées à une concentration accrue de SAH, mais pas de SAM et la concentration de SAH a été associée à une hypométhylation globale de l'ADN (85). Une étude réalisée par Roman-Gomez J *et al.* (2005) a montré qu'une hypométhylation au niveau du promoteur de l'élément transposable LINE-1 active leur transcription et que cet évènement est fréquemment associé à l'évolution de la LMC au stade avancé (86).

D'autre part, Gnani A *et al.* (2007) ont suggéré que la diminution de l'activité de l'enzyme associée à la présence du génotype 677T peut entraîner une augmentation de la stabilité de l'ADN (en réduisant la misincorporation d'uracile dans l'ADN, le risque de cassures double brin et des altérations chromosomiques supplémentaires), conduisant à un effet protecteur contre la LMC (87). En outre, la majorité des études cas témoins suggèrent que la disponibilité accrue de 5,10-MTHF peut jouer un rôle protecteur dans la survenue des leucémies lymphoïdes, mais pas pour les leucémies myéloïdes (2, 11). Bien que cette disparité ne soit pas tout à fait claire, il suggère que les différences dans les besoins en folate ou la susceptibilité aux lésions chromosomiques peuvent exister entre les cellules lymphoïdes et myéloïdes (11).

Des études précédentes, sur le polymorphisme C677T du gène *Mthfr*, chez les populations Coréenne (88), Brésilienne (89), Iranienne (63), Serbe (11) et Egyptienne (90) ont relevé qu'il n'y a aucune différence statistique de ce variant entre les sujets sains et malades.

Contrairement à ces résultats, Ismail *et al.* (2009) (91) et Hussian *et al.* (2012) (3) ont rapporté que le génotype homozygote TT a été associé avec 2,8 et 4,5 fois l'augmentation de la LMC en Jordanie et en Inde, respectivement. Ces variations indiquent que l'effet fonctionnel de ce polymorphisme sur la susceptibilité de la LMC est de manière dépendante de la population.

II. Partie Expérimentale

Dans notre étude, tous les types de génotype du polymorphisme C677T ont été détectés dans les populations témoin et malade (CC, CT, TT), ainsi que leurs fréquences ont été calculées (Tableau VIII). Nos résultats ont montré que les fréquences des génotypes CT et TT aussi bien que l'allèle T chez les patients atteints de la LMC ont été significativement élevées par rapport aux témoins (Fig. 23 et 24). Cependant pour asseoir les bases solides d'un nouvel biomarqueur prospective de diagnostic, il serait nécessaire de travailler sur un plus grand nombre de malades, ce qui assurera d'avantage de crédibilité aux résultats obtenus.

*Conclusion et
perspectives*

Conclusion et perspectives

Le but de ce présent travail a été de rechercher d'éventuelles anomalies génétiques affectant certains marqueurs usuels chez des patients atteints de LMC par les techniques de biologie moléculaire. Cette recherche s'est traduite par une optimisation des conditions expérimentales des techniques de biologie moléculaire, RT-PCR et PCR-RFLP, et leur validation sur un échantillonnage étendu de patients atteints de la LMC, afin de détecter aussi bien les différents transcrits du gène chimère Bcr-Abl que la mutation C677T du gène Mthfr, en comparant les profils RFLP des échantillons pathologiques et normaux après digestion par l'enzyme de restriction *Hinf* I.

Les résultats obtenus par RT-PCR, au niveau de notre groupe de patients algériens, montrent la présence de deux types de configuration moléculaire du réarrangement Bcr-Abl, qui sont b2a2 et b3a2 avec prédominance du transcrit b3a2. Nous avons remarqué que les deux types de transcrits peuvent se présenter chez le même patient. Le transcrit e1a2 n'a pas été détecté dans nos échantillons.

L'application de la technique PCR-RFLP, au niveau des populations témoin et malade, a permis de détecter les différents génotypes du polymorphisme C677T du gène Mthfr (CC, CT, TT). Les résultats obtenus ont montré que les fréquences des génotypes CT et TT aussi bien que l'allèle T chez les patients atteints de la LMC ont été significativement élevées par rapport aux témoins.

Pour établir le rôle exact du polymorphisme C677T dans l'occurrence de la LMC, des études complémentaires du profil RFLP, de ce variant, sur un échantillonnage étendu de la population Algérienne, sont nécessaires.

Nous proposons pour la continuité du travail expérimental de :

- valider les techniques d'analyse sur un échantillonnage étendu de patients atteints de la LMC ;
- établir une corrélation statistique fiable entre le polymorphisme C677T et l'occurrence de la LMC ;
- analyser d'autres variants du gène Mthfr, tel que le variant A1298C ainsi l'association entre les différents polymorphismes (étude des haplotypes) ;
- analyser d'autres polymorphismes pour d'autres enzymes impliquées dans le métabolisme des folates.

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

1. Colditz G.A., Sellers T.A., Trapido E. Epidemiology-identifying the causes and preventability of cancer?. *Nat. Rev. Cancer*. 2006 : 6(1), 75-83.
2. Robien K., Ulrich C.M. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and leukemia risk : a HuGE minireview. *Am J Epidemiol*. 2003 : 157, 571-582.
3. Hussain S.R., Naqvi H., Raza S.T., Ahmed F., Babu S.G *et al*. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T genetic polymorphisms and risk of leukaemia among the North Indian population. *Cancer Epidemiology*. 2012 : 36(4), e227-e231.
4. Theml H., Diem H., Haferlach T. Atlas de poche d'hématologie : Diagnostic pratique morphologique et clinique. *Medicine-Science Flammarion*. 2e éd, 2006. 197.
5. Morishima Y., Ogura M., Nishimura M., Yazaki F., Bessho M *et al*. Efficacy and Safety of Imatinib Mesylate for Patients in the First Chronic Phase of Chronic Myeloid Leukemia : Results of a Japanese Phase II Clinical Study. *Int J Hematol*. 2004 : 80(3), 261-266.
6. Altintas A., Cil T., Kilinc I., Kaplan M.A., Ayyildiz O. Central nervous system blastic crisis in chronic myeloid leukemia on imatinib mesylate therapy: a case report. *J Neurooncol*. 2007 : 84, 103-105.
7. Wang L., Zhu K., Zha X., Chen S., Yang L *et al*. Evolution of T-cell clonality in a patient with Ph-negative acute lymphocytic leukemia occurring after interferon and imatinib therapy for Ph-positive chronic myeloid leukemia. *J Hematol Oncol*. 2010 : 3, 14-20.
8. Waller C.F., Fetscher S., Lange W. Treatment-related chronic myelogenous leukemia. *Ann Hematol*. 1999 : 78(8), 341-354.
9. Leguay T., Mahon F.X. Chronic myelogenous leukaemia. *EMC-Hématologie*. 2005 : 2(3), 187-205.
10. Djouadi-Lahlou K., Approche Epidémiologique Des Leucémies Aigües Myéloïdes En Algérie. *Revue d'hématologie*. 2009, 18-20.
11. Jakovljevic K., Malisic E., Cavic M., Radulovic S., Jankovic R. Association between methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism C677T and risk of chronic myeloid leukemia in Serbian population. *Leukemia & Lymphoma*. 2012 : 53(7), 1327-1330.
12. Jaroslav S., Ladislav D., Regina D., Dalibor V. Pretreatment plasma folate modulates the pharmacodynamic effect of high-dose methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin lymphoma: "folate overrescue" concept revisited. *Clinical Chemistry*. 2006 : 52(4), 692-700.
13. Jabbour E., Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2012 Update on diagnosis, monitoring, and management. *Am. J. Hematol*. 2012 : 87(11), 1038-1045.
14. Delannoy A. Leucémie lymphoblastique aiguë Philadelphie-positive. *Hématologie*. 2006 : 12(5), 26-31.
15. Faderl S., Talpaz M., Estrov Z., O'Brien S., Kurzrock R. *et al*. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1999 : 341(3), 164-72.

Références bibliographiques

16. Chomel J.C., Sorel N., Mayeur-Rousse C., Turhan A.G. Myeloproliferative disorders. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*. 2009 : 24(2), 69-85.
17. Kong J.H., Mun Y.C., Kim S., Choi H.S., Kim Y.K *et al.* Polymorphisms of ERCC1 genotype associated with response to imatinib therapy in chronic phase chronic myeloid leukemia. *Int J Hematol*. 2012 : 96(3), 327-333.
18. Sharma P., Kumar L., Mohanty S., Kochupillai V. Response to Imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia patients with variant BCR-ABL fusion transcripts. *Ann Hematol*. 2010 : 89(3), 241-247.
19. Laurent E., Talpaz M., Kantarjian H., Kurzrock R. The BCR Gene and Philadelphia Chromosome-positive Leukemogenesis. *Cancer Res*. 2001 : 61(6), 2343-2355.
20. Goldman J.M., Melo J.V. Chronic Myeloid Leukemia — Advances in Biology and New Approaches to Treatment. *N Engl J Med*. 2003 : 349(15), 1451-1464.
21. Hantschel O., Superti-Furga G. Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 : 5(1), 33-44.
22. Melo J.V., Deininger M.W. Biology of chronic myelogenous leukemia—signaling pathways of initiation and transformation. *Hematol Oncol Clin N Am*. 2004 : 18(3), 545-568.
23. Cilloni D., Saglio G. Molecular Pathways: BCR-ABL. *Clin Cancer Res*. 2012 : 18(4), 929-937.
24. Ninomiya S., Kanemura N., Tsurumi H., Kasahara S., Hara T *et al.* Coexistence of inversion 16 and the Philadelphia chromosome comprising P190 BCR/ABL in chronic myeloid leukemia blast crisis. *Int J Hematol*. 2011 : 93(6), 806-810.
25. Baccarani M., Dreyling M. Chronic myelogenous leukemia: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2009 : 20(4), iv105-iv107.
26. James W., Vardiman M.D. Chronic Myelogenous Leukemia, BCR-ABL1+. *Am J Clin Pathol*. 2009 : 132(2), 250-260.
27. Shaun H., Cuthbert G. Fluorescence in situ hybridization characterization of different cryptic BCR-ABL rearrangements in chronic myeloid leukemia. *Canc Genet Cytogenet*. 2004 : 155(2), 132-137.
28. Baccarani M., Saglio G., Goldman J., Hochhaus A., Simonsson B *et al.* Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2006 : 108(6), 1809-1820.
29. Baccarani M., Dreyling M. Chronic myeloid leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2010 : 21(5), v165-v167.
30. Hehlmann R., Berger U., Hochhaus A. Chronic myeloid leukemia: a model for oncology. *Annals of Hematology*. 2005 : 84(8), 487-497.

Références bibliographiques

31. Dine G., Rehn Y., Brahim S., Ali Ammar A., Gaillard B *et al.* Residual disease in chronic myeloid leukemia. *IMMBIO*. 2013 : 28(4), 201-206.
32. Shane B. Folate status assessment history: implications for measurement of biomarkers in NHANES. *Am J Clin Nutr*. 2011 : 94(1), 337S-342S.
33. Rosenquist T.H. Folate, Homocysteine and the Cardiac Neural Crest. *Developmental Dynamics*. 2013 : 242(3), 201-218.
34. Van der Put N.M., Van Straaten H.W., Trijbels F.J., Blom H.J. Folate, homocysteine and neural tube defects: an overview. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2001 : 226(4), 243-270.
35. Zwicke G.L., Ali Mansoori G., Jeffery C.J. Utilizing the folate receptor for active targeting of cancer nanotherapeutics. *Nano Reviews*. 2012 : 3, 1-11.
36. Tam C., O'Connor D., Koren G. Circulating unmetabolized folic Acid: relationship to folate status and effect of supplementation. *Obstet Gynecol Int*. 2012 : 2012, 1-17.
37. Qiu A., Jansen M., Sakaris A., Min S.H., Chattopadhyay S *et al.* Identification of an Intestinal Folate Transporter and the Molecular Basis for Hereditary Folate Malabsorption. *Cell*. 2006 : 127(5), 917-928.
38. Forges T., Pellanda H., Diligent C., Monnier P., Guéant J.L. Do folates have an impact on fertility?. *Gynecol Obstet Fertil*. 2008 : 36(9), 930-939.
39. Lucock M . Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Mol. Genet. Metab*. 2000 : 71(1-2), 121-138.
40. Shirodaria C., Antoniadis C., Lee J., Jackson C.E., Robson M.D *et al.* Global Improvement of Vascular Function and Redox State with Low-Dose Folic Acid. *Circulation*. 2007 : 115(17), 2262-2270.
41. Sanderson P., McNulty H., Mastroiacovo P., McDowell I.F., Melse-Boonstra A *et al.* Folate Bioavailability: UK Food Standards Agency Workshop Report. *Br. J. Nutr*. 2003 : 90(2), 473-479.
42. Winkels R.M., Brouwer I.A., Siebelink E., Katan M.B., Verhoef P. Bioavailability of food folates is 80% of that of folic acid. *Am J Clin Nutr*. 2007 : 85(2), 465-473.
43. Blom H.J., Shaw G.M., Den Heijer M., Finnell R.H. Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nat Rev Neurosci*. 2006 : 7(9), 724-731.
44. Vavricka S.R., Rogler G. Intestinal absorption and vitamin levels: is a new focus needed?. *Dig Dis*. 2012 : 30(3), 73-80.
45. Demuth K., Drunat S., Paul J.L., Moatti N. Hyperhomocystéinémie et athérosclérose. *Med Sci (Paris)*. 2000 : 16(10), 1081-1090.
46. Blom H.J., Smulders Y. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *J Inher Metab Dis*. 2011 : 34(1), 75-81.

Références bibliographiques

47. Lentz S.R., Haynes W.G. Homocysteine: Is it a clinically important cardiovascular risk factor?. *CCJM*. 2004 : 71(9), 729-734.
48. Gos M., Szpecht-Potocka A. Genetic basis of neural tube defects II. Genes correlated with folate and methionine metabolism. *J. Appl. Genet*. 2002 : 43(4), 511-524.
49. Aneji C.U., Northrup H., Sing Au K. Deep Sequencing Study of the MTHFR Gene to Identify Variants Associated with Myelomeningocele. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2012 : 94(2), 84-90.
50. Pickell L., Wu Q., Wang X.L., Leclerc D., Friedman H *et al*. Targeted insertion of two Mthfr promoters in mice reveals temporal- and tissue-specific regulation. *Mamm Genome*. 2011 : 22(11-12), 635-647.
51. Gaughan D.J., Barbaux S., Kluijtmans L.A., Whitehead A.S. The human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes: genomic organization, mRNA structure and linkage to the CLCN6 gene. *Gene*. 2000 : 257(2), 279-289.
52. Homberger A., Linnebank M., Winter C., Willenbring H., Marquardt T *et al*. Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Eur J of Hum Genet*. 2000 : 8(9), 725-729.
53. Tran P., Leclerc D., Chan M., Pai A., Hiou-Tim F *et al*. Multiple transcription start sites and alternative splicing in the methylenetetrahydrofolate reductase gene result in two enzyme isoforms. *Mamm Genome*. 2002 : 13(9), 483-492.
54. Cicek M.S., Nock N.L., Li L., Conti D.V., Casey G *et al*. Relationship between methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C genotypes and haplotypes and prostate cancer risk and aggressiveness. *Cancer Epidemiol. Biomark*. 2004 : 13 (8), 1331-1336.
55. Yamada K., Chen Z., Rozen R., Matthews R.G. Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 : 98(26), 14853-14858.
56. Sameer A.S., Shah Z.A., Nissar S., Mudassar S., Siddiqi M.A. Risk of colorectal cancer associated with the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism in the Kashmiri population. *Genet. Mol. Res*. 2011 : 10(2), 1200-1210.
57. Igari S., Ohtaki A., Yamanaka Y., Sato Y., Yohda M *et al*. Properties and Crystal Structure of Methylenetetrahydrofolate Reductase from *Thermus thermophilus* HB8. *PLoS ONE*. 2011: 6(8), 1-13.
58. Martinez-Frias M.L. The biochemical structure and function of methylenetetrahydrofolate reductase provide the rationale to interpret the epidemiological results on the risk for infants with Down syndrome. *Am J Med Genet A*. 2008 : 146A(11), 1477-1482.
59. Botto L.D., Yang Q. 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J of Epidemiol*. 2000 : 151(9), 862-877.

Références bibliographiques

60. Leclerc D., Rozen R. Endoplasmic reticulum stress increases the expression of methylenetetrahydrofolate reductase through the IRE1 transducer. *J Biol Chem.* 2008 : 283(6), 3151-3160.
61. Matthews R.G., Daubner S.C. Modulation of methylenetetrahydrofolate reductase activity by S-adenosylmethionine and by dihydrofolate and its polyglutamate analogues. *Adv Enzyme Regul.* 1982 : 20, 123-131.
62. Yamada K., Strahler J.R., Andrews P.C., Matthews R.G. Regulation of human methylenetetrahydrofolate reductase by phosphorylation. *PNAS.* 2005 : 102(30), 10454–10459.
63. Vahid P., Farnaz R., Zaker F., Farzaneh A., Parisa R. Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphisms and Risk of Myeloid Leukemia. *LabMedicine.* 2010 : 41(8), 490-494.
64. Hambaba L., Abdessemed S., Yahia M., Laroui S., Rouabah F. Relationship between hyperhomocysteinemia and C677T polymorphism of methylene tetrahydrofolate reductase gene in a healthy Algerian population. *Ann Biol Clin.* 2008 : 66(6), 637-641.
65. Guenther B.D., Sheppard C.A., Tran P., Rozen R., Matthews R.G *et al.* The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. *Nat Struct Biol.* 1999 : 6(4), 359-365.
66. Wilcken B., Bamforth F., Li Z., Zhu H., Ritvanen A *et al.* Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas worldwide. *J Med Genet.* 2003 : 40(8), 619-625.
67. Almawi W.Y., Finan R.R., Tamim H., Daccache J.L., Irani-Hakime N. Differences in the frequency of the C677T mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene among the Lebanese population. *Am J Hematol.* 2004 : 76(1), 85-87.
68. Jerbi Z., Abdennebi M., Douik H., Ben Romdhane H., Harzallah L *et al.* Étude du polymorphisme C677T du gène de la méthylène tétrahydrofolate réductase dans la population tunisienne. *Ann de Biol Clin.* 2005 : 63(5), 487-491.
69. Paluku They-They T., Hamzi K., Mazabraud A., Nadifi S. Fréquence du polymorphisme C677T du gène de la méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) dans les populations arabe et berbère du Maroc. *Antropo.* 2009 : 20, 11-17.
70. Pejchal R., Campbell E., Guenther B.D., Lennon B.W., Matthews R.G *et al.* Structural perturbations in the Ala --> Val polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase : how binding of folates may protect against inactivation. *Biochemistry.* 2006 : 45(15), 4808-4818.
71. Shahzad K., Hai A., Ahmed A., Kizilbash N., Alruwaili J. A Structured-based Model for the Decreased Activity of Ala222Val and Glu429Ala Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Mutants. *Bioinformatics.* 2013 : 9(18), 929-936.
72. Frosst P., Blom H.J., Milos R., Goyette P., Sheppard C.A *et al.* A candidate genetic risk factor for vascular disease : a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat*

Références bibliographiques

- Genet. 1995 ; 10(1), 111-113.
73. Friso S., Choi S.W., Girelli D., Mason J.B., Dolnikowski G.G *et al.* A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2002 : 99(8), 5606-5611.
 74. Ueland P.M., Hustad S., Schneede J., Refsum H., Vollset S.E. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Pharmacological Sciences.* 2001 : 22(4), 195-201.
 75. Muntjewerff J.W., Hoogendoorn M.L., Kahn R.S., Sinke R.J., Den Heijer M *et al.* Hyperhomocysteinemia, methylenetetrahydrofolate reductase 677TT genotype, and the risk for schizophrenia: a Dutch population based case-control study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2005 : 135B(1), 69-72.
 76. Bennouar N., Allami A., Azeddoug H., Bendris A., Laraqui A *et al.* Thermolabile Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism and Homocysteine Are Risk Factors for Coronary Artery Disease in Moroccan Population. *J Biomed Biotechnol.* 2007 : 2007, 1-9.
 77. Srivastava A., Pandey S.N., Pandey P., Choudhuri G., Mittal B. No Association of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) C677T Polymorphism in Susceptibility to Gallbladder Cancer. *DNA and Cell Biology.* 2008 : 27 (3), 127-132.
 78. Zhang G., Dai C. Gene polymorphisms of homocysteine metabolism-related enzymes in Chinese patients with occlusive coronary artery or cerebral vascular diseases. *Thromb Res.* 2001 : 104(3), 187-195.
 79. Bock O., Bu"sche., Koop C., Schro"ter S., Buhr T *et al.* Detection of the Single Hotspot Mutation in the JH2 Pseudokinase Domain of Janus Kinase 2 in Bone Marrow Trepphine Biopsies Derived from Chronic Myeloproliferative Disorders. *JMD.* 2006 : 8(2), 170-177.
 80. Eclache V., Lejeune F. Détection du chromosome Philadelphie chez les patients atteints de leucémie myéloïde chronique : Places respectives de la cytogénétique de l'hybridation in situ en fluorescence et de l'analyse moléculaire par RT-PCR. *Revue Française des Laboratoires.* 2002 : 339, 27-31.
 81. EL ANDALOUSSI A., HAD N., BENSLIMANE A. Le diagnostic moléculaire du chromosome Philadelphie par RT-PCR. *Biologie & Santé.* 2004 : 4(2), 1-10.
 82. Hur M., Park J.Y., Cho H.C., Lee K.M., Shin H.Y *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase A1298C genotypes are associated with the risks of acute lymphoblastic leukaemia and chronic myelogenous leukaemia in the Korean population. *Clin Lab Haematol.* 2006 : 28(3), 154-159.
 83. Moon H.W., Kim T.Y., Oh B.R., Min H.C., Cho H.I *et al.* MTHFR 677CC/1298CC genotypes are highly associated with chronic myelogenous leukemia: a case-control study in Korea. *Leuk Res.* 2007 : 31(9), 1213-1217.

Références bibliographiques

84. Toffoli G., Rossi D., Gaidano G., Cecchin E., Boiocchi M *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase genotype in diffuse large B-cell lymphomas with and without hypermethylation of the DNA repair gene O6-methylguanine DNA methyltransferase. *Int J Biol Markers.* 2003 : 18(3), 218-221.
85. Crider K.S., Yang T.P., Berry R.J., Bailey L.B. Folate and DNA Methylation: A Review of Molecular Mechanisms and the Evidence for Folate's Role. American Society for Nutrition. *Adv. Nutr.* 2012 : 3, 21-38.
86. Roman-Gomez J., Jimenez-Velasco A., Agirre X., Cervantes F., Sanchez J *et al.* Promoter hypomethylation of the LINE-1 retrotransposable elements activates sense/antisense transcription and marks the progression of chronic myeloid leukemia. *Oncogene.* 2005 : 24(48), 7213-7223.
87. Gnani A., Soverini S., Colarossi S., Turrini E., Iacobucci I *et al.* Genetic polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene associated with chronic myeloid leukemia. *Haematologica.* 2007 : 92(2), p199.
88. Moon H.W., Kim T.Y., Oh B.R., Min H.C., Cho H.I *et al.* MTHFR 677CC/1298CC genotypes are highly associated with chronic myelogenous leukemia: A case-control study in Korea. *Leukemia Research.* 2007 : 31, 1213-1217.
89. Barbosa C.G., Souza C.L., Pereira de Moura Neto J., Bomfim Arruda M.G., Barreto J.H *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms in myeloid leukemia patients from Northeastern Brazil. *Genetics and Molecular Biology.* 2008 : 31 (1), 29-32.
90. Khorshied M.M., Shaheen I.A., Abu Khalil R.E., Sheir R.E. Methylene tetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms in chronic myeloid leukemia: an Egyptian study. *Med Oncol.* 2014 : 31(1), 794.
91. Ismail S.I., Ababneh N.A., Awidi A. Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Genotype Association with the Risk of Chronic Myelogenous Leukemia. *J Med J.* 2009 : 43(1), 8-14.

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Liste des réactifs chimiques utilisés

- Ethanol à 70 % (SIGMA-ALDRICH, Allemand) ;
- Tampon de lyse 1 (NH₄Cl 155 mM ; NaHCO₃ 12 mM ; EDTA 0.1 mM) ;
- Tampon de lyse 2 (Tris 10 mM à pH=7,5 ; EDTA 100 mM ; NaCl 50 mM) ;
- NaCl saturé à 6 M (BIOCHEM Chemopharma, Quebec) ;
- Protéinase K (20 mg/ml, Invitrogen, France) ;
- Isopropanol (SIGMA-ALDRICH, Allemand) ;
- BET (Bromure d'éthidium) (Sigma, France) ;
- Bleu de bromophénol (Sigma, France) ;
- Agarose (Electran, Communauté Européenne) ;
- Amorce sens (S) et antisens (AS) (solution mère à 100 µM) (Eurogentec, France) ;
- dNTPs (10 mM, Fermentas) ;
- *Taq* polymorase (5 U/µl, New England Biolabs, UK) ;
- Tampon de PCR (New England Biolabs, UK) ;
- Enzyme de restriction ***Hinf I*** (10000 U/ml, New England Biolabs, UK) ;
- Tampon de restriction n°4 (New England Biolabs, UK) ;
- Tampon TAE 1X ;
- Eau bidistillée ;
- Oligo (dT)₁₈ primer (0,5 µg/µl, Fermentas) ;
- Hexamère (0,2 µg/µl, Fermentas) ;
- Transcriptase inverse (200 U/µl, Fermentas) ;
- Inhibiteur de la Ribonucléase (20 U/µl, Fermentas) ;
- Marqueur de poids (1 Kb DNA Ladder, Euromedea) ;
- Tampon RT 5X (Fermentas).

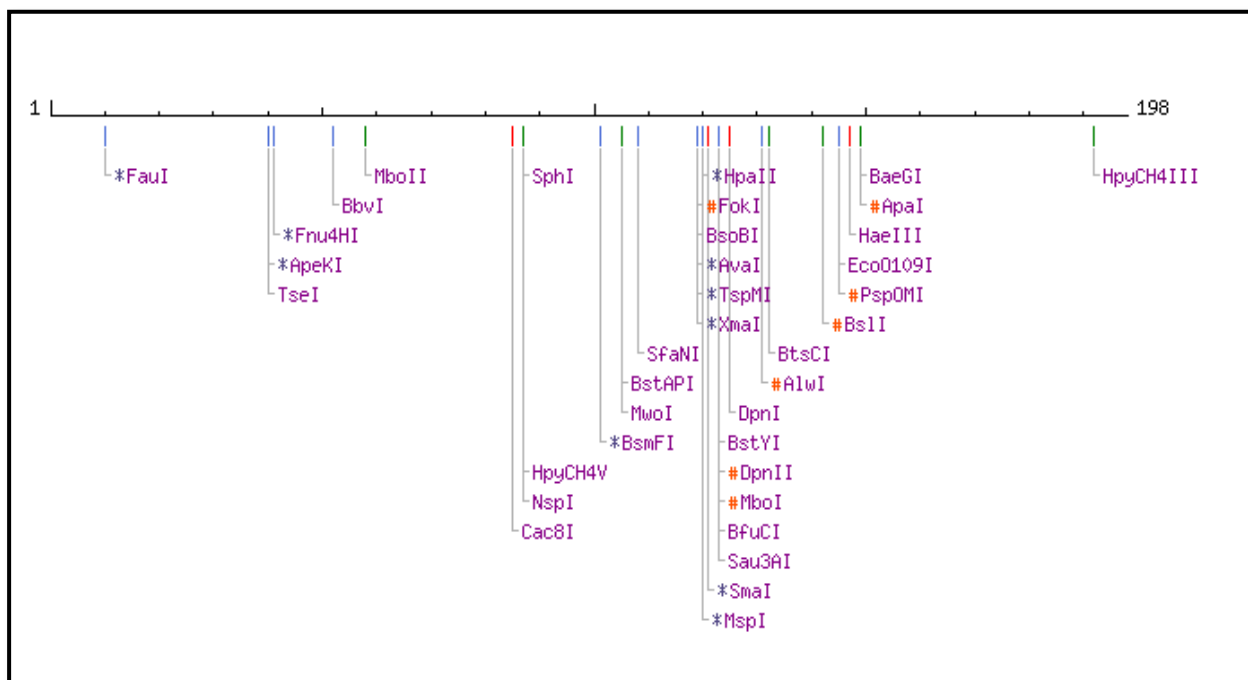
Annexes

Annexe 2 : présentation des séquences PCR du gène Mthfr prévues amplifiées par la PCR *in silico* qui ont été lancées en ligne à partir de : <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr?command=start>

```
>chr1:11856205-11856402 198bp TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA AGGACGGTGCGGTGAGAGTG
TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA GAgccgatttcacatcacgcagcttttc
tttgaggctgacacattcttcgctttgtgaaggcatgcaccgacatggg
catcacttgccccatcgtccccgggatctttcccatccaggtgagggggcc
caggagagcccataagctccctccacccCACTTCACCGCACCGTCTCT
```

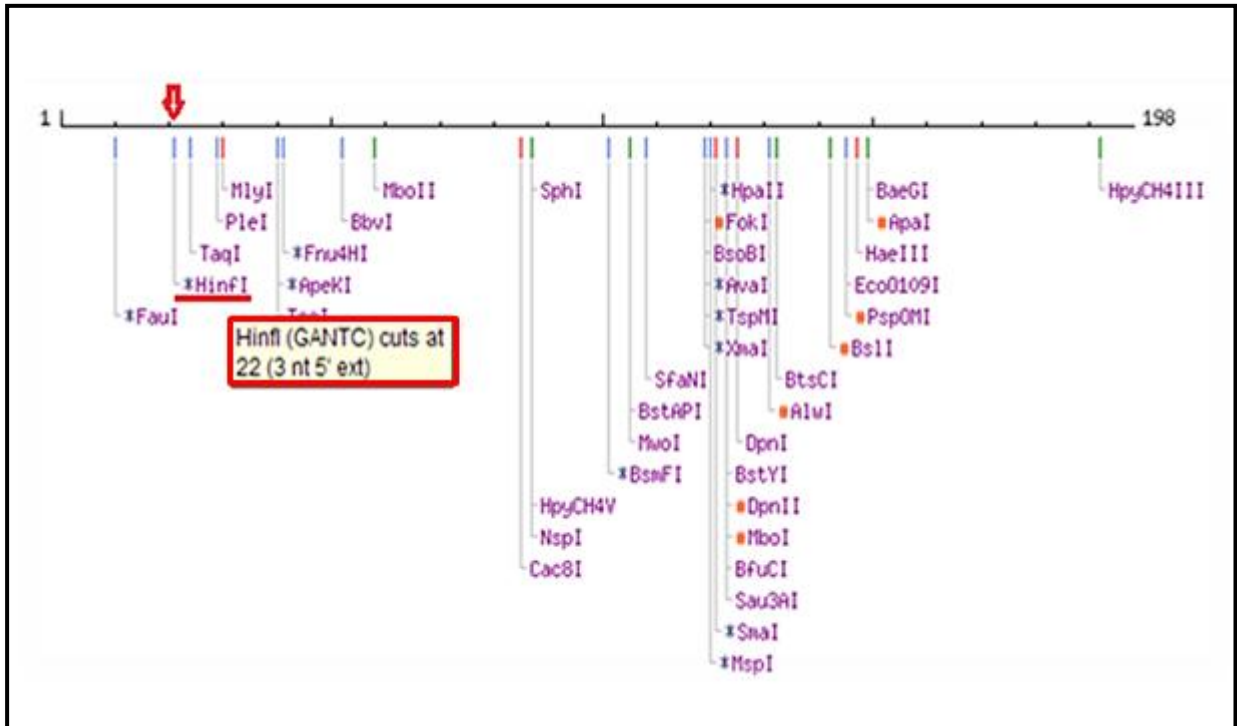
Annexe 3 : présentation de la séquence PCR du gène Mthfr et le site de restriction de l'enzyme *Hinf* I qui coupe en cas de présence de la mutation C677T, lancées en ligne à partir de : <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>

- En absence de la mutation C677T



Annexes

- En présence de la mutation C677T



Résumé

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est un syndrome myéloprolifératif rare représentant 2 à 5 % des leucémies de l'enfant et 15 % des leucémies de l'adulte. Elle est caractérisée par une translocation chromosomique qui conduit à la formation du gène de fusion Bcr-Abl.

La 5,10-méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR), impliquée dans le métabolisme des folates, joue un rôle important dans la cellule, car la disponibilité en folates est essentielle pour l'intégrité de l'ADN.

Le but de notre travail est d'optimiser et de valider des techniques de diagnostic par la biologie moléculaire, qui sont très sensibles et reproductibles, en particulier, la RT-PCR et la PCR-RFLP, afin d'établir une corrélation effective entre le polymorphisme C677T du gène Mthfr et le réarrangement Bcr-Abl et, ainsi, évaluer l'impact sur la progression tumorale précoce rapide aussi bien que sur la contribution de cette association dans le choix thérapeutique et la prise en charge précoce de patients.

Une détection aussi bien des différents transcrits du gène chimère Bcr-Abl que de la mutation C677T du gène Mthfr a été réalisée. Cependant pour asseoir les bases solides d'un nouvel biomarqueur prospective de diagnostic, il sera nécessaire de travailler sur un plus grand nombre de malades qui assurera d'avantage de fiabilité aux résultats.

Mots clés : LMC, MTHFR, POLYMORPHISME C677T, RT-PCR-RFLP, translocation chromosomique.

Abstract

Chronic myeloid leukemia (CML) is a rare myeloproliferative disorder representing 2-5 % of childhood leukemia and 15 % of adult leukemia. It is characterized by a chromosomal translocation that leads to the formation of the fusion gene Bcr-Abl.

The 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), which is involved in folate metabolism, has an important role in cell because folate availability is critical for DNA integrity.

The aim of our study is to optimize and validate diagnostic techniques using molecular biology techniques, which are highly sensitive and reproducible, in particular, the RT-PCR and PCR-RFLP to establish an effective correlation between the Mthfr C677T polymorphism and the Bcr-Abl rearrangement, and thus, assess the impact on the early rapid tumor progression as well as the contribution of this association in the therapeutic choices and the early treatment of patients.

Detection of both different transcripts of the chimeric gene Bcr-Abl and C677T mutation in the Mthfr gene was performed. However to establish a solid bases of a diagnostic new prospective biomarker, it will be necessary to work on a larger number of patients who will ensure benefit of reliable results.

Keywords : CML, MTHFR, C677T polymorphism, RT-PCR-RFLP, chromosomal translocation.

ملخص

سرطان الدم النخاعي المزمن (LMC) هو اضطراب نادر للتكاثر النخاعي، يمثل 2-5 % من سرطان الدم عند الاطفال و 15 % من سرطان الدم عند الكبار. يتميز هذا المرض بتبادل في مواقع الجينات الوراثية في الكروموسومات و التي تؤدي إلى تشكيل الجين المندمج bcr-abl.

10-5 ميثيلين تتراهيدروفولات غدكتاز (MTHFR)، المشارك في استقلاب الفولات، يلعب دورا هاما في الخلية، لان توفر الفولات أمر ضروري لتكامل الحمض النووي.

الهدف من دراستنا هو تحسين والتحقق من صحة تقنيات التشخيص في علم الأحياء الجزيئية، والتي هي حساسة للغاية و قابلة للتكرار، على وجه الخصوص، RT-PCR و PCR-RFLP لإقامة علاقة فعالة بين التعدد الجيني C677T للجين Mthfr و الجين المندمج bcr-abl، وبالتالي تقييم الأثر على تطور الورم المبكر والسريع فضلا عن مساهمة هذه العلاقة في الخيارات العلاجية والعلاج المبكر للمرضى.

لقد تم الكشف عن مختلف مستنسخات الجين المندمج bcr-abl، بالإضافة الى الطفرة الوراثية C677T للجين Mthfr و لاقامة قاعدة صلبة لعلامة بيولوجية محتملة جديدة، سيكون من الضروري العمل على عدد أكبر من المرضى والذي سيضمن الحصول على نتائج يمكن الاعتماد عليها.

الكلمات المفتاحية : LMC، MTHFR، التعدد الجيني C677T، RT-PCR-RFLP، تبادل في مواقع الجينات الوراثية في الكروموسومات.

Présenté par : MOHAMMEDI Kenza

Année universitaire : 2014-2015

Etude de l'association entre les polymorphismes génétiques C677T du méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR) et risque de leucémie myéloïde chronique : à propos de cas cliniques d'une population Algérienne.

Nature du diplôme : Magister en Biologie. Option : Biologie appliquée

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est un syndrome myéloprolifératif rare représentant 2 à 5 % des leucémies de l'enfant et 15 % des leucémies de l'adulte. Elle est caractérisée par une translocation chromosomique qui conduit à la formation du gène de fusion Bcr-Abl.

La 5,10-méthylènetétrahydrofolate réductase (MTHFR), impliquée dans le métabolisme des folates, joue un rôle important dans la cellule, car la disponibilité en folates est essentielle pour l'intégrité de l'ADN.

Le but de notre travail est d'optimiser et de valider des techniques de diagnostic par la biologie moléculaire, qui sont très sensibles et reproductibles, en particulier, la RT-PCR et la PCR-RFLP, afin d'établir une corrélation effective entre le polymorphisme C677T du gène Mthfr et le réarrangement Bcr-Abl et, ainsi, évaluer l'impact sur la progression tumorale précoce rapide aussi bien que sur la contribution de cette association dans le choix thérapeutique et la prise en charge précoce de patients.

Une détection aussi bien des différents transcrits du gène chimère Bcr-Abl que de la mutation C677T du gène Mthfr a été réalisée. Cependant pour asseoir les bases solides d'un nouvel biomarqueur prospective de diagnostic, il sera nécessaire de travailler sur un plus grand nombre de malades qui assurera d'avantage de fiabilité aux résultats.

Mots clés : LMC, MTHFR, POLYMORPHISME C677T, RT-PCR-RFLP, translocation chromosomique.

Membres du Jury

Président	BELHAMRA Mohamed	Prof. Université de Biskra
Examineurs	SATTA Dalila	Prof. Université de Constantine
	LAIADI Ziane	M.C. Université de Biskra
Rapporteur	BOURAS Mouras	M.C. Université de Batna