

.République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



UNIVERSITE de TLEMCEM

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers

Département : Biologie

Mémoire

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER Académique.

Spécialité : Génétique.

Intitulé de la thèse :

IMPACT DU FLT3 DANS LE PRONOSTIC DES LEUCEMIES MYELOÏDES AIGUES.

Présenté par: DJAMEI Omar

Soutenu le 27/10/2020, devant le jury composé de :

Qualité	Nom	Grade	Université
Président :	GAOUAR.S.B.S.	Professeur	Abou-Bekr Belkaid. Tlemcen
Encadreur :	MECIFI R.	MCA	Abou-Bekr Belkaid. Tlemcen
Examinatrice :	TRIQUI C.	MAA	Abou-Bekr Belkaid. Tlemcen

Année universitaire : 2019/2020

Remerciements

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements :

A mon encadreur **Dr. MECIFI Raouida** pour avoir accepté de m'encadrer, et m'avoir fait part de son expérience et son savoir-faire, pour tous ses conseils, ses orientations et surtout pour sa gentillesse et son énergie positive qui m'ont été d'une très grande aide durant cette aventure, merci madame de m'avoir encouragé tout au long de mon parcours, de m'avoir transmis certaines de vos qualités, j'ai appris grâce à vous à être patient et toujours dévoué, veuillez agréer Madame l'expression de mes sentiments distingués.

Au **Pr. GAOUAR Semir Bechir Suheil**, notre responsable de la spécialité Génétique, qui nous a toujours encouragé à nous lancer dans de grands travaux et à concrétiser nos projets sans avoir peur de l'échec, une personne qui a fait et qui fait toujours preuve d'un grand sacrifice pour ses étudiants et pour l'amélioration de l'enseignement. Merci de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Au **Dr. TRIQUI Chahinez**, d'avoir accepté de juger ce travail.

Merci à mon père, ma mère, mes frères et ma sœur pour le chaleureux soutien et l'encouragement infini. Ma réussite est grâce à vous.

Merci à toute personne qui m'a aidé par une information, par une idée ou un conseil qui sont ajoutés à mon expérience et à ma connaissance.

Liste des abréviations

%: Pourcentage
°C : degré Celsius
ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
CBF : Core Binding Factor
CEBPA : le gène Enhancer Binding Protein alpha
CHU : Centre hospitalier universitaire
Del : Délétion
E : Extracellulaire
EDTA: Ethylène Diamine Tétra Acétique
FAB : French- American-British
FISH: fluorescente hybridation in situ
FL : FLT3- ligand
FLK-2 : fetal liver kinase 2
FLT3 : le gène Fms- like tyrosine kinase
Inv. : inversion
ITD : duplication interne en tandem.
JM : Juxta-Membranaire
LMA : Leucémie myéloïde aiguë
LMC : Leucémie Myéloïde Chronique
MDS : Myelodysplasiques Syndrom
MLL : Mixed-Lineage Leukemia
NaOH: Hydroxyde de sodium
NPM1 : *nucléophosmin 1*
NRAS : neuroblastome RAS
OMS : Organisation Mondiale de la santé
p: Signification statistique
pb: Paires de Base
PCR : Polymerase Chain Reaction
RT-PCR : test de réaction en chaîne transcriptase-polymérase inverse
RTK III : Récepteur de Tyrosine Kinase de classe III
RUNX1 : le runt-related transcription factor 1
STK-1 : Human Stem Cell Kinase 1
t. : translocation
TKD : tyrosine kinase domain
TM : Transmembranaire
WT1 : Wilms Tumor 1

Liste des figures

Figure 1: Les anomalies génétiques majeures de la LMA.

Figure 2: Représentation des différents domaines de la protéine FLT3

Figure 3: Schéma des rubans et des surfaces de FLT3 qui montrent la disposition spatiale des différents éléments de la structure de la molécule

Figure 4: Fonction de la protéine FLT

Liste des tableaux

Tableau n°1 : comparaison entre la classification des LMA selon la FAB et la classification de l'OMS.

Tableau n°2 : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des exons 14 et 15.

SOMMAIRE

I. PROTOCOL D'ETUDE.....	01
II. REVUE DE LITERATURE.....	03
II.1. Introduction	04
II.2. La classification des LMA.....	04
II.3. Diagnostic cytogénétique et moléculaire.....	05
II.4. Caryotype normal et anomalies moléculaires.....	06
II.5. Description du gène <i>FLT3</i>	07
II.6. Structure et fonction de la protéine <i>FLT3</i>	07
II.7. Les mutations de <i>FLT3</i>	09
II.8. La physiopathologie de la mutation de <i>FLT3</i>	10
II.9. Pronostic des LMA.....	12
II.10. Facteurs pronostiques.....	12
II.11. L'impact pronostic de <i>FLT3</i> -ITD.....	13
II.12. Technique de l'analyse moléculaire de la mutation « <i>FLT3</i> ».....	14
II.12.1. Principes de la procédure	14
II.12.1.1. Mutations a duplication interne en tandem (ITD) de <i>FLT3</i>	14
II.12.1.2. Mutations du domaine tyrosine kinase (TKD) de <i>FLT3</i>	14
II.12.1.3. Conservation et manipulation	15
II.12.1.4. Instruments.....	15
II.12.1.4.1. Thermocycleur.....	15
II.12.1.4.2. Substances interférentes.....	16
II.12.1.4.3. Conditions de prélèvement et manipulation.....	16
II.12.2. Préparation de l'échantillon.....	17
II.12.3. Conservation des échantillons	17
II.12.4. Contrôle qualité.....	17
II.12.5. Interprétation des résultats.....	17

II.12.6. Analyse	18
II.12.7. Limites de la procédure	18
III. MATERIELS ET METHODES	19
IV. DISCUSSION.....	21
IV. CONCLUSION ET RECOMMANDATION.....	26
V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE.....	28

I/ LE PROTOCOL D'ETUDE

Les leucémies sont des maladies clonales et acquises de la cellule souche hématopoïétique ou d'un précurseur déjà commis vers les lignées lymphoïde et/ou myéloïde.

L'analyse chromosomique a un rôle fondamental dans les diagnostics des leucémies, à savoir :

- Dans la classification phénotypique des leucémies,
- Dans la compréhension de physiopathologie de la leucémogénèse,
- Dans l'orientation des protocoles thérapeutiques qui appliquent une chimiothérapie classique et ou associée à une thérapie ciblée. Et les indications d'une éventuelle greffe médullaire.

Aussi ces analyses ont un impact sur le pronostic des leucémies.

Certaines leucémies aiguës myéloblastiques (LMA) ne présentent pas d'anomalie cytogénétique, mais des analyses moléculaires plus fines permettent là encore de mieux comprendre la leucémogénèse et son comportement.

Si l'étude cytogénétique standard est toujours indiquée, elle doit être associée à des techniques complémentaires pour rechercher des anomalies moléculaires parfois critiques et non détectées par les techniques standard mais significatives pour la prise en charge : hybridation in situ (FISH), PCR. La première anomalie évaluée actuellement dans les LMA et de façon large concerne le gène FLT3 (tyrosine kinase de type FMS).

Le pronostic de la leucémie myéloïde aiguë que ce soit chez l'adulte ou chez l'enfant reste mauvais, contrairement à la leucémie lymphoblastique qui est meilleur. Le défi des cliniciens qui prennent en charge les LMA, est de lutter contre l'échec thérapeutique et améliorer leur pronostic et la survie, ceci est grâce à des progrès de recherche et de nouvelles pistes d'analyse biologique.

Donc, ma curiosité scientifique m'a poussé à préparer un mémoire de fin d'étude de mon master II, et de chercher une piste qui nous permet autant que des biologistes en génétique d'aider les cliniciens de compléter les diagnostics positifs des leucémies myéloïde aiguës LMA.

Donc le but de notre travail est de faire une synthèse bibliographique sur le rôle du gène FLT3 sur le pronostic des leucémies myéloïde aiguës LMA.

II/ REVUE DE LITERATURE

II.1. Introduction

Les Leucémies Aiguës Myéloblastiques (LMA) forment un groupe hétérogène d'hémopathies malignes définies par une prolifération incontrôlée de cellules myéloïdes immatures (appelées blastes), avec blocage de leur capacité de différenciation. Cette accumulation de cellules est à l'origine d'une hématopoïèse inefficace. Le caractère aigu de cette pathologie est défini par un rapide potentiel évolutif des symptômes et des signes biologiques.

La LMA représente approximativement 25% des leucémies de l'adulte et 20% des leucémies aiguës de l'enfant. Elle touche préférentiellement le sexe masculin diagnostiquée à l'âge de 65 ans rarement avant l'âge de 40 ans. **(D. Gary Gilliland et al., 2002).**

Le tableau clinique des LMA est peu spécifique (forme peu symptomatique) et peut-être grave nécessitant ainsi une hospitalisation, il associe à des degrés divers et selon des modes évolutive variable, dominé par des signe d'insuffisance médullaire : une anémie, asthénie, un syndrome infectieux avec fièvre persistant, un syndrome hémorragique d'intensité variable parfois menaçant faisant faire redouter une coagulation intravasculaire disséminer. Cette symptomatologie est suivie par des signes du syndrome tumoral.

II.2. La classification des LMA

Les LMA ont longtemps été classées uniquement sur leurs aspects morphologiques définis par la classification du FAB (*French- American-British*) **(Bennett et al., 1976)** toujours utile en routine clinique. Toutefois, la caractérisation d'anomalies cytogénétiques et plus récemment moléculaires (mutations) récurrentes, d'importance pronostique majeure, a amené l'OMS (Organisation Mondiale de la santé) à proposer une nouvelle classification (OMS 2008) **(Vardiman et al., 2002)** intégrant ces paramètres **(Tableau I).**

Tableau I: Classification FAB et OMS des leucémies aigues myéloïdes (Bennett et al., 1976 ; Vardiman et al., 2002).

Classification FAB	Classification OMS
M0: différenciation minimale	LAM avec translocations cytogénétiques récurrentes <ul style="list-style-type: none"> • LAM avec t(8;21) • LAM promyélocytaire avec t(15;17) • LAM avec inv (16) et éosinophilies pathologiques • LAM avec anomalies 11q23 (MLL)
M1: différenciation myéloïde sans maturation	
M2: différenciation myéloïde avec maturation	
M3: leucémie promyélocytaire	
M4: leucémie myéломonocytaire	LAM avec dysplasie multinéaire <ul style="list-style-type: none"> • Avec antécédents de Syndrome myélodysplasique (SMD) • Sans antécédents de SMD
M4E0: leucémie myéломonocytaire avec éosinophilies pathologiques	
M5: leucémie monocytaire avec ou sans maturation	LAM avec dysplasie liée aux traitements (cytotoxique) <ul style="list-style-type: none"> • LAM sans autre catégorisation • Différenciation myéloïde sans maturation • Différenciation myéloïde avec maturation • Leucémie méylomonocytaire • Leucémie monocytaire • Erythroleucémie • Leucémie mégacaryoblastique • Leucémie à basophiles • Panmyélose aigue avec fibrose
M6: érythroleucémie	
M7: leucémie mégacaryoblastique	

II.3. Diagnostic cytogénétique et moléculaire

Les anomalies cytogénétiques des LMA sont généralement retrouvées au sein des caryotypes altérés. Les caryotypes complexes sont définis par trois anomalies ou plus (11% de l'ensemble des LMA): les translocations impliquant le gène MLL (*Mixed-Lineage Leukemia*) en 11q23, t(15;17), t (6;9), les inv(3), t(3;3), et les anomalies du CBF (*Core Binding Factor*).

De plus, 23% des LAM sont caractérisées par des anomalies cytogénétiques variées non récurrentes, principalement des gains ou des pertes chromosomiques -5, 5(del q), dont les gènes cibles ne sont pas connus.

Au niveau moléculaire, les mutations somatiques acquises ont été identifiées dans plusieurs gènes impliqués dans les LMA à caryotype normal : le gène du nucléphosmin 1 (*NPM1*), le gène Fms- like tyrosine kinase (*FLT3*), le gène Enhancer Binding Protein alpha (*CEBPA*), le gène MLL, l'oncogène viral neuroblastoma RAS (*NRAS*), le gène de Wilms Tumor 1 (*WT1*) et le runt-related transcription factor 1 (*RUNX1*).

Les mutations touchant ces gènes prennent toute leur importance dans le groupe des LAM à caryotype normal, qui, sous une même appellation, regroupent en termes de

pronostic des entités très différentes les unes des autres (**Döhner and Döhner, 2008**)(Figure 1).

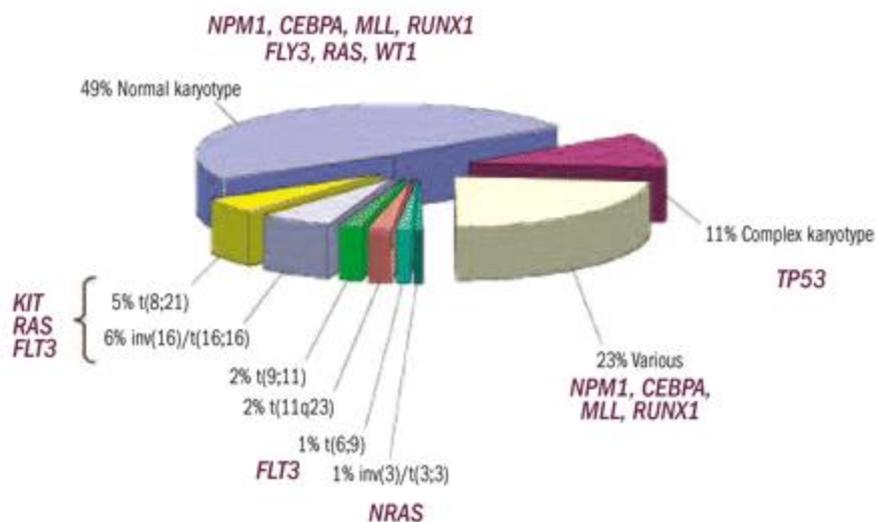


Figure 1: Les anomalies génétiques majeures de la LMA (**Döhner and Döhner, 2008**).

II.4. CARYOTYPE NORMAL ET ANOMALIES MOLECULAIRES

Les nouvelles techniques d'évaluation génomique permettent dorénavant d'évaluer les profils d'expression de nombreux gènes par la technique de DNA microarray et d'identifier dysrégulations de gènes importants dans la différenciation ou la prolifération cellulaire.

Les profils génomiques sont très superposables aux profils cytogénétiques et confirment le caractère homogène de ces entités. Les variations cytogénétiques et les mutations génétiques particulièrement la présence de la mutation au niveau du gène FLT3 de type duplication en tandem du domaine juxta-membranaire (ITD) souvent détectée dans la LMA. La mutation FLT3-ITD conduit à une activation dérégulée et constitutive de récepteur FLT3 chose qui induit une addiction oncogénique des cellules leucémiques aux voies de signalisation en aval. Cela indique que la FLT3 demeure une cible thérapeutique pertinente dans les LMA. Des mutations ponctuelles activatrices des gènes *K-RAS* et *N-RAS* ont été décrites dans des syndromes myélodysplasiques et des LMA. Plus récemment, des mutations activatrices des récepteurs à activité tyrosine kinase FLT3 et c-KIT ont été mises en évidence avec une fréquence respectivement de 20-25 % et 5 % dans des LMA ayant une translocation impliquant les gènes du *CBF*, *MLL*, ou les oncogènes *PML-RARα* et *DEK-CAN* (**Scheijen B. et al. Oncogene 2002**).

L'altération par mutation de cette tyrosine kinase récepteur induit une activation constitutive de cette tyrosine kinase avec prolifération cellulaire indépendante des cytokines. Cette protéine, avec des propriétés multiples, est localisée principalement dans le nucléole ; mutée, elle est localisée de façon aberrante dans le cytoplasme et intervient dans la leucémogénèse. Le statut FLT3 est maintenant un élément reconnu pour évaluer le comportement des cellules leucémiques à caryotype : les mutations de FLT3 sont associées à une plus grande agressivité.

II.5. Description du gène *FLT3*

Le FLT3 joue un rôle important dans la prolifération, la différenciation (**Park et al., 2011**), et la survie des cellules souches multipotentes, en synergie avec d'autres facteurs de croissance (**Ilopis 2009**).

Le gène *FLT3* également appelé *FLK-2* (fetal liver kinase 2) ou *STK-1* (human stem cell kinase 1), est un gène situé en 13q12, comportant 24 exons, et codant pour un récepteur de tyrosine kinase de classe III (RTK III) (**Abu-Duhier et al., 2001**).

Le *FLT3* est préférentiellement exprimé par les cellules souches et les progéniteurs hématopoïétiques aussi bien que dans le cerveau, le placenta, et le foie. Le ligand du FLT3 (FL) est exprimé par les cellules de la moelle osseuse et son rôle est de stimuler des cellules souches, avant que son expression ne diminue au cours de l'hématopoïèse (**Ozeki et al., 2004**).

La forme sauvage du FLT3 est retrouvée dans 60 à 80% des blastes de LAM (**Bayle et al., 2004**).

II.6. Structure et fonction de la protéine FLT3

La protéine FLT3 est composée de 933 acides aminés; elle est caractérisée par la présence de cinq domaines extracellulaires (E) de type immunoglobuline, un domaine transmembranaire (TM), un domaine juxta-membranaire (JM) et deux domaines tyrosine kinase (TKD) (**Llopis et al., 2009**)(**Figure 2 et 3**).

A l'état sauvage inactif, la protéine a une conformation monomérique et ce n'est qu'en présence de son ligand (FLT3L) que la protéine se présente alors sous forme dimérique et devient active. La dimérisation de la protéine induit la phosphorylation du domaine TK, avec pour conséquence l'activation du récepteur FLT3 et de la cascade d'événements qui en dérivent. Les récepteurs, sont internalisés et dégradés, une fois leur fonction accomplie (**Figure 4**)(**Stirewalt and Radich, 2003**).

Le ligand du FLT3 (FLT3L) est une protéine de 235 acides aminés, transmembranaire de type 1, codée par le gène *FLT3L*. La protéine FLT3L contient un peptide signal amino-terminal, quatre domaines d'hélices extracellulaires, des régions d'espacement et d'ancrage, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique de petite taille. Le groupe des protéines transmembranaire type I inclut le ligand du gène KIT et du gène M-CSF (CSF1); ces trois protéines ont des tailles et des structures similaires (Hannum et al., 1994; Lyman et al., 1993).

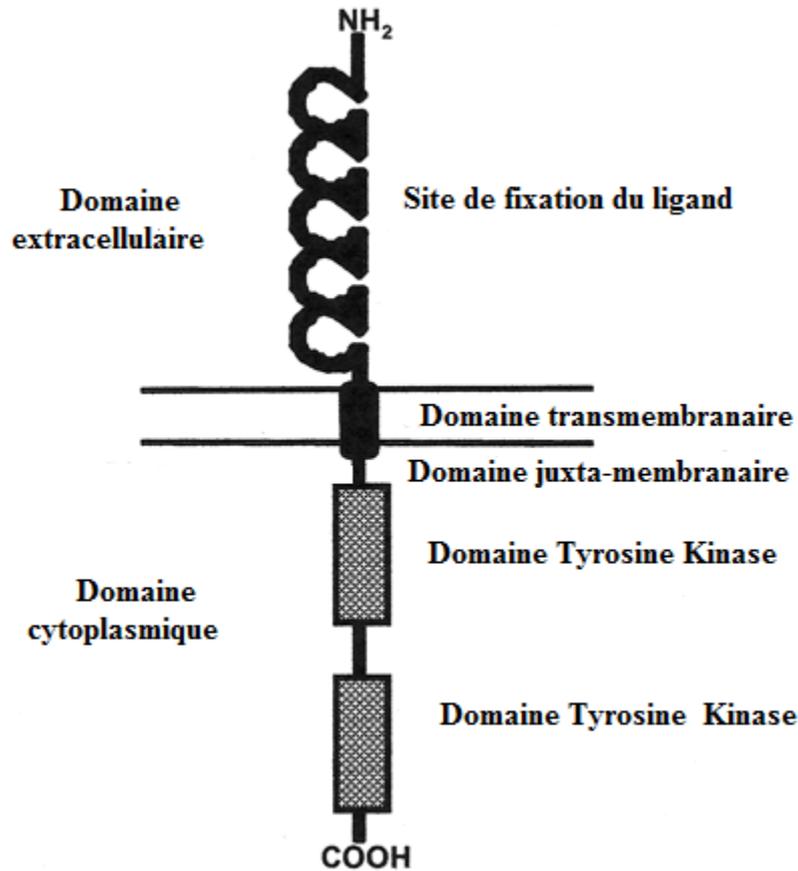


Figure 2: Représentation des différents domaines de la protéine FLT3 (Small, 2006).

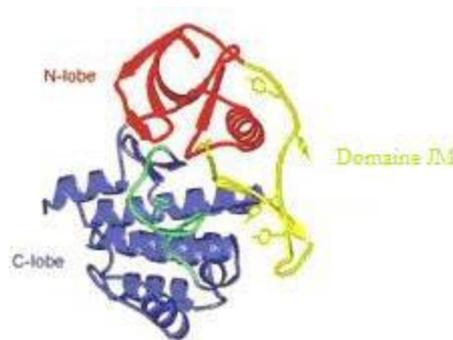


Figure 3: Schéma des rubans et des surfaces de FLT3 qui montrent la disposition spatiale des différents éléments de la structure de la molécule

Le domaine N-terminal kinase (rouge) et le domaine C-terminale kinase (bleu) comprennent le pliage kinase standard. La boucle d'activation (vert) est repliée vers le haut entre les deux domaines de kinase. Le domaine JM (jaune) s'étend sur la longueur de la molécule. Toutes les tyrosines dans le domaine JM et la boucle d'activation sont affichées comme des représentations de « baton » (Stirewalt and Radich, 2003).

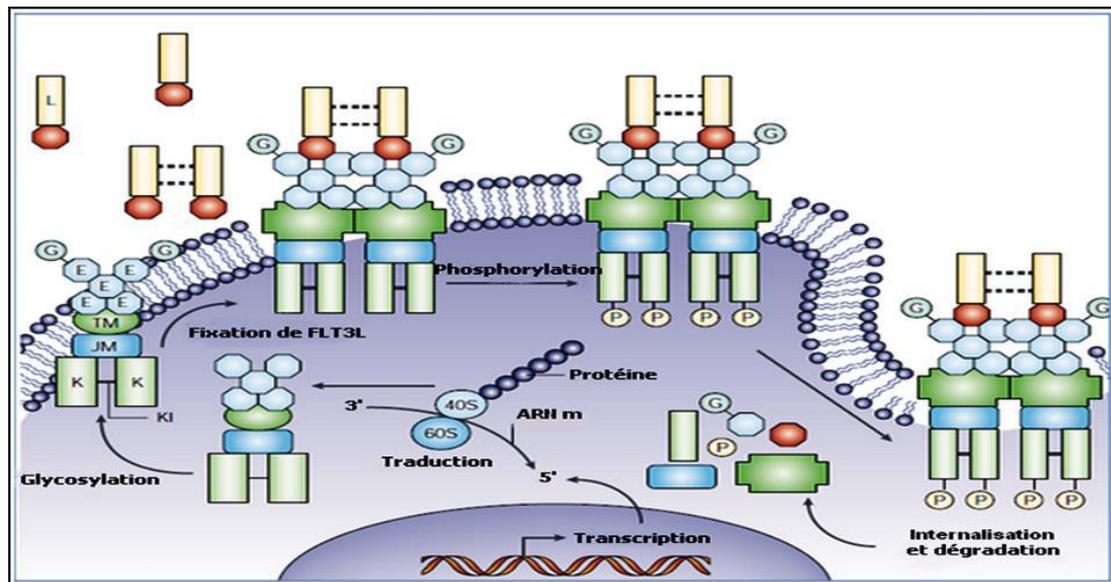


Figure 4: Fonction de la protéine FLT3

La protéine FLT3 cytoplasmique subit une glycosylation (G), qui favorise la localisation du récepteur sur la membrane. Le FLT3 sauvage reste monomère, une protéine inactivée sur la surface de la cellule jusqu'à ce que le ligand du FLT3 (FLT3L), probablement sous une forme dimérique, se lie au récepteur et induit la dimérisation du récepteur. FLT3 favorisant ainsi la phosphorylation (P) des domaines de tyrosine-kinase, ce qui active le récepteur et les effecteurs en aval. Les récepteurs dimérisés sont rapidement internalisés et dégradés (Stirewalt and Radich, 2003).

II.7. Les mutations de *FLT3*

Les mutations concernant le gène *FLT3* sont parmi les plus fréquemment retrouvées chez les patients atteints de LAM, puisqu'elles sont présentes chez 7 à 25% de ces patients (Stirewalt and Radich., 2003); elles sont de deux types:

Une mutation non-sens dans l'exon 20, c'est-à-dire au sein de la boucle d'activation du domaine tyrosine kinase TKD, et qui concerne 5 à 10% des patients atteints de LMA. Cette mutation implique le plus fréquemment le résidu acide aspartique au niveau du codon 835, et est associée à un mauvais pronostic (Abu-Duhier et al.,

2001). La deuxième mutation de ce gène, la FLT3/ITD est une duplication interne en tandem qui ne perturbe pas le cadre de lecture siégeant dans le domaine JM du récepteur, et touchant les exons 14-15; elle concerne environ 25% des adultes et 10% des enfants atteints de LMA. Cette mutation a été décrite pour la première fois en 1996 par l'équipe de Nakao (**Nakao et al., 1996**); les FLT3/ITD sont très hétérogènes et varient dans leurs tailles de 3-400 pb (**Gagyi et al., 2006**), et dans leur sites d'insertions (**Döhner and Döhner, 2008**). Ces duplications induisent une autophosphorylation constitutive du récepteur en absence de son ligand conduisant à une activation des voies de signalisation, provoquant ainsi une augmentation de la survie et de la prolifération des cellules immatures (**Llopis et al., 2009**).

La fréquence de la FLT3-ITD varie selon le type de la leucémie : on la retrouve préférentiellement dans les LMA de novo, à caryotype normal, ou présentant les translocations t (15, 17) ou t(6, 9) ; à l'inverse, elle est retrouvée moins fréquemment dans les LAM M2 (**Yanada et al., 2005**). Cette mutation a également été détectée à une fréquence inférieure dans les syndromes myélodysplasiques (MDS) (**Griffith et al., 2004**).

II.8. la physiopathologie de la mutation de FLT3

La tyrosine kinase 3 de type FMS (FMS-like tyrosine kinase-3) (FLT3), également connu sous le nom de la kinase 2 (flk2) ou STK-1, appartient à la même famille [récepteur tyrosine kinase (RTK) classe III] comme kit c, c-FMS et les récepteurs du facteur de croissance dérivés des plaquettes (RFPP). C'est un récepteur de la tyrosine kinase, il a un rôle important pour le développement de l'hématopoïétique et le système immunitaire. FL est exprimé dans pratiquement tous les tissus.

Le récepteur FLT3 partage les caractéristiques structurelles des autres membres, à savoir cinq domaines de type immunoglobuline dans la région extracellulaire, une séquence transmembranaire unique, intracellulaire, une courte portion juxtamembrane, suivie de la kinase interrompu

Ses signaux d'activation sont traduits par phosphorylation de protéines cytoplasmiques dans les voies biochimiques qui favorisent la croissance cellulaire et inhibent l'apoptose. Lors de la liaison FLT3, le récepteur dimérifie, active les mutations de tyrosine kinase avec autophosphorylation.

Étant donné son rôle pivot apparent dans l'hématopoïèse normale, il n'est peut-être pas surprenant de constater que le FLT3 semble jouer un rôle important dans la

leucémie. L'expression de la FLT3 a été démontrée dans la grande majorité des lignées de cellules de leucémie et de lymphome humaines, tandis que le récepteur de la FLT3 est exprimé dans la plupart des lignées de cellules de leucémie pré-B, myéloïde et monocytique. (Stone RM, N et al. 2017).

Dans les leucémies humaine, le FLT3 est exprimé en plus grandes quantités (par rapport à la moelle osseuse normale) et de façon aberrante, et il n'est plus associé à l'expression du CD34 (Anne Fernandez-Vidal et al. 2009)

Plus de 90 % des cas de LMA ont montré une expression de la FLT3, à la fois comme ARN et comme protéine fonctionnelle.

Un certain nombre de mutations activatrices de FLT3 ont été trouvées chez les patients atteints de leucémie et les lignées cellulaires humaines dérivées de la leucémie. la première mutations identifiée était la mutation FLT3/ITD. Par la suite, deux groupes indépendants ont identifié des mutations ponctuelles à l'aspartate 835 (ou à l'isoleucine 836) dans la boucle d'activation du domaine de kinase FLT3.

Les deux types de mutations se trouvent principalement dans les LMA.

Les mutations FLT3/ITD ont été découvertes à l'aide d'un test de réaction en chaîne transcriptase-polymérase inverse (RT-PCR) pour dépister une série d'échantillons primaires de leucémie pour l'expression du FLT3. Une anomalie récurrente a été notée dans les transcriptions du FLT3 des patients atteints de LMC. Lorsque des amorces encadrant la portion juxtamembrane de la séquence codante du FLT3 ont été utilisées pour amplifier l'ADNc, un produit d'amplification étonnamment plus long a été observé dans cinq des 22 échantillons de LCBA. Le séquençage de l'ADN a révélé que ces échantillons hébergent des mutations de duplication en tandem interne de la séquence nucléotidique dans l'exon 14.

Les patients présentant cette anomalie présentaient une incidence accrue de leucocytose et une diminution de la Survie Globale (SG) par rapport aux patients sans mutations FLT3/ITD. Ces résultats marquants ont amené une attention considérable au rôle du FLT3.

Le cause de ces événements de duplication demeure inconnue, mais l'un des mécanismes proposés était que, pendant la répllication de l'ADN, une séquence palindromique dans le brin décalé forme une structure en épingle à cheveux, qui mène ensuite à une duplication d'une séquence. Si la réparation du défaut de correspondance est altérée ont proposé un mécanisme de réparation de glissement.

FLT3 sont maintenant reconnus comme l'anomalie moléculaire la plus courante dans la leucémie myéloïde aiguë. Les mutations de FLT3 peuvent jouer un rôle dans d'autres hémopathies malignes. Ainsi, les patients abritant ces mutations ont un mauvais pronostic.

II.9. Pronostic des LAM

Plusieurs facteurs ont été définis pour les LMA dont la cytogénétique, l'âge, le fait que la leucémie soit secondaire à une autre hémopathie ou à un traitement cytotoxique pour une autre tumeur, ainsi que la masse tumorale (taux de blastes) (**Passweg et al., 2008**). La majorité des cas de LAM sont des patients âgés de plus de 60 ans et il semblerait que l'augmentation de l'incidence des LAM soit exponentielle avec l'âge (**Benakli, 2009**). La pathologie du sujet âgé est différente et plus grave que celle du sujet jeune. Ce phénomène est lié à l'accroissement de l'instabilité génétique liée à l'âge. Les anomalies chromosomiques récurrentes permettent de classer les LAM en trois sous-groupes de pronostic: favorable, intermédiaire et défavorable (**Mrozek et al., 2004**).

II.10. Facteurs pronostiques

L'évaluation des facteurs pronostiques des LMA s'est améliorée en particulier depuis le développement de l'analyse cytogénétique et moléculaire. Les progrès réalisés grâce à l'intensification du traitement et la toxicité de cette intensification posent la question de l'adaptation du traitement au risque de la maladie. Les paramètres qui vont permettre d'analyser le devenir des malades et l'impact des différents facteurs pronostiques sont ainsi définis :

- Décès précoce : décès survenant avant ou pendant le traitement.
- Taux de rémission complète : la plupart des groupes définissent la rémission complète sur le critère de la moelle principalement moins de 5 % de blastes dans une moelle riche.
- Age : globalement pronostic sombre comparable à l'adulte avec l'enfant.
- La morphologie : la morphologie a un impact sur le pronostic qu'il s'agisse du taux de rémission complète, de la survie sans événement, et de la survie sans maladie. Les sous-groupes :LMA1, LMA2 avec corps d'Auer, LAM3, LAM4 éosinophile. Ont un meilleur pronostic, pour d'autres types de LMA ont un devenir plus péjoratif.

- Cytogénétique et étude moléculaire : la cytogénétique a un impact encore plus significatif puisqu'elle affine la qualification morphologique. Les groupes avec t(8 ;21) t(15 ;17) inv.(16). Ainsi l'analyse du statu moléculaire FLT3 des LMA avec un translocation (8 ;21) sont de bon pronostique et la duplication en tandem de FLT3 ne modifie pas le devenir des LMA (8 ;21). (**Vardiman J., 2009**).
- Hyper leucocytose : l'hyper leucocytose apparait comme un facteur pronostique essentiellement pour ce qui concernent les décès précoces et les non-réponses lorsque la blastose est supérieure a 100000.
- Réponse au traitement : certaines ont mie en évidence la valeur de la moelle de J15 comme élément prédictif de l'obtention de la rémission complète. (**Mendez L. et al., 2018**).

II.11. L'impact pronostic de FLT3-ITD

L'impact pronostique des FLT3-ITD est de mieux en mieux connu. De nombreuses études rapportent un pronostic défavorable pour les patients concernés par la duplication, avec une diminution de la survie globale et de la survie sans maladie , alors que le taux de la rémission complète semble ne pas être affecté, et ce indépendamment des autres facteurs dans les LAM à caryotype normal (**Schlenk et al., 2008**). Ces duplication sont des mutations somatiques ; ceci a été démontré par l'absence de la duplication chez des patients en RC et qui étaient positifs pour la FLT3/ITD au moment du diagnostic (**Mead et al., 2007**).

La plupart des mutations de gain de fonction sont associées à un effet dominant négatif, où la protéine mutante interfère d'une façon ou d'une autre avec la fonction de la protéine normale découlant de l'allèle sauvage WT sur l'autre chromosome dans le cas de l'hétérozygotie. La FLT3-ITD est souvent retrouvée à l'état hétérozygote. La connaissance du ratio entre la quantité de l'allèle muté et celle de l'allèle sauvage est très importante car plus le ratio est élevé (en faveur de la forme muté), jusqu'à la perte de l'hétérozygotie, plus le pronostic est péjoratif (**Whitman et al., 2001**).

II.12. Technique de l'analyse moléculaire de la mutation « FLT3 »

L'analyse de la mutation activatrice de FLT3 est nécessaire pour déterminer le stade de la maladie et les options de traitement appropriées.

Le LeukoStrat® PCR, ce test cible les régions du gène FLT3 afin d'identifier les mutations à duplication interne en tandem (ITD) et les mutations du domaine tyrosine kinase (TKD, telles que D835 et I836). Ce test ne peut pas détecter de manière fiable les mutations FLT3 représentant moins de 5 % de la population totale. Il convient de souligner que les résultats des tests de mutation moléculaire doivent toujours être interprétés dans le contexte de données cliniques, histologiques et immunophénotypiques. Ce kit d'analyse contient 2 mélanges mères (master mixes) principaux : le mélange mère FLT3 ITD Master Mix destiné à la détection des mutations à duplication interne en tandem et le mélange mère FLT3 D835 Master Mix destiné à la détection des mutations du domaine tyrosine kinase (telles que les mutations D835 et I836).

II.12.1. Principes de la procédure

II.12.1.1. Mutations à duplication interne en tandem (ITD) de FLT3

Les mutations à duplication interne en tandem de FLT3 ou les mutations de longueur sont dues à la duplication et à l'insertion d'une portion du gène FLT3 qui inclut la région au sein et adjacente à la région juxta-membranaire du gène FLT3. Ces mutations varient selon le lieu et la longueur de la séquence d'ADN dupliquée insérée. Les mutations ITD entraînent une autophosphorylation constitutive et une activation de FLT3. Les allèles sauvages FLT3 amplifieront et donneront un produit de 327±1 paires de bases (pb) comme mesuré par ce test, tandis que les allèles contenant les mutations ITD donneront un produit de ≥ 330 pb.

II.12.1.2. Mutations du domaine tyrosine kinase (TKD) de FLT3

Les mutations du domaine tyrosine kinase FLT3 sont dues à des substitutions d'acide nucléique qui entraînent une altération de la séquence d'acides aminés dans ce centre catalytique bien conservé. Les mutations TKD telles que D835 et I836 entraînent une autophosphorylation constitutive et une activation de FLT3.

Les allèles sauvages du gène FLT3 incluent un site de digestion de l'enzyme de restriction EcoRV. Lorsqu'une substitution d'acides nucléiques survient, le site de reconnaissance de digestion de l'enzyme de restriction disparaît et l'endonucléase

EcoRV est incapable d'identifier et de digérer l'ADN à ce site. Nos tests utilisent des amorces qui se trouvent de part et d'autre de la région TKD. La région cible FLT3 est amplifiée à l'aide de la PCR, puis une digestion par l'enzyme de restriction EcoRV est effectuée. L'une des amorces PCR contient un site de l'enzyme de restriction EcoRV, ainsi les allèles sauvages comme les mutants sont digérés. Le schéma de digestion identifie la perte de la séquence normale du gène et confirme que la digestion a eu lieu. Les allèles sauvages du gène FLT3 génèrent des produits de 79 pb et les allèles mutants des produits de 124 pb ou 127 pb. Les amplicons non digérés ont 147 pb (les tailles de produit correspondent aux résultats obtenus avec l'étalon GeneScan™ - 600™ LIZ Size Standard v2.0 et l'instrument ABI3500xL. L'utilisation d'étalons de taille différente et d'instruments différents pourrait produire des tailles de produit différentes).

II.12.1.3. Conservation et manipulation

Si le kit de test n'est pas utilisé immédiatement, il doit être conservé entre -65 °C et -85 °C. La température de conservation optimale des ADN contrôles est de 2 °C à 8 °C, mais les ADN contrôles peuvent également être conservés entre -65 °C et -85 °C. Tous les réactifs et les contrôles doivent être décongelés et agités ou mélangés soigneusement avant utilisation pour une remise en suspension complète. Un vortexage excessif pourrait endommager l'ADN et causer la perte des fluorophores des amorces marquées.

Les matériels sont stables jusqu'à la date de péremption figurant sur l'étiquette lorsqu'ils sont conservés et manipulés conformément aux instructions. Ne pas utiliser les kits au-delà de leur date de péremption.

En raison de la concentration élevée en sel, les mélanges mères (master mixes) de PCR sont sensibles aux cycles de congélation/décongélation. Si nécessaire, aliquote les mélanges mères (master mixes) en cryotubes à bouchon à vis avec joint.

II.12.1.4. Instruments

II.12.1.4.1. Thermocycleur

Utilisation ou fonction : amplification d'échantillons d'ADN

Instrument suggéré : thermocycleur Veriti™ Dx ou équivalent

Caractéristiques de performance et spécifications : Plage de température minimale (15 °C à 96 °C).

Vitesse minimale de montée en température : 0,8 °C/s

Suivre les procédures d'installation, d'utilisation, d'étalonnage et de maintenance du fabricant.

Utilisation ou fonction : détection et analyse de fragment

Caractéristiques de performance et spécifications :

Les instruments à électrophorèse capillaire suivants peuvent être utilisés pour ce test :

Analyseur génétique ABI 3130* (4 capillaires)

Analyseur génétique ABI 3130xl* (16 capillaires)

Analyseur génétique ABI 3500* (8 capillaires)

Analyseur génétique ABI 3500xL* (24 capillaires)

Suivre les procédures d'installation, d'utilisation, d'étalonnage et de maintenance du fabricant.

Les analyseurs génétiques doivent être calibrés avec le standard de matrice DS-33 Matrix Standard destiné au jeu de fluorophores Dye Set G5 (recommandé). Le standard de matrice DS-30 Matrix Standard pour le jeu de fluorophores Dye Set D peut être utilisé avec les séries 3130 (autre possibilité). Utiliser les paramètres par défaut correspondant à votre type de polymère et de capillaire.

II.12.1.4.2. Substances Interférentes

Les substances suivantes sont connues pour interférer avec la PCR :

- Chélateurs de cations divalents
- Pointes de pipette à faible rétention
- EDTA (non significatif à faible concentration)
- Héparine
- Cellules en suspension dans un fixateur, par exemple l'acide acétique, le B5, etc.

II.12.1.4.3. Conditions de prélèvement et manipulation

Ce test analyse l'ADN génomique provenant des sources suivantes :

- Sang périphérique ou aspiration de moelle osseuse anticoagulée avec de l'héparine, de l'EDTA ou de l'ACD, ou cellules mononucléaires isolées

auparavant fraîches dans un milieu approprié (RPMI ou similaire) ou congelées dans un milieu de cryoconservation approprié.

- Le sang périphérique et les aspirations de moelle osseuse peuvent être conservés entre 2 °C et 8 °C pendant 7 jours et donner encore des résultats fiables. Les cellules mononucléaires isolées peuvent être conservées pendant 7 jours maximum ou indéfiniment si une méthode de cryoconservation adéquate est utilisée.
- 500 ng d'ADN génomique (conservé entre 2 °C et 8 °C ou à une température inférieure à -15 °C et expédié à température ambiante, dans des conditions fraîches ou sur de la glace sèche).

II.12.2. Préparation de l'échantillon

Extraire l'ADN génomique des échantillons du patient dès que possible. Les échantillons d'ADN sont calibrés pour une concentration finale de 50 µg/ml. 7.5.

II.12.3. Conservation des échantillons

L'ADN génomique doit être conservé entre 2 °C et 8 °C ou à une température inférieure à -15 °C.

II.12.4. Contrôle qualité

Les contrôles positifs et négatifs (ou normaux) sont fournis avec le kit et doivent être analysés une seule fois à chaque fois que l'analyse est réalisée pour assurer une performance correcte de l'analyse. De plus, un contrôle négatif sans ADN (par ex. de l'eau) doit aussi être inclus pour tester la contamination du mélange mère (master mix) ou la contamination croisée des réactions PCR due à une technique incorrecte. Un contrôle tampon peut aussi être ajouté afin de garantir l'absence de contamination du tampon employé pour remettre en suspension les échantillons.

II.12.5. Interprétation des résultats

Les résultats positifs et négatifs doivent être interprétés en tenant compte de toutes les informations cliniques et des résultats des analyses biologiques.

La plage de taille attendue pour chaque mélange mère (master mix) a été déterminée en analysant les échantillons contrôles négatifs et positifs. Pour une interprétation précise et significative, il est important d'ignorer les pics situés en dehors de la plage de taille attendue de chaque mélange mère (master mix).

Notez que selon l'instrument ABI, il peut exister une variabilité de +/-1 pb de la taille du fragment.

II.12.6. Analyse

- Les échantillons pour lesquels l'amplification échoue après des essais répétés doivent être signalés comme suit « Aucun résultat ne peut être fourni concernant cet échantillon car il contenait de l'ADN en quantité ou qualité insuffisante pour l'analyse ».

- Les amorces du mélange mère (master mix) FLT3 ITD Master Mix comportent les mentions FAM (en bleu) et HEX (en vert), correspondant respectivement à l'amorce sens et anti sens. Les pics de type sauvage (327 pb) et mutants (tout pic \geq 330 pb) doivent comporter à la fois un pic bleu et le pic vert correspondant pour être considérés comme des pics effectifs.

- Les amorces du mélange mère (master mix) FLT3 TKD comportent uniquement la mention FAM. Un résultat FLT3 TKD positif correspond à un pic mutant qui est \geq 1 % du pic de type sauvage. Pour calculer cette valeur, diviser la hauteur du pic mutant (124 pb ou 127 pb pour les échantillons patient et 124 pb pour le contrôle positif) par la hauteur du pic de type sauvage (79 pb). Un résultat négatif aura un pic mutant qui est $<$ 1,0 % du pic de type sauvage.

- Tous les contrôles des tests doivent être examinés avant l'interprétation des résultats des échantillons. Si les contrôles ne fournissent pas les résultats attendus, l'analyse n'est pas fiable et les échantillons ne doivent pas être interprétés.

II.12.7. Limites de la procédure

- Ce test n'identifie pas 100 % des mutations activatrices FLT3.
- Ce test ne peut détecter de manière fiable moins de 5 cellules positives pour 100 cellules normales. Les résultats des tests moléculaires doivent toujours être interprétés dans le contexte de données cliniques, histologiques et immunophénotypiques.
- Les analyses PCR sont sujettes à des interférences dues à la dégradation de l'ADN ou à l'inhibition de la PCR par l'EDTA, l'héparine ou d'autres agents. (Murphy, KM. et al., 2003 - Yamamoto, Y. et al., 2001).

III/ MATERIELS ET METHODES

La protéine FLT3 est composée par cinq domaines extracellulaires (E) de type immunoglobuline, un domaine transmembranaire (TM), un domaine juxta-membranaire (JM) et deux domaines tyrosine kinase (TKD) (Llopis et al., 2009). La détection de la mutation ITD du gène **FLT3** représente un marqueur pronostic important dans les LAM.

De ce fait, ce présent travail consiste à une méta-analyse regroupant les études tirées de la littérature en relation directe avec notre objectif en utilisant la base de données PubMed (publications parues entre 2000 et 2020). Ce qui nous permettra de faire une analyse plus précise des données et de tirer une conclusion globale.

Dans la présente méta-analyse, nous avons pris les résultats provenant de différentes études afin de mettre en évidence l'impact du *FLT3* dans le pronostic des Leucemies Myeloïdes Aigues (LMA). De chaque étude incluse dans cette méta-analyse, nous avons extrait les données suivantes : Nom des auteurs, année de la publication, pays, l'âge et le sexe de la population d'étude, répartitions génotypiques et fréquence des mutations de la FLT3-ITD dans les LMA. Les études prospectant l'implication de cette mutation dans la survenue des LMA de manière générale (les LAM non défini) ont été exclues.

Les études sélectionnées :

Les études ainsi sélectionnées ont été classé selon les critères suivants :

- Une exploration de l'association de la mutation FLT3-ITD et le risque d'occurrence d'une LAM ; c'est le cas de l'étude de Abu-Duhier *et al.* (2000) et l'étude de Semary *et al.* (2020);

une étude de type cas-témoins établie selon des critères définis (construction de deux groupes indépendants; patients et témoins, avec des critères bien définis de chaque groupe) ; c'est le cas des études d'Auewarakul *et al* (2005) d'Emami *et al.* (2009) et de Dehbi *et al.* (2013) portant sur la relation entre la mutation FLT3-ITD et l'âge. En revanche les études de Schnittger *et al.* (2002), de Wang *et al.* (2005) et de Knapper *et al.* (2006) se sont focalisées sur l'impact du sexe et le risque d'occurrence d'une LAM avec FLT3-ITD (+).

III/ DISCUSSION

-Dans une étude publiée par Abu-Duhier.F.M, A. C. Goodeve, G. A. Wilson, et All en 2000, portant sur : FLT3 internal tandem duplication mutations in adult acute myeloid leukaemia define a high-risk group, il a été inclus 106 patient atteints de LMA avec risque cytogénétique standard dont 64 hommes et 42 femmes, avec une tranche d'âge qui varie entre 15 et 74 ans. Sur les 106 cas, 14 cas avaient une LMA avec mutation de FLT3 en ITD analysé au début du diagnostic par PCR et polyacrylamide gel en exons 11 et 12 du gène FLT3.

Selon la classification de FAB, 4 cas des 14 cas étaient des LMA phénotype M1, 1 cas était une LMA phénotype M3.

22,7% des patients avaient un risque standard, 6,5% avaient un risque bas et le reste avaient un risque élevé.

La régression logistique faite par kaplan et Meler trouve que les patients sans mutation de FLT3 avaient une survie de 29,1 mois, contrairement aux patients avec mutation de FLT3 en ITD avaient une survie de 12,8 mois et que ces patients sont décédés après un intervalle de 18 mois du diagnostic, mis à part un patient qui est resté vivant.

Cette étude a montré également l'importance de l'analyse de la séquence nucléotidique des patients 1 ± 3 dans cette étude avaient une insertion de copies presque parfaites de séquences flanquantes dérivées entièrement de l'exon 11.

Ces duplications en tandem prédisent le cadre d'insertion de résidus d'acides aminés codés par ces séquences exoniques similaires à celles rapportées précédemment dans la même région chez d'autres patients atteints de LMA (**Nakao et al, 1996; Yokota et al, 1997**). Les Produits protéiques mutés impliquant les séquences d'intron 11 et d'exon 12 ont également étaient signalées par ces auteurs.

Une analyse plus approfondie révèle que la séquence dupliquée est encore une fois une copie presque parfaite de la séquence modèle dont il est dérivé, trois bases dont une transversion 8 pb à partir de l'extrémité 3' du séquence .

Il est fascinant que cette variante soit dans une séquence dérivée de l'exon 11 ± intron 11 d'origine séquence consensus du site d'épissage. En effet, il en résulte la suppression du dinucléotide GT essentiellement invariant.

-Une autre étude publiée par Samah Fathy Semary, Mahmoud Hammad, Sonya Soliman et al. en 2020, portant sur : Outcome of Childhood Acute Myeloid Leukemia With FLT3-ITD Mutation: The Experience of Children's Cancer Hospital Egypt, 2007-17 qui montre la présence d'une mutation de duplication en tandem interne (ITD) de type tyrosine kinase 3 (FLT3) de type FMS dans la leucémie myéloïde aiguë pédiatrique (LMA) est associée à des taux élevés d'échec d'induction et à une survie moindre. Sa présence place le patient dans un groupe à haut risque. Nous visons à décrire le résultat de la LMA pédiatrique avec mutation FLT3-ITD.

Ils ont réalisé une analyse rétrospective des cas de LMA de juillet 2007 à juillet 2017 à l'hôpital Children's Cancer Egypt.

Comme résultat : 71 patients avaient une mutation du gène FLT3 sur 687 patients atteints de LMA. 65 patients avaient une mutation du gène FLT3 avec un rapport allélique > 0,4; 43 (66,1%) des 65 patients ont présenté une rémission complète (RC). Sur les 43 patients, 16 patients ont maintenu une RC, 18 patients ont rechuté après la première RC, 8 patients sont décédés et 1 patient a été perdu de vue. Les patients atteints d'une maladie récurrente sont décédés après une chimiothérapie de sauvetage, à l'exception d'un patient, qui était en vie après la deuxième RC. Une greffe de moelle osseuse allogénique (allo-BMT) a été réalisée pour 9 (13,8%) des 65 patients en première RC, dont 8 étaient vivants et en RC, et 1 patient a fait une rechute et est décédé. 7 patients (10,7%) étaient vivants sans allo-BMT. La survie globale et sans événement de 3 ans pour les patients porteurs d'une mutation FLT3-ITD avec un rapport allélique élevé était de 26,9% et 22,8%, respectivement. La survie globale et sans événement à trois ans des patients traités par allo-BMT était de 77,8% et 78,8%, respectivement, par rapport aux patients traités sans allo-BMT, respectivement 16,3% et 12,8%.

Donc la mutation FLT3-ITD dans la LMA pédiatrique était associée à de mauvais résultats thérapeutiques et la survie des patients en rechute était extrêmement faible. Allo-BMT en première rémission était la meilleure option de

traitement. D'autres greffes de donneurs et inhibiteurs de FLT3 sont nécessaires pour améliorer les résultats dans les pays en développement. Des études récentes sur la génétique et la biologie de la LMA ont identifié de nouvelles cibles thérapeutiques et ont conduit au développement de nouvelles thérapies.

-Des mutations dans les cellules de la moelle osseuse de la lignée myéloïde ou dans les cellules filles myéloïdiennes conduisent à l'apparition des LMA. Le fait que le gène *FLT3* est exprimé de façon importante dans les LMA, le rend un candidat idéal à l'étude et la survie et la prolifération des blastes leucémiques de type 1. En effet, il existe deux types de la mutation du gène FLT3 à savoir mutation du FLT3-ITD et la mutation du gène FLT3-TKD. Ces deux types de mutations conduisent à la dimérisation, à l'activation et l'autophosphorylation du récepteur de façon constitutive (**Mrózek et al., 2007**).

L'impact pronostique des FLT3-ITD est de mieux en mieux connu. La connaissance du ratio entre la quantité de l'allèle muté et celle de l'allèle sauvage est très importante car plus le ratio est élevé (en faveur de la forme muté), jusqu'à la perte de l'hétérozygotie, plus le pronostic est péjoratif (**Whitman et al., 2001**) ;

L'étude de **Dorgham et al (2014)** portant sur l'exploration de la mutation FLT3-ITD dans la leucémie myéloïde aigue dans la population Algérienne chez 50 patients atteints de LAM en utilisant la technique PCR (exons 14 et 15 du gène FLT3), a permis de détecter cette mutation chez 5 cas, ce qui présente une fréquence 0,1 dans l'échantillon de cette étude. Cette fréquence est nettement inférieure comparée à la fréquence rapportée par l'étude de **Dehbi et al. (2013)**, réalisée en Maroc sur un échantillon de 33 malades et dont la fréquence a été estimée à 0,3. L'étude d'**Emami et al. (2009)** ont rapporté une fréquence de 0,32 et qui demeure jusqu'à présent la fréquence la plus importante dans la détection de la mutation FLT3-ITD.

-Généralement, 30% des patients atteints de LAM abritent une forme de mutation FLT3, et apparait généralement chez le quart des patients adultes. L'incidence de la mutation FLT3- varie selon l'âge (**Dicker et al., 2010**). L'étude de **Dehbi et al. (2013)** a montré que les patients présentant une mutation FLT3-ITD étaient plus âgés que le groupe de type sauvage (37 ans vs 30 ans). Cette observation était comparable à celle obtenue par l'étude d'**Auewarakulet al (2005)** et l'étude d'**Emami et al.**

(2009) où l'âge moyen de la mutation FLT3-ITD chez ces patients était estimé à 30 ans et à 33 ans respectivement. Bien que ces résultats soient en concordance avec la littérature, dans l'ensemble, il semble qu'il n'y a pas de relation significative entre la mutation FLT3-ITD et l'âge médian. Car selon Journal of Clinical Cancer Research, l'âge moyen des patients atteints de LAM avec une FLT3-ITD étaient de 52 ans comparés avec les patients atteints de LAM sans FLT3-ITD, qui était estimé à 48 ans (avec valeur *P* non significative).

Dans ce type de cancer, il semble qu'il n'y a pas de relation significative entre le sexe et la mutation FLT3-ITD (**Schnittger et al., 2002**). En effet, selon les résultats d'**Emami et al. (2009)**, 69,2% des patients atteints de LAM avec mutation FLT3-ITD étaient des hommes et 30,8% d'entre eux étaient des femmes. Le ratio hommes / femmes était de 2,25 / 1 et il n'y avait pas de relation significative entre le sexe et la mutation FLT3-ITD (valeur *P* = 0,209). A l'instar, des résultats des études antérieures, la mutation chez les femmes était plus prévalent que chez les hommes; environ 52% des patients atteints de LAM avec FLT3-ITD (+) étaient des femmes et 48% d'entre eux étaient mâle, ce qui n'était pas significatif (*P* = 0,5) (**Wang et al., 2005 ; Knapper et al., 2006**).

L'impact de la mutation FLT3-ITD peut varier amplement selon les différents contextes; bien que la FLT3-ITD soit plus commune dans le type de leucémie promyélocytaire aigue (APL) et est associée à une leucocytose, (**Barragan et al., 2011**). Généralement, l'impact de la mutation FLT3-ITD est négativement prononcé sur la prise en charge clinique pour tous les stades de la maladie (**Mead et al., 2007**).

IV/ CONCLUSION ET RECOMMANDATION

Ce travail a pour but de fournir des renseignements sur les leucémies aiguës myéloïdes (LAM). Cette maladie peut se déclarer à tout âge et est plus susceptible de se développer chez les adultes de 65 ans et plus que chez les personnes plus jeunes. La découverte des mutations qui apparaît très importante chez les patients atteints de LAM notamment la mutation du gène *FLT3* de type ITD qui est détectée dans 30% des échantillons de LAM. Cela incite à poursuivre le développement des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) comme traitement spécifique des leucémies. Néanmoins, la plupart des patients traités en monothérapie, et une proportion importante de ceux traités en association rechutent en raison de mécanismes de résistance développés par la cellule pour échapper à l'action des ITK. L'étude de ces mécanismes représente donc un enjeu essentiel afin d'améliorer l'efficacité des traitements dans les LAM *FLT3*-ITD.

La détection de la mutation *FLT3*-ITD chez tous les patients LMA demeure nécessaire au moment du diagnostic car actuellement le dilemme se confronte les cliniciens dans le traitement des LMA à *FLT3*-ITD ITD positive, est la conduite à tenir pour une meilleure induction et consolidation lors de la prise en charge chimiothérapeutique (Levis, 2013).

La détection de la mutation ITD du gène *FLT3* permis de mettre en évidence les LMA de la et représente un marqueur pronostic important.

L'implantation de cette technique au niveau des Etablissements Hospitalo-Universitaires permettra la détection de cette mutation comme une technique routine pour les cas de LAM afin d'envisager le traitement approprié. Par ailleurs, cette analyse moléculaire permet l'enrichissement des connaissances concernant les leucémies en Algérie, vu l'absence quasi totale de données épidémiologique.

Cependant, les cliniciens dans leur pronostic s'appuient sur des données rapportées par des études menées sur des populations autres qu'Algériennes De ce fait, des études de corrélation entre la présence/l'absence de la mutation *FLT3*- ITD et la réponse à la chimiothérapie pourra optimiser les traitements et de mieux évaluer l'impact de la mutation chez les cas de LMA dans la population Algérienne.

V/ REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE.

1/ Gilliland, D. G., and Tallman, M. S. (2002). Focus on acute leukemias. *Cancer Cell* 1, 417-420.

2/Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R., and Sultan, C. (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 33, 451-458.

3/ Vardiman, J. W., Harris, N. L., and Brunning, R. D. (2002). The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 100, 2292-2302.

4/ Abu-Duhier, F. M., Goodeve, A. C., Wilson, G. A., Care, R. S., Peake, I. R., and Reilly, J. T. (2001). Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 113, 983-988.

5/ Ozeki, K., Kiyoi, H., Hirose, Y., Iwai, M., Ninomiya, M., Koder, Y., Miyawaki, S., Kuriyama, K., Shimazaki, C., Akiyama, H., *et al.* (2004). Biologic and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia. *Blood* 103, 1901-1908.

6/ Park, S. H., Chi, H. S., Min, S. K., Cho, Y. U., Jang, S., Park, C. J., Lee, J. H., Lee, K. H., Im, H. J., and Seo, J. J. (2011). Prognostic significance of the FLT3 ITD mutation in patients with normal-karyotype acute myeloid leukemia in relapse. *Korean J Hematol* 46, 88-95.

7/ Llopis, L., Boissel, N., Nibourel, O., Wemeau, M., Renneville, A., Dombret, H., and Preudhomme, C. (2009). acute myeloid leukemia, mutations, prognostic value, molecular biology. *Hématologie* 15, 17.

8/ Bayle, Julie, Dubreuil, and Patrice (2004). La famille des récepteurs hématopoïétiques à activité tyrosine kinase, Vol 10, (Montrouge, FRANCE: John Libbey Eurotext).

9/ Stirewalt, D. L., and Radich, J. P. (2003). The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer* 3, 650-665.

10/ Hannum, C., Culpepper, J., Campbell, D., McClanahan, T., Zurawski, S., Bazan, J. F., Kastelein, R., Hudak, S., Wagner, J., Mattson, J., and et al. (1994). Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs. *Nature* 368, 643-648.

11/ Lyman, S. D., James, L., Vanden Bos, T., de Vries, P., Brasel, K., Gliniak, B., Hollingsworth, L. T., Picha, K. S., McKenna, H. J., Splett, R. R., and et al. (1993). Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells. *Cell* 75, 1157-1167.

12/ Small, D. (2006). FLT3 Mutations: Biology and Treatment. *ASH Education Program Book 2006*, 178-184.

13/ Stirewalt, D. L., and Radich, J. P. (2003). The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nat Rev Cancer* 3, 650-665.

14/ Nakao, M., Yokota, S., Iwai, T., Kaneko, H., Horiike, S., Kashima, K., Sonoda, Y., Fujimoto, T., and Misawa, S. (1996). Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 10, 1911-1918.

15/ Gagyí, E., Horvath, E., Bodor, C., Timar, B., Matolcsy, A., and Pavai, Z. (2006). Prognostic significance and detection of the internal tandem duplication of the FLT3 gene in acute myeloid leukemia. *Rom J Morphol Embryol* 47, 331-337.

16/ Yanada, M., Matsuo, K., Suzuki, T., Kiyoi, H., and Naoe, T. (2005). Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication and tyrosine kinase domain mutations for acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Leukemia* 19, 1345-1349.

17/ Griffith, J., Black, J., Faerman, C., Swenson, L., Wynn, M., Lu, F., Lippke, J., and Saxena, K. (2004). The structural basis for autoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell* 13, 169-178.

18/ Schlenk, R. F., Dohner, K., Krauter, J., Frohling, S., Corbacioglu, A., Bullinger, L., Habdank, M., Spath, D., Morgan, M., Benner, A., et al. (2008). Mutations and

treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* 358, 1909-1918.

19/ Mead, A. J., Linch, D. C., Hills, R. K., Wheatley, K., Burnett, A. K., and Gale, R. E. (2007). FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favorable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 110, 1262-1270.

20/ Whitman, S. P., Archer, K. J., Feng, L., Baldus, C., Becknell, B., Carlson, B. D., Carroll, A. J., Mrozek, K., Vardiman, J. W., George, S. L., *et al.* (2001). Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res* 61, 7233-7239.

21/ Passweg, J. R., Chalando, Y., Matthes, T., and Beris, P. 2008. Les leucémies aigues. *Rev Med Suisse* 4, 1272-1278.

22/ Benakli, M. Approche épidémiologique des leucémies aigues myéloïdes en Algérie. 2009. *Revue Algérienne d'hématologie* 01, 22-55.

23/ Mrozek, K., Heerema, N. A., and Bloomfield, C. D. (2004). Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev* 18, 115-136.

24/ Stone, R. M., O'Donnell, M. R., and Sekeres, M. A. (2004). Acute Myeloid Leukemia. *ASH Education Program Book 2004*, 98-117.

25/ Döhner, K., and Döhner, H. (2008). Molecular characterization of acute myeloid leukemia. *Haematologica* 93, 976-982.

26/ Scheijen B, Griffin JD. Tyrosine kinase oncogenes in normal hematopoiesis and hematological disease. *Oncogene* 2002; 21: 3314–33. [Google Scholar]

27/ Anne Fernandez-Vidal, Anne Mazars, Emilie-Fleur Gautier, Grégoire Prévost, Bernard Payrastre, Stéphane Manenti. 2009 May 1;8(9):1373-9.

28/ Mendez, L.; Chen, M.; Pandolfi, P.P. Molecular Genetics of APL. In *Acute Promyelocytic Leukemia: A Clinical* 2018

29/ J. W. Vardiman, J. Thiele, D. A. Arber et al., “The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes,” *Blood*, vol. 114, no. 5, pp. 937–951, 2009.

30/ Murphy, KM. et al., (2003). Detection of FLT3 Internal Tandem Duplication and D835 Mutations by a Multiplex Polymerase Chain Reaction and Capillary Electrophoresis Assay. *The Journal of Molecular Diagnostics* 5, 96 – 102.

31/ Yamamoto, Y. et al., (2001). Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 97, 2434-2439.

32/ Mead, A. J., Linch, D. C., Hills, R. K., Wheatley, K., Burnett, A. K., and Gale, R. E. (2007). FLT3 tyrosine kinase domain mutations are biologically distinct from and have a significantly more favorable prognosis than FLT3 internal tandem duplications in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 110, 1262-1270.

33/ Levis, M. (2013). FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013? *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program*, 220

34/ Barragan, E., Montesinos, P., Camos, M., Gonzalez, M., Calasanz, M. J., Roman-Gomez, J., Gomez-Casares, M. T., Ayala, R., Lopez, J., Fuster, O., *et al.*(2011). Prognostic value of FLT3 mutations in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline monochemotherapy. *Haematologica* 96, 1470-1477.

35/ Mrózek K., et al. (2007). Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetic: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood*, 109(2), p.431-448.

36/ Whitman, S. P., Archer, K. J., Feng, L., Baldus, C., Becknell, B., Carlson, B. D., Carroll, A. J., Mrozek, K., Vardiman, J. W., George, S. L., *et al.* (2001). Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res* 61, 7233-7239.

37/ Dicker, F., Haferlach, C., Sundermann, J., Wendland, N., Weiss, T., Kern, W., Haferlach, T., and Schnittger, S. (2010). Mutation analysis for RUNX1, MLL-PTD, FLT3-ITD, NPM1 and NRAS in 269 patients with MDS or secondary AML. *Leukemia* 24, 1528-1532

38/ Dorgham, S., Aberkane, M., Boughrara, W., Antar Soltan, B., Mehalhal, N., Touhami, T., Sidimansour, N., Merad Boudia, N., Louhibi, L., and Boudjema, B. Association des polymorphismes du gène méthylène-tétrahydrofolate réductase avec la leucémie myéloïde chronique. (2014). *Bulletin du Cancer* 101, 803-807.

39/ Emami, A. H., Shekarriz, R., Meysamie, A., Sharifian, R., Safaei, R., Toogheh, G., Keihani, M., and Shekarriz, R. (2009). fms Like Tyrosine kinase3- Internal Tandem Duplication (FLT3-ITD) in Acute Myeloid Leukemia, Mutation Frequency and its Relation with Complete Remission, 2007- 2008. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research* 3, 14-20.

40/ Dehbi, H., Kassogue, Y., Nasserddine, S., Quessar, A., and Nadifi, S. (2013). FLT3-ITD Incidence and FLT-D835 Mutations in Acute Myeloid Leukemia Patients with Normal Karyotype in Morocco: A Preliminary Study, Vol 4).

41/ Auewarakul CU, Sritana N, Limwongse C, Thongnoppakhun W, Yenchitsomanus PT. Mutations of the FLT3 gene in adult acute myeloid leukemia: Determination of incidence and identification of a novel mutation in a Thai population. *Cancer Genet Cytogenet* 2005; 162(2):127-34.

42/ Schnittger S, Schoch C, Dugas M, et al. Analysis of FLT3 Length Mutations in 1003 Patients with AML: Correlation to Cytogenetics, FAB Subtype, and Prognosis in the AMLCG Study and Usefulness as a Marker for the Detection of Minimal Residual Disease. *Blood*, 2002; (100): 59- 66:

43/ Wang L, Lin D, Zhang X, et al: Analysis of FLT3 Internal Tandem Duplication and D835 Mutations in Chinese Acute Leukemia Patients. *Leuk Res*, 2005; 29(12): 1393-8.

44/ Knapper S, Mills KJ, Gilkes AF, et al. The Effects of Lestauritinib (CEP701) and PKC412 ON Primary AML Blasts: The Induction of Cytotoxicity Varies with Dependence on FLT3 Signaling in both FLT3- mutated and Wild- type Cases. *Blood*, 2006; 108: 3494-350

45/ Grafone T, Palmisano M, Nicci C, Storti S. An overview on the role of FLT3- tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia:biology and treatment. *Oncol Rev*. 2012;6:e8.

46/ O'Donnell MR, Tallman MS, Abboud CN, Altman JK, Appelbaum FR, Arber DA, et al. Acute myeloid leukemia, version 3.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw*. 2017;15:926–57.

47/ Levis M. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013? *Hematol Am Soc Hematol Educ Pro-gram*. 2013;2013:220–6.

48/ Kottaridis PD, Gale RE, Linch DC. Flt3 mutations and leukae- mia. *Br J Haematol*. 2003;122:523–38.

49/ Shih LY, Huang CF, Wu JH, Lin TL, Dunn P, Wang PN, et al. Internal tandem duplication of FLT3 in relapsed acute myeloid leukemia: a comparative analysis of bone marrow samples from 108 adult patients at diagnosis and relapse. *Blood*. 2002;100:2387–92.

50/ Kronke J, Bullinger L, Teleanu V, Tschurtz F, Gaidzik VI, Kuhn MW, et al. Clonal evolution in relapsed NPM1-mutated acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013;122:100–8.

51/ J. W. Vardiman, J. Thiele, D. A. Arber et al., “The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and impor- tant changes,” *Blood*, vol. 114, no. 5, pp. 937–951, 2009.

52/ Murphy, KM. et al., (2003). Detection of FLT3 Internal Tandem Duplication and D835 Mutations by a Multiplex Polymerase Chain Reaction and Capillary Electrophoresis Assay. *The Journal of Molecular Diagnostics* 5, 96 – 102.

53/ Yamamoto, Y. et al., (2001). Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 97, 2434-2439.

54/ Stone RM, N and al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N Engl J Med*. 2017 Aug 3;377(5):454-464.

55/ Anne Fernandez-Vidal , Anne Mazars, Emilie-Fleur Gautier, Grégoire Prévost, Bernard Payrastre, Stéphane Manenti. 2009 May 1;8(9):1373-9.

- 56/ Yee KWSM, O'Farrell AM, Town AR, McGreevey L, Bainbridge T, Cherrington JM, Heinrich MC. Synergistic effect of SU11248 with cytarabine or daunorubicin on FLT3 ITD-positive leukemic cells. *Blood*. 2004;104(1):4202–9.
- 57/ Teng CLYC, Hwang WL, Tsai JR, Liu HC, Hwang GY, Hsu SL. Effector mechanisms of sunitinib-induced G1 cell cycle arrest, differentiation, and apoptosis in human acute myeloid leukaemia HL60 and KG-1 cells. *Ann Hematol*. 2013;92(3):301–13.
- 58/ Fiedler WKS, Kebenko M, Janning M, Krauter J, Schittenhelm M, Gotze K, Weber D, Gohring G, Teleanu V, Thol F, Heuser M, Dohner K, Ganser A, Dohner H, Schlenk RF. A phase I/II study of sunitinib and intensive chemotherapy in patients over 60 years of age with acute myeloid leukaemia and activating FLT3 mutations. *Br J Haematol*. 2015;169(5):694–700.
- 59/ Fiedler WSH, Dohner H, Schwittay M, Ottmann OG, O'Farrell AM, Bello CL, Allred R, Manning WC, Cherrington JM, Louie SG, Hong W, Brega NM, Massimini G, Scigalla P, Berdel WE, Hossfeld DK. A phase 1 study of SU11248 in the treatment of patients with refractory or resistant acute myeloid leukemia (AML) or not amenable to conventional therapy for the disease. *Blood*. 2005;105(3):986–93.
- 60/ Ruella MKS, Shestova O, Fraietta JA, Qayyum S, Zhang Q, Maus MV, Liu X, Nunez- Cruz S, Klichinsky M, Kawalekar OU, Milone M, Lacey SF, Mato A, Schuster SJ, Kalos M, June CH, Gill S, Wasik MA. The addition of the BTK inhibitor ibrutinib to anti-CD19 chimeric antigen receptor T cells (CART19) improves responses against mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2016;22(11):2684–96.
- 61/ O'Farrell AMFJ, Fiedler W, Serve H, Paquette RL, Cooper MA, Yuen HA, Louie SG, Kim H, Nicholas S, Heinrich MC, Berdel WE, Bello C, Jacobs M, Scigalla P, Manning WC, Kelsey S, Cherrington JM. An innovative phase I clinical study demonstrates inhibition of FLT3 phosphorylation by SU11248 in acute myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res*. 2003;9(15):5465–76.

62/ Ouchida ATLY, Geng J, Najafov A, Ofengeim D, Sun X, Yu Q, Yuan J. Synergistic effect of a novel autophagy inhibitor and Quizartinib enhances cancer cell death. *Cell Death Dis.* 2018;9(2):138.

63/ G-CI JH, Nerreter T, Thomas S, Rydzek J, Meijide JB, Bonig H, Herr W, Sierra J, Einsele H, Hudecek M. CAR T-cells targeting FLT3 have potent activity against FLT3(-)ITD(+) AML and act synergistically with the FLT3-inhibitor crenolanib. *Leukemia.* 2018;32(5):1168–79.

64/ Miller, S. A., Dykes, D. D., and Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16.

65/ Pinheiro, R. F., de Sá Moreira, E., Silva, M. R. R., Alberto, F. L., and Chauffaille, M. d. L. L. F. (2008). FLT3 internal tandem duplication during myelodysplastic syndrome follow-up: a marker of transformation to acute myeloid leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 183, 89-93.

RESUME

Les Leucémies Aiguës Myéloblastiques (LMA) forment un groupe hétérogène d'hémopathies malignes définies par une prolifération incontrôlée de cellules myéloïdes immatures et leurs accumulations dans la moelle et le sang de progéniteurs hématopoïétiques. La mutation FLT3-ITD entraîne une activation constitutive du récepteur à activité tyrosine kinase FLT3, et qui généralement retrouvée dans 20-25% des LMA. Une meilleure compréhension des mécanismes oncogéniques de FLT3-ITD ainsi que leurs diagnostic sont donc nécessaire afin d'améliorer le traitement des LMA.

ABSTRACT

Acute Myeloblastic Leukemias (LAM) are a heterogeneous group of malignant hemopathies defined by an uncontrolled proliferation of immature myeloid cells and their accumulations in the marrow and blood of hematopoietic progenitors. The FLT3-ITD mutation leads to constitutive activation of the receptor with tyrosine kinase activity FLT3, and which is generally found in 20-25% of AML. A better understanding of the oncogenic mechanisms of FLT3-ITD as well as their diagnostic is therefore necessary in order to improve the treatment of LAM.

ملخص

ابيضاض الدم النقوي الحاد (LAM) هو مجموعة غير متجانسة من اختلالات الدم الخبيثة التي يتم تحديدها من خلال الانتشار غير المنضبط للخلايا النخاعية غير الناضجة وتراكماتها في نخاع العظم والدم. تؤدي طفرة FLT3-ITD إلى التنشيط التأسيسي للمستقبل FLT3 مع نشاط التيروسين كيناز ، والذي يوجد بشكل عام في 20-25% من LAM . لذلك فإن الفهم الأفضل للآليات المسببة للأورام ل FLT3-ITD وكذلك تشخيصها ضروريان لتحسين علاج LAM.