

République Algérienne Démocratique et Populaire
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE EL-HADJ LAKHDAR
BATNA



FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MEMOIRE

Pour l'obtention du diplôme de

MAGISTER

Option : Biochimie appliquée

THEME :

RECHERCHE DE NOUVEAUX BIOMARQUEURS DANS LE
DIAGNOSTIC DES CANCERS

Présenté par :

Mr : KALLA Adel

Devant le jury :

 HAMBABA L.	MC, Université de Batna	Présidente
 YAHIA M.	MC, Université de Batna	Rapporteur
 LAROUÏ S.	MC, Université de Batna	Examineur
 ZAAMA D.	MC, Université de Constantine	Examinatrice
 AMEDDAH S.	MC, Université de Constantine	Examinatrice
 BOUSSELSA H.	CC, Université de Batna	Examineur

REMERCIEMENTS

C'est au terme de ce travail de mémoire que je me rends compte combien la contribution de nombreuses personnes a été indispensable à sa réalisation..

Exprimer ses remerciements de manière juste et équitable est un exercice très délicat et longtemps remodelé. Mais que tout ceux qui m'ont apporté leur aide matérielle où morale trouvent ici l'expression sincère de ma reconnaissance.

*Je tiens cependant à faire savoir au Docteur **Yahia Mouloud**, combien je suis gêné de ne pouvoir trouver les justes mots pour lui exprimer mes sentiments de reconnaissance pour sa prise en charge, sa disponibilité, son savoir et son savoir faire dont il m'a gratifié tout le long de ce travail. Qu'il trouve dans ces lignes l'expression de ma profonde gratitude.*

*Mes remerciements s'adressent également à toute l'équipe du laboratoire d'hématologie du CHU de Batna et particulièrement à Mlle. **T'kouti Amel** pour leur aide inestimable dans la collecte combien difficile des échantillons.*

*Cette reconnaissance s'adresse en particulier au **Pr. Jean Louis Guéant** chef de service et directeur du laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire du CHU de Nancy et son 'équipe qui m'ont offert les moyens d'analyse nécessaires à la réalisation de ce mémoire. Sans leur contribution, ce travail n'aurait vu le jour.*

*Je ne peux oublier le **Dr Hambaba. L** pour ses conseils et ses encouragements. Je lui suis reconnaissant pour avoir accepté de présider le jury et ce malgré ses préoccupations. Mes remerciements vont aussi aux Docteurs **Laroui salah, Zaama Djamila, Ameddah Souad et Bousselsela Houas** qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail.*

*Une place particulière est réservée au Professeur **Bendaikha.Tahar**, Doyen de la faculté des sciences pour son aide matérielle et morale, qu'il soit assuré ici de mon éternelle reconnaissance.*

Enfin je me saurais trouver le moyen d'exprimer mes remerciements et ma reconnaissance à mes parents pour leur soutien sans limites tout le long de mon parcours.

Dédicace

A ma mère

A mon père

A Mouhammed Isam

A Alla eddine

A Ayoub

A une spéciale dédicace a ma femme

A est toute ma famille

Que DIEU vous garde

KALLA Adel

TABLE DES MATIERES

Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abreviations	

Introduction

Chapitre I: Marqueurs Tumoraux

I. 1. Définition	1
I. 2. Marqueur idéal	1
I.3. Classification.....	2
I.3.1. Les marqueurs sécrétés Par la tumeur	2
I.3.1.1. Les protéines embryonnaires	2
I.3.1.2. Les marqueurs de cellules matures	2
I.3.2. Les marqueurs témoignant d'une réaction de l'hôte à l'envahissement tumoral.....	3
I.3.3. Les marqueurs tissulaires.....	3
I.4. Les méthodes de dosage.....	3

Chapitre II: L'homocysteine

II.1. Métabolisme cellulaire de l'homocysteine	4
II.1.1. Les voies de la remethylation	4
II.1.2. La voie de la transulfuration	7
II.2. L'homocystéine circulante	7
II.2.1. Les différentes formes physicochimiques d'homocysteine circulantes	7
II.2.2. Facteurs favorisant une hyperhomocysteinémie	9
II.2.2.2. Facteurs nutritionnels	10
II.2.2.3. Facteurs génétiques	14

Chapitre III: les leucémies

III.1. Leucémie lymphoïde chronique llc	16
III.1.1. Définition.....	16
III.1.2. Epidémiologie.....	16
III.1.3. Facteurs étiologique.....	16
III.1.4. Physiopathologie	17
III.1.5. Circonstances de découverte	17
III.1.5.1. Signes cliniques	17
III.1.6. Adénopathies	17
III.1.6.1. Adp superficielle	17

III.1.6.2. Les Adp profondes	18
III.1.7. Splénomégalie	18
III.1.8. Hépatomégalie	18
III.1.9. Autres Signes	18
III.1.10. Biologie	18
III.1.10.1. Hémogramme.....	18
III.1.10.2. Myélogramme	19
III.1.11. Diagnostic positif.....	20
III.1.12. Diagnostic différentiel	20
III.12.1. Les lymphocytoses polyclonales	20
III.12.2. Les lymphocytoses monoclonales	20
III.12.3. Les syndromes lymphoprolifératifs	21
III. 2. Leucémie myéloïde chronique LMC.....	21
III.2.1. Définition.....	21
III.2. 2. Etiologie.....	21
III.2.3. Epidémiologie.....	21
III.2.4. Clinique	22
III.2.4.1. Symptomatologie clinique	22
III.2.5. Arguments biologiques.....	22
III.2.5.1. Hémogramme.....	23
III.2.5.2. Médullogramme	23
III.2.5.3. Autres examens	23
III.2.6. Diagnostic positif.....	23
III.2.7. Diagnostic différentiel	23
III.2.7.1. Réactions leucémoides.....	23
III.3. Leucémie aigue	24
III.3.1. Définition.....	24
III.3.2. Etiologie.....	25
III.3.3. Signes cliniques	26
III.3.3.1. Hémogramme.....	26
III.3.3.2. Myélogramme	27
III.3.3.3. Immunophenotype	27
III.3.3.4. Cytogénétique	27
III.3.3.5. Biologie moléculaire	27

III.3.3.6. Autres anomalies biologiques	28
III.3.4. Diagnostic positif.....	28
III.3.5. Diagnostic différentiel	28
III.4. Leucémie aigue lymphoblastique.....	29

Chapitre IV: Matériel et méthodes

IV.1. Echantillonnage.....	32
IV.2. Extraction de l'ADN	32
IV.2.1. Destruction des membranes des globules blancs.....	35
IV.2.2. Elimination des protéines	35
IV.2.3. Récupération de l'ADN	36
IV.2.4. Solubilisation de l'ADN - Obtention de l'extrait	36
IV.2.5. Pureté et concentration de l'extrait.....	36
IV.2.6. Pureté.....	37
IV.2.7. Concentration	37
IV.3. PCR temps réelle.....	37
IV.3.1. Introduction	37
IV.3.2. Principe de l'appareil.....	37
IV.3.3. Détection de l'ADN avec un fluorophore, le SYBR Green.....	38
IV.3.4. Sondes d'hybridation	39
IV.3.5. Courbes de fusion.....	41
IV.4. Technique de dosage	42
IV.4.1. Homocysteine	43
IV.4.1.1. Principes de dosage.....	43
IV.5. Méthodes statistiques	44

Chapitre V: Résultats et discussions

V.1. Pour la MTHFR1 (C677T).....	45
V.2. Pour la MTHFR2 (A1298C).....	50
V.3. Pour la MS ou la MTR (A2756G).....	53
V.4. Concernant la MSR ou la MTRR (A66G)	56

Conclusion Générale

Annexe

LISTE DES FIGURES

Figure 1.Représentation du métabolisme de l'homocysteine.....	6
Figure 2. Formes circulantes de l'homocystéine.....	8
Figure 3. Acide Folique.....	11
Figure 4. Folate et synthèse de l'ADN.....	11
Figure 5. Cycle du folate.....	12
Figure 6. Vitamine B12 ou cyanocobalamine.....	13
Figure 7. Gènes des enzymes intervenant dans le métabolisme de l'homocystéine.....	15
Figure 8. Extraction de l'ADN.....	34
Figure 9. Destruction des membranes des globules blancs.....	35
Figure 10. Le Light Cyclor.....	38
Figure 11. Le fluorophore SYBR Green.....	39
Figure 12. Les sondes d'hybridation fluorescéine et LC red.....	40
Figure 13. Excitation de la fluorescéine.....	40
Figure 14. Hybridation des sondes.....	41
Figure 15. Courbe de fusion.....	42
Figure 16. Détermination du polymorphisme génétique de la MTHFR1 avec PCR en temps réel	48
Figure 17. Détermination du polymorphisme génétique de la MTHFR1 témoin avec PCR en temps réel.....	49
Figure 18. Détermination du polymorphisme génétique de la MTHFR2 avec PCR en temps réel	51
Figure 19. Détermination du polymorphisme génétique de la MTHFR2 témoin avec PCR en temps réel.....	52
Figure 20. Détermination du polymorphisme génétique de la MTR avec PCR en temps réel	54
Figure 21. Détermination du polymorphisme génétique de la MTR témoin avec PCR en temps réel	55
Figure22. Détermination du polymorphisme génétique de la MTRR avec PCR en temps réel	57
Figure 23. Détermination du polymorphisme génétique de la MTRR témoin avec PCR en temps réel	58

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Valeurs normales et pathologiques d'homocystéine.....	9
Tableau 2. Causes d'hyperhomocystéinémie.....	10
Tableau 3.. Fréquence des génotypes chez les deux populations.....	46
Tableau 4. Concentration de l'Hcy chez les différents génotypes des témoins et malades.....	47
Tableau 5. Comparaison de la concentration de l'Hcy pour la MTHFR1 entre les différents génotypes de la population malade	47
Tableau 6. Comparaison de la concentration de l'Hcy pour la MTHFR2 entre les différents génotypes de la population malade	50
Tableau 7. Comparaison de la concentration de l'Hcy pour la MS entre les différents génotypes de la population malade	53
Tableau 8. Comparaison de la concentration de l'Hcypour la MSR entre les différents génotypes de la population malade	56
Tableau 9. Résultats des paramètres biochimiques chez les sains et les malades.....	60

Liste des abréviations

MT : Marqueurs Tumoraux.

CA : Carbohydrates.

Hcy : Homocystéine.

5-MTHF : 5-MéthylèneTétraHydroFolate.

MTHFR : MéthylèneTétraHydroFolate réductase.

MAT : Méthionine-Adénosyl-Transférase.

MS ou MRS : La Méthionine synthase.

SAM : S-Adénosyl-L-Méthionine.

SAH : S-Adénosine-L-Homocystéine.

CGL : la Cystéine γ Lyase.

t-Hcy : Homocystéine totale.

CBS : Cystathionine- β -Synthase.

THF : TétraHydroFolate.

PL : Pyridoxal.

PN : Pyridoxine.

PM : Pyridoxamine.

PLP : Pyridoxal 5'-phosphate.

PMP : Pyridoxamine 5'-phosphate.

PNP : Pyridoxine 5'-phosphate.

PLP : Phosphate de pyridoxal.

MTRR ou MSR : Méthionine synthase réductase.

TCN : Transcobalamine.

LLC : Leucémie lymphoïde chronique.

Adp : Adénopathies.

SPM : Splénomégalie.

LMC : Leucémie myéloïde chronique.

PAL : Phosphatases alcalines leucocytaires.

LAM : Leucémies aiguës myéloïde.

LAL : Leucémies aiguës lymphoblastiques.

FAB : Franco-Américano-Britannique.

CD : Cluster de Différenciation.

ADN : Acide desoxy-ribose nucléique.

EDTA : Ethylène Diamine Tétra-Acétique.

GR : Globules rouge.

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate.

HCL : Acide chlorhydrique.

PCR : Réplication par Polymérisation en chaîne.

UV : Ultra violet.

T_m : Température de fusion.

DTT : Dithiothréitol.

A : Adénine.

C : Cytosine.

G : Guanine.

T : Thiamine.

PCR : Protéine C réactive.

IL : Interleukine.

TNF : Facteur de nécrose tumorale.

HDL : Lipoprotéine de haute densité.

AVC : Accident cardiovasculaire.

LDL : Lipoprotéine de basse densité.

CREA : Créatinine.

ATP : Adénosine triphosphate.

BNP : Brain Natriuretic Peptide.

INTRODUCTION

Le cancer tue chaque année plusieurs millions de personnes. Les maladies du cancer sont nombreuses et variées, elles touchent des populations de tout âge sans distinction de sexe. La recherche scientifique médicale est encore impuissante face à ce fléau. Quelques percées permettent cependant des soins à caractère curatif pour certains cancers, mais leur champ d'action reste encore limité. Une part importante des décès qui surviennent suite à ces maladies est à amputer à des diagnostics tardifs.

C'est pour cette raison que la recherche de marqueurs fiables pour la détection des cancers d'une manière précoce constitue aujourd'hui une voie importante dans le domaine de la recherche médicale.

Cependant le champ de prospection dans ce domaine est très vaste en égard de la variété dans la typologie des cancers d'une part et du grand nombre de marqueurs possibles qui leur sont associés.

En effet, diverses voies ont été prospectées dans ce domaine et quelques marqueurs spécifiques semblent déjà confirmer leur efficacité et leur fiabilité. Ainsi certains marqueurs ont été déjà associés à des cancers, nous citerons à titre d'exemple l' α - foeto protéine élevée dans le cancer du foie et la PSA dans celui de la prostate.

Cette voie de recherche n'est pas évidemment sans difficultés dans notre pays. Celles-ci sont liées à un manque de moyens techniques et logistiques, à la difficulté de l'échantillonnage et surtout à l'absence de coopération de certains services impliqués dans ce domaine.

Dans le cadre de ce magister nous envisageons d'apporter une très modeste contribution dans la recherche de nouveaux marqueurs pour le cancer.

Nous avons choisi de travailler sur un seul type de cancer en l'occurrence la leucémie lymphoïde aigue et nous avons ciblé une population malade n'ayant pas fait l'objet de traitements chimiothérapiques. Et le choix du marqueur s'est porté sur l'homocystéine.

Dans un premier temps, nous présenterons les marqueurs tumoraux, le métabolisme de l'homocystéine, les facteurs favorisant une hyperhomocystéinémie et enfin les leucémies.

La seconde partie rapporte les techniques utilisées pour la recherche d'une éventuelle relation entre ce marqueur et ce type de cancer, et les résultats obtenus.

PARTIE
THEORIQUE



CHAPITRE I

MARQUEURS TUMORAUX

La prévention des maladies notamment les plus mortelles passe d'abord par leur détection suffisamment tôt pour leur prise en charge clinique. Ceci appelle l'identification de marqueurs fiables à même de servir d'indicateurs pour la manifestation de la maladie.

L'intérêt dans la recherche des marqueurs se justifie à plus d'un titre. Ces marqueurs permettent des diagnostics précoces d'une part et une veille thérapeutique d'autre part. Le dépistage des cancers s'effectue aujourd'hui essentiellement par les méthodes classiques qui s'appuient sur les outils de caractérisation tels que l'imagerie médicale, la palpation, les biopsies ...

Ces méthodes ont certes montré leur efficacité mais à des stades d'évolution des cancers assez avancées.

Le combat actuel qui est mené sur le dépistage précoce en cours de développement et suscitant un intérêt particulier dans le milieu scientifique, favorise l'approche utilisant des biomarqueurs spécifiques comme moyen de dépistage précoce et réduisant considérablement la pratique des biopsies systématiques.

De nombreuses recherches sont menées actuellement sur cet axe médical et certaines ont déjà abouti. Ces dernières ne sont cependant que des percées scientifiques qui préludent à une nouvelle aire dans l'approche prédictive des cancers.

I. 1. Définition

Un marqueur tumoral (MT) peut se définir comme toute substance correspondant à la présence ou au développement d'une tumeur maligne (American Society of Clinical Oncology, 1996).

En biochimie clinique, le terme de marqueur tumoral correspond à des substances sécrétées dans le sang par la tumeur et donc à des substances détectables et dosables par les méthodes analytiques de biochimie (celles-ci sont plus ou moins sophistiquées selon la concentration). Cette définition diffère de celle préconisée par les anapaths qui travaillent sur la tumeur elle-même. Pour ces spécialistes de la cytologie, les MT correspondent à ce qu'ils repèrent sur la cellule maligne par l'examen cytologique.

I. 2. Marqueur idéal

Ce terme fait appel aux notions de spécificité diagnostique, de sensibilité et de valeur prédictive positive. Le MT idéal devrait être totalement négatif chez les sujets en bonne santé ce qui veut dire une spécificité de 100% et en même temps, il doit être totalement positif pour un type de tumeur donnée, ce qui veut dire une sensibilité absolue de 100%.

Par ailleurs, la concentration de ce marqueur devrait dégager une corrélation nette entre le taux de marqueur (concentration sérique) et l'importance relative de la tumeur. Ces exigences hautement exemplaires ne peuvent se réaliser, par conséquent le marqueur idéal relève de l'utopique (American Society of Clinical Oncology, 1996 ; Brouet, 1979).

L'utilisation des MT, se fait donc avec le meilleur compromis possible en fonction du but recherché. Il y a 6 buts en fonction desquels on peut les utiliser : le dépistage automatique, le diagnostic, le pronostic, la détection de maladies résiduelles, la surveillance thérapeutique et la surveillance à long terme.

I.3. Classification

Les MT, sont des substances pas ou peu présentes chez un sujet normal. Schématiquement on peut les diviser en 3 grands groupes.

I.3.1. Marqueurs sécrétés par la tumeur

Ils constituent l'immense majorité de marqueurs tumoraux d'intérêt clinique avéré. Eux même peuvent être divisés en deux groupes.

I.3.1.1. Protéines embryonnaires

Comme leur nom l'indique, ce sont des protéines métabolisées par des cellules embryonnaires, ces protéines peuvent être des antigènes oncofoetaux comme l'antigène carcino-embryonnaire (ACF) et l' α -foeto protéine (AFP) qui est le premier marqueur mis au grand jour grâce à la corrélation entre son taux élevé et le cancer du foie, ou elles peuvent être des protéines placentaires telle que l'HCG, les hormones lactogènes placentaires et les isoenzymes de phosphatases alcalines.

I.3.1.2. Marqueurs de cellules matures

A la différence des précédents, ces marqueurs viennent de cellules qui ont atteint leur maturation, ils peuvent être des hormones comme: catécholamines et dérivés, sérotonine, 5 HIA (Ac 5 OH indol-acétique), calcitonine, parathormone, gastrine, insuline et ACTH (Dubois et al, 1996).

Des enzymes telles les phosphatases acides prostatiques, des immunoglobulines monoclonales peuvent être aussi des antigènes extraits de tumeurs et caractérisés par des anticorps poly ou monoclonaux comme :

CA 50, 125, 15-3, 19-9, 549 (CA = carbohydrates), PSA, TATI , TPA, ou encore des glycosaminoglycanes: acide hyaluronique (Dubois,1996)..

I.3.2. Marqueurs témoignant d'une réaction de l'hôte à l'envahissement tumoral

Ces paramètres ne sont pas véritablement spécifiques d'une pathologie tumorale bien précise, mais constituent des marqueurs facilement dosables permettant notamment le suivi d'un patient comme :ferritine, microglobuline, thyroglobuline, polyamines (Dubois, 1996; Rouesse et al, 1978).

1.3.3. Marqueurs tissulaires

Ils nécessitent l'extraction de la molécule, à partir de la tumeur pour:

- la quantification des récepteurs hormonaux (récepteurs aux oestrogènes dans le cas du sein), produits d'oncogènes (erb2/Neu dans le cas du sein), l'analyse de génétique moléculaire.

Ex : N-MYC (Von Kleist et al, 1996).

I.4. Méthodes de dosage des MT

Ces MT, sont des composés non soumis à une régulation par l'organisme à l'inverse du glucose ou du potassium par exemple, car leur présence n'est pas normale.

La concentration dans le sérum peut varier en fonction de la pathologie. Les méthodes de dosage sont donc très différentes. Il faut alors trouver des méthodes pour lesquelles le rapport entre la concentration et le phénomène mesuré est linéaire sur une grande distance.

D'une façon générale, on utilise des méthodes immunochimiques dans les quelles on dose les MT en utilisant un anticorps spécifique du marqueur.

Outre l'intérêt des marqueurs dans le diagnostic et le pronostic, Il est tout à fait clair donc que la recherche de marqueur reste une opération délicate et complexe du fait qu'il n'existe pas de marqueurs idéal. La recherche de compromis est donc de rigueur dans ce cas. La complexité est par ailleurs liée à la nature des marqueurs qui peuvent être sécrétés soit par la tumeur elle –même ou par une réaction de l'hôte à la maladie voir une localisation tissulaire.

L'évaluation ou le dosage des marqueurs est très variée. La règle générale est celle qui consiste en une corrélation linéaire et significative entre les concentrations et le phénomène mesuré (Dubois, 1996 ; American Society of Clinical Oncology, 1996 ; Von Kleist et al, 1996; .Fulla and Paycha ,1996).

CHAPITRE II

L'HOMOCYSTEINE

Découvert en 1932, l'homocystéine est restée dans l'anonymat pendant plusieurs décennies. Ce n'est qu'en 1968 que le Dr KILMEN MAC CULLY, chercheur de l'université de HAWARD a remarqué que les enfants qui montrent des niveaux d'homocystéines élevés génétiquement exprimaient des maladies cardiaques au même titre que les sujets adultes d'âge moyen.

A partir de ce constat Dr MAC CULLY, a considéré que L'homocystéine pouvait être considérée comme un facteur de risque indépendant des maladies cardiaques.

En effet, il fut établi sans aucun doute que les personnes ayant un niveau élevé d'homocystéine sont plus vulnérables aux accidents cardio-vasculaires, les maladies rénales, les maladies de l'œil, trouble de l'érection et certains types de cancers (leucémies) (Debree et al, 2002).

La recherche scientifique dans ce domaine s'applique à comprendre les raisons pour les quelles notre homocystéine augmente tout le long de la vie, et son incidence sur notre santé.

Celle –ci semble obéir à de nombreux facteurs, les uns sont liés à notre mode de vie et la nature de notre alimentation, et d'autres sont attribués à la composante génétique des individus.

II.1. Métabolisme cellulaire de l'homocysteine

L'homocystéine (Hcy) est un acide aminé soufré formé au niveau intracellulaire à partir de la méthionine apportée par l'alimentation. Il est absent des protéines, car il n'est pas codé génétiquement.

L'Hcy est un intermédiaire jouant un rôle très important dans le cycle de la méthionine, cycle qui a comme fonction le métabolisme de la méthionine vers d'autres acides aminés soufrés comme la cystéine, et l'échange de méthyle (Guilland, 1992). Elle est synthétisée par toutes les cellules de l'organisme. Le foie et les reins sont les deux organes où l'Hcy est principalement catabolisée, ceci se fait par deux voies: la voie de la reméthylation et la voie de la transulfuration (**Figure 1**).

II.1.1. Les voies de la remethylation

Deux réactions enzymatiques distinctes assurent la reméthylation de l'Hcy en méthionine. La principale réaction fait intervenir deux enzymes : la 5-MéthylèneTétraHydroFolate (5-MTHF), donneuse de groupement méthyl dont la formation est sous la dépendance d'une enzyme, la 5,10-MTHF réductase, et la Méthionine Synthase (MS) dont le cofacteur est la vitamine B12. Le 5-méthyl- tétrahydrofolate (5-M-THF) cède son groupe méthyle à l'homocysteine sous l'action de la méthionine synthase (MS) et de son coenzyme, la cobalamine (vitamine B12).

Le THF, produit déméthylé de la 5-méthyl- tétrahydrofolate (5-M-THF), reçoit un méthylène de la sérine, formant le 5,10-méthylène-T4HF (5,10-CH=CHT4HF).

Sous l'action de la 5,10-méthylène T4HF réductase (MTHFR), ce dernier (5,10-méthylène-T4HF) est réduit en 5-méthyl-tétrahydrofolate (5-CH₃-T4HF) (Chadefaux-Vekemans et al, 2002; Ueland, 1993).

Ce transfert du groupe méthyle, qui permet la synthèse de la méthionine, n'est possible qu'en présence de méthylcobalamine ; d'où la synergie d'action entre la vitamine B9 et la vitamine B12.

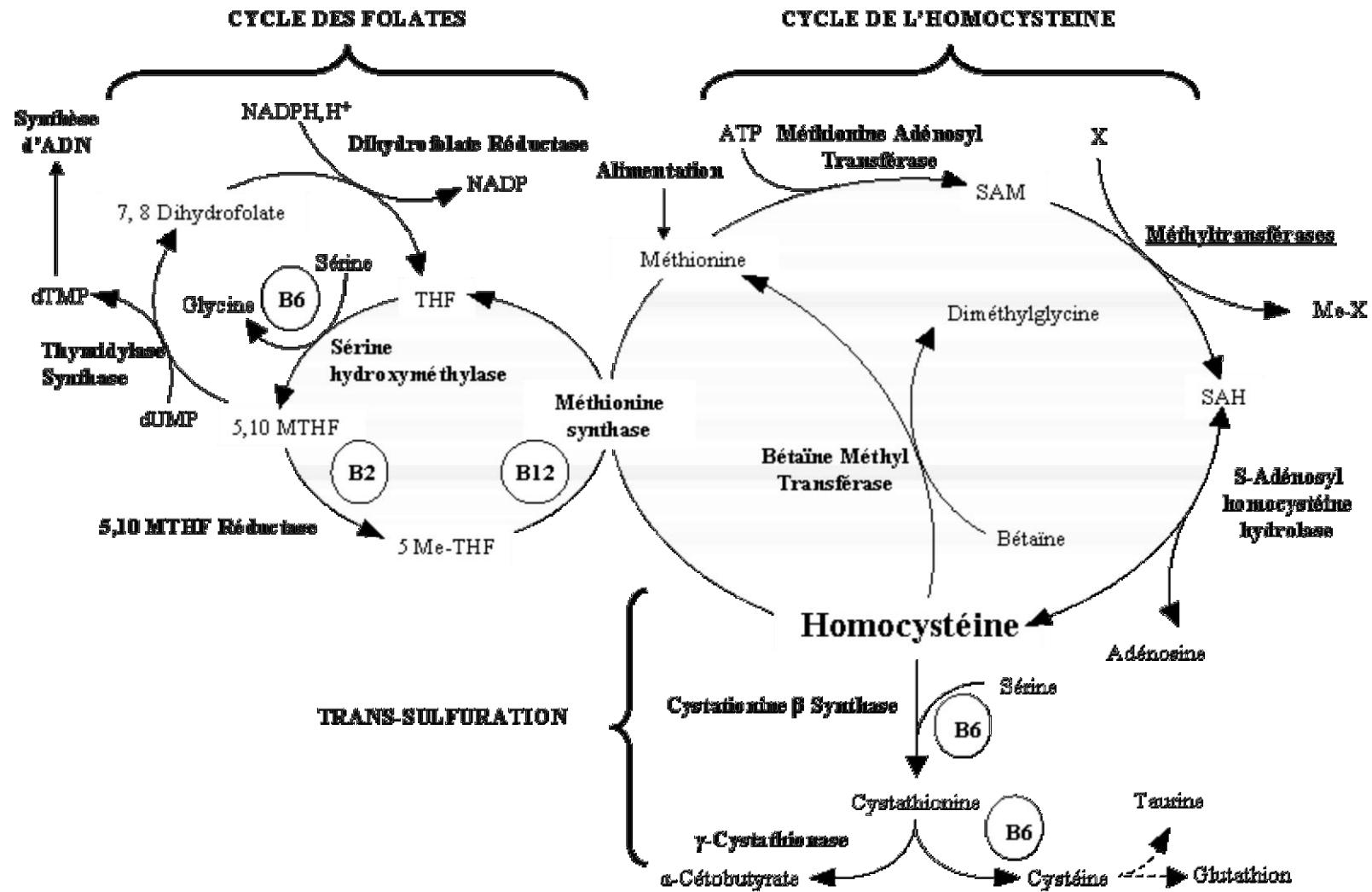


Figure 1: Représentation du métabolisme de l'homocystéine. THF: Tétrahydrofolate; DHF: Dihydrofolate; MTHF: Méthylène-THF; Me-THF: Méthyl-THF; SAM: S-adenosylméthionine; dUMP: Désoxyuracile monophosphate; dTMP: désoxythymidine monophosphate; SAH: S-adenosylhomocystéine; FAD: Flavine-adenosine dinucléotide; NADP: Nicotinamide-adenine-dinucléotide phosphate

La deuxième réaction est de faible activité, elle se déroule en grande partie au niveau du foie. En faisant intervenir une enzyme hépatique, la bétaine-homocystéine méthyltransférase.

La bétaine est la molécule donneuse de groupement méthyl.

Mais cette voie est moins importante que la précédente. En effet, en fonction du tissu considéré et du statut protéique, l'importance relative de ces deux voies de reméthylation varie. En cas d'apport protéique excessif, la voie de la transulfuration est favorisée, à l'inverse, en cas de déficit protéique, la voie de la reméthylation est favorisée afin de maintenir un pool cellulaire suffisant en méthionine (Chen et al, 1999).

II.1.2. La voie de la transulfuration

La majorité de l'Hcy n'est pas reméthylée mais catabolisée en cystéine par la voie de la transulfuration. L'atome de soufre nécessaire à la formation de la cystéine est apporté à la méthionine par cette voie. La Méthionine-Adénosyl-Transférase (MAT) influence l'activation de la méthionine en S-Adénosyl-L-Méthionine (SAM).

Cette dernière, principal donneur de groupements méthyle de l'organisme, cède ensuite ce groupement pour donner naissance à la S-Adénosine-L-Homocystéine (SAH). Cette molécule est hydrolysée en adénosine et en homocystéine par la S-Adénosyl-L-Homocystéine Hydrolase.

Sous l'influence de la Cystathionine- β -Synthase (CBS), l'Hcy se condense ensuite avec la sérine pour former la cystathionine, elle même clivée et désaminée en cystéine et en α -céto butyrate (par la Cystéine γ Lyase [CGL]).

Ces deux réactions nécessitent la présence d'un cofacteur enzymatique, le phosphate de pyridoxal ou vitamine B6.

Cette dernière voie est irréversible, contrairement aux autres voies métaboliques, ce qui a pour conséquence que la cystéine ne peut être un précurseur pour la synthèse de méthionine. Ce fait revêt surtout une importance dans le cadre de recommandations diététiques (McCully and Wilson, 1975 ; De Bree et al, 2001).

II.2. L'homocystéine circulante

II.2.1. Les différentes formes physicochimiques d'homocystéine circulantes

Il est important de comprendre le terme « homocystéine totale » (t-Hcy) dans un sens biochimique. Le plasma humain contient des quantités oxydées et réduites d'homocystéine (McCully and Wilson, 1975). Il y a plus de 70 ans, des définitions chimiques ont été établies par Butz et Du

Vigneaud. Le bisulfure ou la forme oxydée s'appelle homocystine et le sulfhydryle ou la forme réduite s'appelle homocystéine. Les formes du bisulfure existent également avec de la cystéine et avec des protéines contenant les résidus réactifs de cystéine (homocystéine liée aux protéines) (Ueland et al, 2000). Les dernières formes oxydées sont désignées sous le nom des disulfides mélangés. Les formes oxydées d'homocystéine comportent habituellement 98–99% de l'homocystéine totale dans le plasma humain, 80–90% sont liées aux protéines (McCully and Wilson, 1975), (**Figure2**). L'homocystéine totale est donc la somme de toutes les formes d'homocystéine qui existent dans le plasma ou sérum.

	« REDUITE »	
Homocystéine	$\begin{array}{c} \text{NH}_3 + \\ \\ -\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2 - \text{SH} \end{array}$	1 %
	« OXYDÉE »	
Homocystine	$\begin{array}{c} \text{NH}_3 + \\ \\ -\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2 - \text{S} \\ \\ -\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2 - \text{S} \\ \\ \text{NH}_3 + \end{array}$	5 – 10 %»
Homocystéine liée aux protéines	$\begin{array}{c} \text{NH}_3 + \\ \\ -\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2 - \text{S} \\ \\ \text{Protéine} - \text{S} \end{array}$	80 – 90 %
Homocystéine -cystéine	$\begin{array}{c} \text{NH}_3 + \\ \\ -\text{OOCCHCH}_2\text{CH}_2 - \text{S} \\ \\ -\text{OOCCHCH}_2 - \text{S} \\ \\ \text{NH}_3 + \end{array}$	5 – 10 %

Figure 2. Formes circulantes de l'homocystéine (De Bree et al, 2001)

Sur la base des travaux menés, la gamme de la concentration totale en homocystéine dans le plasma « des adultes en bonne santé » est 5–15 µmol/L (Ueland et al. 1993), (**Tableau 1**) .

Tableau 1. Valeurs normales et pathologiques d'homocystéine

	Homocystéine μmol/L
Normal	5 – 15
Souhaitable	< 10
Hyperhomocystéinémie	
Modérée	16 – 25
Intermédiaire	26 – 50
Sévère	> 50

Cependant, il faut être prudent dans l'utilisation de prétendues « gammes normales » pour l'homocystéine. Certains travaux ont prouvé que le risque pour la maladie cardiovasculaire est représenté par un continuum de concentration totale en homocystéine, avec le risque substantiel se produisant entre 10 et 15 μmol/L (Robinson et al, 1995). Les événements cardiovasculaires surviennent dans la plupart des cas, avec des hyperhomocystéinémies modérées (15–25 μmol/L) (Ueland et al, 1992; Green and Jacobsen, 1995). Cependant, le taux de t-Hcy peut atteindre les concentrations intermédiaires si la fonction rénale est altérée, (25–50 μmol/L) (Dennis et al, 1996; Bostom and Lathrop, 1997).

II.2.2. Facteurs favorisant une hyperhomocystéinémie

Les déterminants de l'homocystéine totale plasmatique sont complexes et impliquent des facteurs environnementaux, nutritionnels et génétiques (Dierkes and Westphal, 2005; McCully, 1996) (**Tableau 2**).

Tableau 2. Causes d'hyperhomocystéinémie

Causes	Hyperhomocystéinémies	
	Intermédiaire et modérée (16 – 50 $\mu\text{mol/L}$)	Sévère (> 50 $\mu\text{mol/L}$)
Génétiques	Déficit hétérozygote en CBS Polymorphisme <i>MTHFR C677T</i>	Déficit homozygote en CBS Déficit homozygote en MTHFR Déficit en méthionine synthase
Nutritionnelles	Déficit en folates Déficit en Vitamine B6 Déficit en Vitamine B12	
Thérapeutiques	Anticonvulsivantes Méthotrexate Phénytoïne Monoxyde d'azote Azaribine	
Etats pathologiques	Insuffisance rénale chronique Hypothyroïde Psoriasis Arthrite rhumatoïde Diabète type II Cancers (pancréas, sein, ovaire)	

II.2.2.1. Facteurs nutritionnels

II.2.2.1.1. Les folates ou vitamine B9

La vitamine B9, ou folacine, est aussi appelée acide folique pour la forme synthétisée servant de supplément et folate pour celle présente naturellement dans les aliments. La vitamine B9, comme toutes les vitamines du groupe B, est hydrosoluble.

❖ *Caractéristiques générales*

L'ensemble des composés dans lesquels l'acide ptéroïque est lié à une ou plusieurs molécules de glutamate, se rassemble sous le terme de « folates » (ou folacine ou vitamine B9) (**Figure 3**). La plus grande partie de l'acide folique est présente dans les aliments sous forme de polyglutamates (entre 1 et 7 résidus glutamates reliés en chaîne au glutamyl constitutif) (Abdelmouttaleb et al, 2000; Allen, 2004; Bollander-Gouaille, 2002; Durand, 1996).

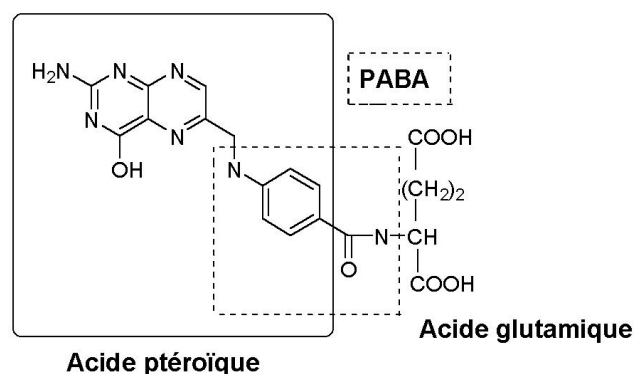


Figure 3. Acide Folique

❖ Fonctions physiologiques

Le transfert des unités mono carbonées à partir de multiples biomolécules vers de nombreuses réactions biosynthétiques telles que la synthèse de purine et de pyrimidine, la synthèse de la méthionine à partir de l'Hcy est facilitée par les folates. Un apport adéquat en folates est essentiel pour la division cellulaire et l'homéostasie, en produisant de l'ADN, (**Figure 4**) (Scott and Weir, 1998).

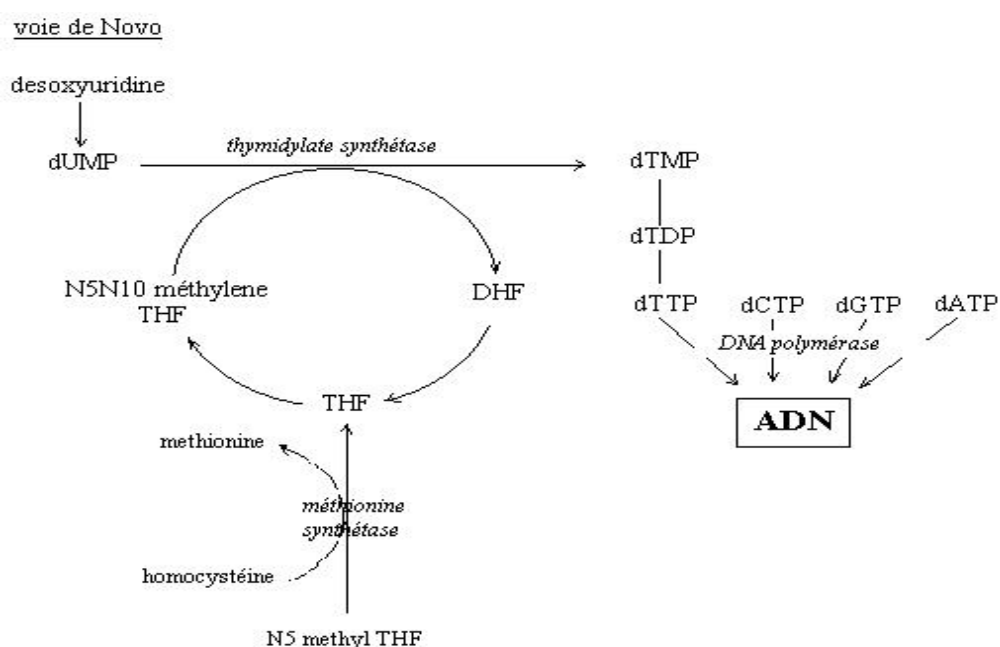


Figure 4. Folate et synthèse de l'ADN (De Bree et al, 2001)

-Réduction de l'acide folique

La molécule doit être réduite par une enzyme, pour être métaboliquement active, cette enzyme, la dihydrofolate réductase fixe d'abord 2, puis 4 atomes d'hydrogène sur la molécule, ce qui explique sa grande sensibilité à l'oxydation (Allen, 2004; Bollander-Gouaille, 2002; Durand, 1996).

Ainsi, le ptéroylglutamate subit une double réduction en THF (TétraHydroFolate).

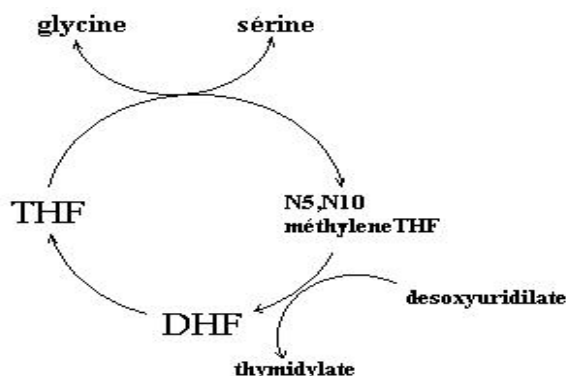


Figure 5. Cycle du folate (De Bree et al, 2001)

-Méthylation du THF

La fixation des groupements monocarbonés en 5 et 10, conduit aux formes circulantes et actives (5,10-MTHF et 5-MTHF).

-Déméthylation du 5-MTHF

La molécule de 5-MTHF véhiculée par le sérum doit être déméthylée pour intégrer le cycle folique cellulaire, et ce transfert de méthyl qui permet la synthèse de la méthionine, nécessite la MTHFR et son cofacteur enzymatique, la méthylcobalamine.

C'est en tant que donneur de méthyl que l'acide folique joue un rôle fondamental dans le métabolisme de l'Hcy et, par voie de conséquence, dans le métabolisme cérébral et nerveux.

II.2.2.1.2. La vitamine B12

La vitamine B12 appartient à la famille des corrinoïdes. Elle est constituée d'un ribonucléotide et d'un noyau corrine reliés entre eux par un pont amino2- propanol (**Figure 6**) - le ribonucléotide : résulte de la condensation de la 5,6 - diméthylbenzimidazole (base azotée) avec un sucre, le Ribose 3' phosphate.

- Le noyau corrine : est formé d'un atome de Co central relié à 4 noyaux pyrroles ainsi qu'à un ligand anionique (- X), dont la nature permettra de définir :

* La cyanocobalamine (- X = - CN), l'hydroxocobalamine (- X = -OH) : ces 2 composés sont à Co 3+, stables et utilisés en thérapeutique

* La méthylcobalamine (- X = - CH₃), et la 5'-désoxyadenosyl cobalamine (- X = -5'd Ad) sont les formes coenzymes actives (avec Co 1+)

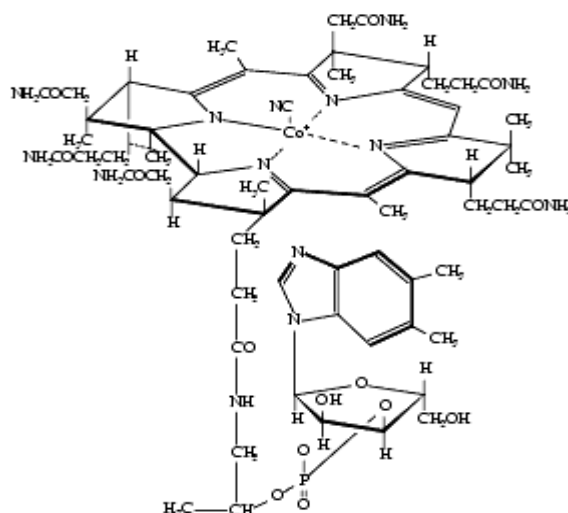


Figure 6. Vitamine B12 ou Cyanocobalamine (Chen et al, 1999)

❖ *Métabolisme*

La vitamine B12 est exclusivement synthétisée par des bactéries et est présente dans les aliments d'origine animale. Liée aux protéines, sous l'effet du pH acide elle est libérée du support alimentaire dans l'estomac. L'absorption digestive (iléon) nécessite la liaison à une protéine, le facteur intrinsèque synthétisé par les cellules pariétales gastriques. Des transporteurs spécifiques, assurent le transport des transcobalamines I, II, III (Allen, 2004; Bollander-Gouaille, 2002).

- La transcobalamine II

Elle est la plus importante, car elle fixe plus de 80 % de la vitamine B12 absorbée. C'est une glycoprotéine de 38 000 Da, synthétisée par divers tissus et cellules (hépatocytes, entérocytes, macrophages, cellules médullaires). Par un mécanisme d'endocytose récepteur-dépendant, elle délivre la vitamine B12 aux cellules utilisatrices (moelle osseuse, foie, glandes endocrines).

Les transcobalamines I et III

Produites essentiellement par les granulocytes, surtout les promyélocytes et myélocytes, se sont des glycoprotéines ubiquitaires (PM = 120 000 Da). Elles transportent la B12 sans la distribuer aux cellules utilisatrices.

II.2.2.1.3. La vitamine B6 :

En tant que cofacteur de la CBS (voie de transulfuration), La vitamine B6 est un important modulateur des taux plasmatiques d'Hcy.

Le terme « vitamine B6 » désigne 6 composés : le pyridoxal (PL), la pyridoxine (PN), la pyridoxamine (PM), et leurs dérivés phosphorylés respectifs, le pyridoxal 5'-phosphate (PLP), la pyridoxamine 5'-phosphate (PMP), et la pyridoxine 5'-phosphate (PNP).

Nous nous intéresserons seulement au phosphate de pyridoxal ou PLP (Guilland and Lequeu, 1992).

* Métabolisme

Dans la lumière de l'intestin grêle, le PLP et le PMP présents dans les produits animaux sont hydrolysés par une phosphatase pour être absorbés sous forme de PL et de PM par l'entérocyte, par un mécanisme de diffusion passive non saturable.

Certains tissus (le foie, le cerveau et les érythrocytes) peuvent synthétiser le PLP à partir de la PN (présents dans les produits végétaux).

Le PLP est formé par phosphorylation du PL catalysé par la pyridoxal kinase.

Le foie est le principal site de synthèse du PLP, et c'est le seul organe capable de libérer dans le sang la vitamine B6, sous forme de PLP.

Le rôle très important de ces vitamines du groupe B comme cofacteurs enzymatiques et comme substrats dans le métabolisme de l'Hcy explique la relation inverse entre les taux plasmatiques d'Hcy et ceux de vitamines B9, B6 et B12 (Guilland and Lequeu, 1992).

II.2.2.3. Facteurs génétiques

Il existe plusieurs polymorphismes des enzymes intervenant dans le cycle des folates et la reméthylation de l'homocystéine. Il s'agit principalement de variants génétiques des enzymes 5,10-Méthylènetétrahydrofolate réductase (*MTHFR* C677T, A1298C), Méthionine synthase (*MTR* A2756G), Méthionine synthase réductase (*MTRR* A66G) (Goyette et al, 1998, 1994; Li YN et al, 1996). De plus, un polymorphisme portant sur une protéine de transport de la vitamine B12, la

transcobalamine (*TCN C776G*), a été rapporté et peut également s'associer à une hyperhomocystéinémie relative (Chen et al, 1997; Christensen et al, 1999; Goyette et al, 1998, 1994; Li YN et al, 1996) (**Figure 7**).

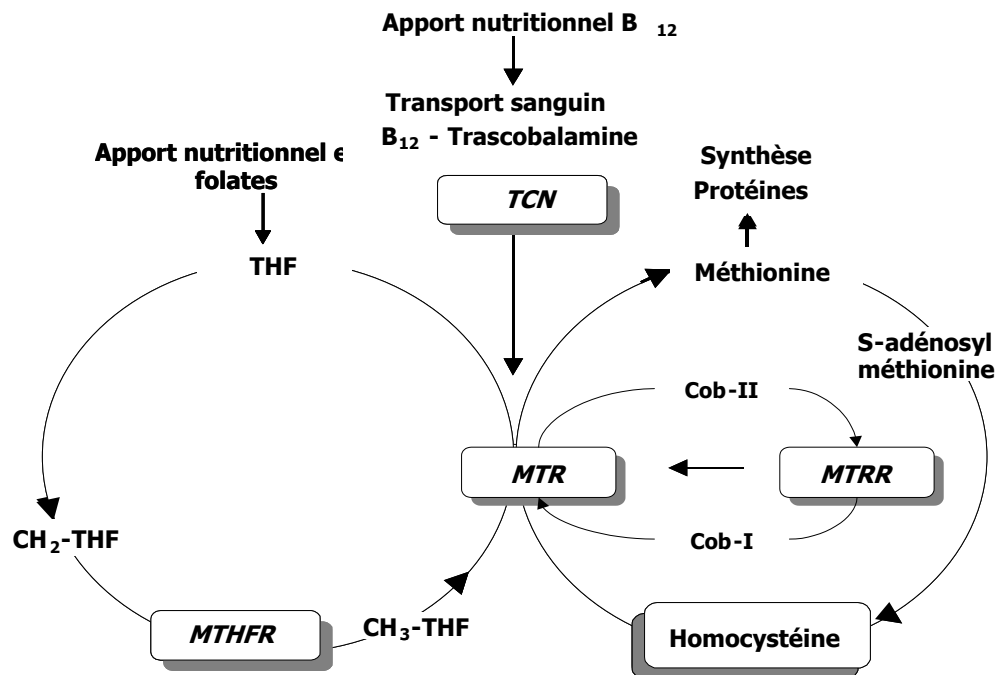


Figure 7. Gènes des enzymes intervenant dans le métabolisme de l'homocystéine
(Chen et al, 1999)

CHAPITRE III

LEUCEMIES

La leucémie ou cancer du sang dite parfois tumeur liquide, est l'une des maladies du siècle. En effet, elle cause chaque année dans le monde plusieurs milliers de décès.

Cette maladie décrite pour la première fois par Rudolf Virchow, histologiste allemand renommé, est un cancer affectant les cellules du sang, sous la forme d'une prolifération incontrôlée de cellules hématopoïétiques (des cellules à l'origine d'une lignée cellulaire ou cellule souche) dans la moelle osseuse.

En raison d'une modification de leur génome avec une accumulation de mutations acquises au niveau de leur ADN, les cellules leucémiques se comportent de manière anormale. Ces cellules souches, immatures, envahissent la moelle osseuse et s'interposent à la fabrication de cellules sanguines normales. La classification des leucémies qui se repartissent aujourd'hui en de nombreux types dépend de la cellule maligne d'origine dont elles sont issues. Suivant qu'il s'agisse de cellules souches des lymphocytes ou des polynucléaires, on distingue alors des leucémies lymphoïdes qui se manifestent par un excès de lymphocytes ou de leucémies myéloïdes caractérisées par la prolifération de leucocytes granuleux, ou de monocytes.

III.1. Leucémie lymphoïde chronique (LLC)

III.1.1. Définition

La LLC est une hémopathie maligne caractérisée par l'accumulation progressive dans le sang et dans la moelle de petits lymphocytes apparemment matures, immunologiquement immatures et généralement de nature B (Matthews, 1998).

III.1.2. Epidémiologie

En Europe et en Amérique, la LLC est la plus commune des leucémies de l'adulte. En Algérie, elle représenté 20% des leucémies de l'adulte, 2 fois moins fréquente que LMC et 03 fois plus fréquente chez l'homme que la femme.

La moyenne d'âge est de 60 ans, la maladie est exceptionnelle avant 30 ans, elle n'est jamais observée avant 20 ans (Matthews, 1998).

III.1.3. Facteurs étiologiques

Les causes réelles de la LLC sont jusqu'ici inconnues. En effet, les mécanismes cellulaires susceptibles d'induire une prolifération des lymphocytes demeurent encore méconnus. Cependant, l'hémopathie lymphoïde est souvent associée à un certain désordre immunologique sous forme de déficit immunitaire.

Les lymphocytes en question semblent dériver à partir des couronnes périfolliculaires des ganglions. Des lymphocytes de type B, sont en effet issus d'un certains réarrangements dans les gènes d'immunoglobulines. A ce titre, la prolifération de lymphocytes matures aurait pour cause d'une apoptose; qui correspond à une mort programmée des cellules. Cette hypothèse puise ses arguments dans l'expression de certains gènes en rapport avec l'inhibition de l'apoptose qui semble être augmentée dans certains cas (Koziorowska et al; 1980; Marie et al, 1982).

III.1.4. Physiopathologie

La nature monoclonale de la prolifération est confirmée par la présence sur tous les lymphocytes d'un seul type d'immunoglobuline. Ces lymphocytes monoclonaux présentent souvent de nombreuses mutations ainsi que des anomalies chromosomiques. Le rôle de ces derniers dans la genèse de la leucémie n'a pu être établi encore. Ces cellules lymphocytaires B sont immuno-incompétentes; incapables de répondre à la stimulation antigénique pour fabriquer des anticorps et défendre l'organisme contre une agression. On notera que l'insuffisance immunitaire est d'autant plus profonde que le syndrome tumoral est important et se traduisant notamment par un déficit en « T-helper » et déficit intrinsèque des lymphocytes B. Ce déficit est attribuable à un défaut de synthèse. Il semblerait qu'une anomalie de repliement empêcherait leur expression sur la membrane cellulaire (Marie et al, 1982).

III.1.5. Circonstances de découverte

III.1.5.1. Signes cliniques

Les signes précurseurs de la maladie sont assez variables, ils peuvent se manifester par une fatigue générale ou prendre la forme d'une adénopathie.

Certains examens médicaux relèvent par fois une grosseur anormale de la rate ou du foie. Une augmentation des amygdales peut être versée dans le tableau clinique de la LLC. La numération sanguine faite en routine reste cependant la plus révélatrice de la maladie (Koziorowska et al, 1980).

III.1.6. Adénopathies (adp)

III.1.6.1. Adp superficielle

Elle est omniprésente dans 70% des cas. Elle touche d'emblée les territoires ganglionnaires. Elle peut cependant prendre la forme d'une splénomégalie comme le volume augmenté de la rate. Et

il faut insister sur leur caractère bilatéral, symétrique, indolore et volumineux. Elles sont mobiles, ne contractant aucune adhérence et ne suppurent jamais ((Koziorowska et al, 1980). .

III.1.6.2. Les Adp profondes

Aussi fréquences que les adp superficielles, les Adp profondes sont soit médiastinales interbronchiques, toujours bilatérales et exceptionnelles, ou bien, elles ont un caractère plutôt iliaque et lombaire (Koziorowska et al, 1980; Marie et al, 1982).

III.1.7. Splénomégalie(Spm)

Se manifeste par l'augmentation de volume dans certains organes. Elle présente dans 60% des cas et elle reste de taille modérée, elle peut cependant être absente ou se manifester seule, ou être volumineuse (Koziorowska et al, 1980; Marie et al, 1982).

III.1.8. Hépatomégalie

Considérée comme un élément de mauvais pronostic, l'hépatomégalie est retrouvée dans 1/3 des cas seulement. Dans cette forme rare, l'infiltrat lymphocytaire peut être responsable d'un ictère.

III.1.9. Autres Signes

De nombreux autres signes peuvent apparaître telle une hypertrophie au niveau des amygdales, on y décèle parfois des lésions cutanées (10%) tumeurs cutanées, des érythrodermies ; des prurits ; et des érythèmes. Des signes de nature digestive apparaissent telles que les diarrhées, les hémorragies, et les douleurs abdominales, ou encore des neuropathies périphériques sensitivomotrices.

III.1.10. Biologie

III.1.10.1. Hémogramme

Lorsque les résultats des examens sanguins révèlent une hyperlencocytose par hypertymphocytose dont le taux se situe dans l'intervalle 5000/mm³ à 1000000/mm³, il est évident que nous sommes en présence d'indice fort et constant, nécessaire pour le diagnostic de la maladie.

Il faut savoir cependant que le taux minimum pour évoquer une LLC est : soit une lymphocytose >15000/mm³ ou soit une lymphocytose >5000/mm³ constatée depuis plus de 03 mois.

L'examen attentif de l'hémogramme permet de retrouver souvent quelques lymphocytes à cytoplasme très réduit donnant l'aspect de noyau nu : c'est l'Ombre de Gumprecht.

On notera que l'anémie est rare dans ce cas et comporte une très fâcheuse valeur pronostique quand elle est inférieure à 10 g/dl. Le mécanisme de celle-ci a plusieurs facettes sous la forme suivante:

- anémie hémolytique (test de coombs à répéter chaque fois).
- érythroblastopénie.
- Trouble de production médullaire isolée.
- Insuffisance de production médullaire.

Même constatations pour les plaquettes que pour les érythrocytes quand elles sont inférieures à 100000/mm³ (Koziorowska et al, 1980; Marie et al, 1982).

III.1.10.2. Myélogramme

Le myélogramme est un autre élément indispensable au diagnostic. Il révèle souvent une prolifération monomorphe de lymphocytes proches des lymphocytes normaux avec parfois quelques atypies variant entre 40-90%. La lymphocytose médullaire se situe toujours à des taux supérieurs à 30%.

Néanmoins pour des taux inférieurs à 30%, une biopsie médullaire s'avère indispensable. Cependant des signes périphériques sont toujours présents (ganglions).

On notera que l'adénogramme et la biopsie ganglionnaire ne sont pas requis pour le diagnostic de LLC. Ils montrent un effacement de l'architecture ganglionnaire normal par une nappe monomorphe diffuse de petits lymphocytes.

Le typage immunologique, permettra de déterminer la nature immunologique B (95% des cas) ou T (05% des cas) de la prolifération.

Les anomalies chromosomiques sont fréquentes et présentes dans 50% des cas. La trisomie 21 reste l'anomalie la plus fréquente (Koziorowska et al, 1980; Marie et al, 1982).

III.1.10.2.1. Désordres immunitaires

Le désordre immunitaire commence dans 30% des cas par une diminution des gammaglobulines en dessous de 07 g/ l. On constate exceptionnellement, la manifestation d'un pic monoclonal de type Ig M mais toujours inférieur à 5g/l.

Par ailleurs, la persistance de la réactivité à un antigène ancien mais l'incapacité de réagir à un nouvel antigène même courant est souvent constatée. On peut observer aussi un retard dans le rejet

de greffe. Enfin le test de coombs est positif dans 20% des cas avec ou sans anémie hémolytique associée (Koziorowska et al, 1980; Marie et al, 1982).

III.1.11. Diagnostic positif

Facile devant une forme habituelle, sujet âgé (>50 ans) présentant des polyadénopathies généralisées bilatérales et symétriques avec ou sans Spm, une hyperlymphocytose sanguine et médullaire persistant depuis quelques mois en l'absence de pic monoclonal.

III.1.12. Diagnostic différentiel

L'utilisation systématique des anticorps monoclonaux permet de différencier facilement la leucémie lymphoïde chronique d'autres affections notamment:

III.12.1. Les lymphocytoses polyclonales

Il s'agit du syndrome mononucléosique (mononucléose infectieuse) qui peut être observé dans de nombreuses circonstances. La lymphocytose est très modérée, ne s'associant avec des infiltrations médullaires, et ne persiste pas au-delà de 3 mois.

III.12.2. Les lymphocytoses monoclonales

Ce syndrome est observable dans divers autres cas en l'occurrence:

Les leucémies prolymphocytaires B qui se situent à des taux supérieurs à $100\,000/\text{mm}^3$ avec présence de splénomégalie. Le diagnostic est confirmé par l'étude cytologique. De même que les leucémies à tricholeucocytes, l'étude cytologique et surtout cytochimique permettent de diagnostiquer.

Le syndrome est observable aussi dans le cas des lymphomes spléniques et les lymphomes malins non hodgkiniens. Le premier est associé à une lymphocytose modérée et une splénomégalie volumineuse où les cellules sont de type B normales. Le second correspond à des formes folliculaires présentant des formes leucémiques.

On rajoutera enfin à cet ensemble la maladie de waldenström qui est caractérisée par une immunoglobuline M monoclonale et une lymphocytose sanguine avec des cellules lymphoplasmocytôdes (Koziorowska et al; 1980; Marie et al, 1982).

III.12.3. Les syndromes lymphoprolifératifs

De nombreuses situations peuvent s'identifier à ce syndrome qui reste cependant assez rare. On y trouve la maladie de Sézary caractérisée par une infiltration cutanée et sanguine, constituée de cellules convolutés de phénotype CD4+ /helper. La Leucémie à LGL dont le phénotype des cellules est celui des cellules NK à la quelle il faut rajouter la leucémie prolymphocytaire T qui reste très rare et dont les cellules associent les caractères cytologiques du prolymphocyte mais avec un phénotype de type T mature, la plupart du temps CD4+ (Marie et al, 1982).

III. 2. Leucémie myéloïde chronique LMC

III.2.1. Définition

La LMC est une hémopathie maligne appartenant au groupe des syndromes myéloprolifératifs, elle est caractérisée par des anomalies et une évolution biphasique.

Les anomalies apparaissent sous deux formes acquises, l'une monoclonale et l'autre cytogénétique:

- * L'anomalie monoclonale acquise de la cellule souche hématopoïétique pluripotente qui apparaît à travers une prolifération prédominante de la lignée granuleuse dans la moelle osseuse mais aussi dans d'autres organes normalement dépourvus de tissus myéloïdes (rate, foie) avec un passage des éléments immatures dans le sang.
- * L'anomalie cytogénétique acquise : le chromosome Philadelphie qui est une translocation (9 ; 22)(q34 ; q 1 l).
- * L'évolution bi phasique : une phase myélocytaire ou chronique suivie d'une phase blastique.

III.2. 2. Etiologie

Les causes les plus connues de la LMC mises en évidence sont celles liées aux radiations ionisantes et une exposition prolongée au benzène. On dénombre cependant de nombreux sujets atteints de LMC qui aurait une origine familiale héritée sans support génétique (Sterba et al; 2006; Tisdale, 1981).

III.2.3. Epidémiologie

Sur le plan epidemiologique, la LMC est plus fréquente dans plusieurs pays occidentaux : 10/1000000 h/an. Cette fréquence dans les pays développés peut trouver en effet ses explications dans l'importance du tissu industriel, source principal de radiations ionisantes et surtout de benzène. Cependant, il ne faut pas perdre de vue que l'absence de statistiques fiables dans les pays du tiers monde sur la maladie doit nous inciter à plus de réserves sur ces chiffres.

La LMC peut survenir à tout âge, mais le pic maximum de fréquence se situe entre 20 et 50 ans. Là aussi, la population touchée est celle se situant en âge de travail. Enfin la LMC est rare chez l'enfant, et elle a une légère prédominance masculine.

III.2.4. Clinique

Sur le plan clinique, de nombreux signes d'appels sont associés à la maladie, les plus fréquents se manifestent par une pesanteur de l'hypochondre gauche, mais aussi par une altération progressive de l'état général sous forme d'asthénie, d'amaigrissement, parfois d'une fébricule. Par ailleurs, l'hémogramme reste un signe systématique de la maladie. Il est à noter que plus rarement certaines complications telles que l'infarctus splénique, priapisme, hémorragie et crise de goutte peuvent correspondre à des signes cliniques de la LMC (Sterba et al; 2006; Tisdale, 1981).

III.2.4.1. Symptomatologie clinique

L'évolution de la maladie est progressive et se manifeste par des symptômes très caractéristiques qui peuvent soit prendre la forme d'une splénomégalie ou d'une hépatomégalie. La splénomégalie est de taille variable, parfois très volumineuse dépassant l'ombilic, pouvant même atteindre la fosse iliaque droite et plonger dans le pelvis. Celle-ci est considérée comme le maître symptôme de la maladie. La splénomégalie est présente chez 95 % des malades.

Elle est à l'origine notamment d'une pesanteur de l'hypochondre gauche, d'une compression digestive, et d'un ballonnement abdominal. Elle est lisse régulière, ferme et mobile avec les mouvements de la respiration. L'hépatomégalie est en revanche plus rare, et modérée.

D'autres symptômes peuvent être imputés à la maladie et se manifestent par des douleurs provoquées à la pression du sternum : signe de Crave, ou par des ecchymoses spontanées (Sterba et al; 2006; Tisdale, 1981).

III.2.5. Arguments biologiques

Les signes cliniques de la maladie peuvent être lus à partir de certains arguments biologiques. A ce titre, deux examens sont à même de mettre en évidence: l'installation de la maladie il s'agit en l'occurrence de l'hémogramme et du médullogramme.

III.2.5.1. Hémogramme

Examen qui peut suffire à lui seul à poser le diagnostic. Ce dernier apparaît à travers une hyperleucocytose importante se situant au-dessus de 50.000 et souvent supérieure à 100.000/mm³. Celle-ci est faite de polyclonale neutrophils (30-50%) et d'une forte myélémie > 20% pouvant atteindre 40-60% (métamyélocytes, myélocytes) promyélocytes et quelques myéloblastes, en règle < 5%). On y décèle aussi une discrète basophilie.

Autres éléments pouvant par ailleurs caractériser l'hémogramme, sont les anémies, modérées arégénérative et les thrombocytoses modérées où la présence anormale de plaquettes se situe entre 400 et 700.000/mm³, (macrothrombocytes), anomalies fonctionnelles : thrombopathies acquises.

III.2.5.2. Médullogramme

Il confirme l'hyperplasie granuleuse comportant 80-95 des cellules médullaires.

III.2.5.3. Autres examens

Des examens complémentaires peuvent être pratiqués pour réconforter le diagnostic lorsque ces derniers montrent un déséquilibre dans certains éléments tels que la diminution des phosphatases alcalines leucocytaires (PAL), hyperuricémie avec forte uraturie, excès de la LDH, augmentation de la Vitamine B12 et de la transcobalamine I.

On notera par ailleurs une hyperhistaminémie due à l'hyperbasophilie, se manifestant par : prurit, urticaire, troubles digestifs et ulcères digestifs sont possibles, ainsi que des fausses hypoglycémies, hyperkaliémies.

D'autres examens mettent en évidence l'anomalie caractéristique du chromosome Philadelphie (phi) (Sterba et al; 2006; Tisdale, 1981).

III.2.6. Diagnostic positif

Le diagnostic devient aisé lorsque certains éléments sont associés tels que volumineuse splénomégalie, très forte leucocytose et myélémie (Sterba et al; 2006; Kishi et al; 2003).

III.2.7. Diagnostic différentiel

III.2.7.1. Réactions leucémoides

On peut observer des leucocytoses parfois très élevées avec myélémie au cours :

- D'infections chroniques (sinusites, foyers dentaires, abcès profonds).
- Au cours de la tuberculose des organes hématopoïétiques

- A la phase de récupération d'une agranulocytose
 - Et à moindre titre au cours des hémolyses aiguës, des hémorragies.
 - Proliférations malignes, épithéliomas ou sarcomes, métastatiques ou non à la moelle.
- Dans tous ces cas les PAL sont normales (Kishi et al, 2003).

III.3. Leucémie aigue

III.3.1. Définition

La leucémie aigue est définie par une prolifération clonale d'un précurseur des cellules sanguines dans la moelle. De ce fait, elle est caractérisée par la présence de cellules d'origine hématologiques malignes immatures avec un déficit en cellules matures (insuffisance médullaire).

Ce qui se traduit en fait par le remplacement des cellules sanguines normales dans la moelle osseuse par des cellules cancéreuses. Cette situation aboutit à un blocage de la moelle dans la fabrication des cellules normales. Par ailleurs, ces cellules cancéreuses vont se disséminer dans les différents organes.

Selon la lignée cellulaire en cause (lignée lymphoïde ou lignée myéloïde), une classification internationale définit différents types cytologiques. On distingue les leucémies aiguës de la lignée myéloïde (LAM) et des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL), leur caractère aigu est défini par l'apparition rapide des signes cliniques ou biologiques. La classification Franco-Américano-Britannique (FAB) distingue plusieurs sous types (Oikawa et al, 2003; Ruud et al, 2006; Diop et al, 2005)

Leucémies aiguës myéloïdes

LAM 0 : indifférenciée

LAM 1 : sans maturation.

LAM 2 : avec maturation.

LAM 3 : promyélocytaire.

LAM 4 : myélomonocytaire.

LAM 5 : monoblastique.

LAM 6 : érythroleucémie.

LAM 7 : mégacaryoblastique.

Leucémies aiguës lymphoblastiques

LAL 1 : blastes de petite taille, cytoplasme peu abondant.

LAL 2 : blastes pleomorphe, taille inégale.

LAL 3 : (ou type Burkitt) blastes de grande taille, monomorphe, cytoplasme abondant basophile.

Ces types de cancers sont des maladies graves. En effet, l'évolution spontanée est rapidement mortelle dans des situations d'infections sévères ou d'hémorragies importantes. Toutefois, des avancées spectaculaires dans la connaissance de la maladie et des thérapies associées sont réalisées grâce à l'apport de la biologie moléculaire.

Dès les années 1960, on assistait aux premières rémissions prolongées. Les percées médicales des années 1980, ont mis en place une meilleure approche des soins par une généralisation de l'utilisation des cathéters centraux, l'utilisation massive d'antibiotiques puissants, et une meilleure utilisation des antalgiques. On notera par ailleurs une intensification de la chimiothérapie et une meilleure maîtrise de l'allogreffe de moelle.

Actuellement, les thérapeutiques modernes entraînent une rémission dans 95% des cas de leucémies aiguës lymphoblastiques.

Les leucémies aiguës touchent d'une manière plus fréquente la population infantile. Elles représentent un tiers des cancers en pédiatrie, avec une incidence annuelle de 4/100 000 (Oikawa et al, 2003; Ruud et al, 2006; Diop et al, 2005).

III.3.2. Etiologie

Facteurs étiologiques à l'origine des leucémies sont pas tout à fait maîtrisés car jusqu'à présent 95% des cas de leucémies aiguës ne sont pas encore associés à des facteurs prédisposants. Seul 05% des cas sont liés à des facteurs plutôt aggravants pouvant être associés à l'individu et à son environnement.

Ces facteurs peuvent être d'ordre exogènes dus aux rayonnements ionisants telles que les irradiations thérapeutiques ou accidentelles, aux produits chimiques surtout le benzène et les solvants dérivés et la chimiothérapie comme la cyclophosphamide et vépéside. Ou d'ordre endogène associant terrain congénital favorable: trisomie 21 qui augmente le risque de leucémie infantile de 20 fois, maladie de Fanconi, déficit immunitaire congénital: ataxie télangiectasie, déficit en anti-oncogène forme familiale de cancers, déficit en p53, maladie hématologique préexistante et virus (Oikawa et al, 2003; Diop et al, 2005).

III.3.3. Signes cliniques

Les signes cliniques traduisant cette maladie apparaissent sous forme d'insuffisance médullaire ou d'infiltration viscérale par les cellules anormales. La première se manifeste par les syndromes suivants :

- Une baisse des globules rouges, donc une anémie dénotant pâleur, asthénie, amaigrissement et altération de l'état général.
- Un déficit en leucocytes induisant une fragilité vis-à-vis des infections : angines traînantes, fièvre inexpliquée...
- Une diminution des plaquettes donc une thrombopénie caractérisée par des hémorragies, des épistaxis, des pétéchies, des purpuras et ecchymoses. A ce titre, les hémorragies rétinienne visibles au fond d'œil sont annonciatrices d'hémorragies cérébro-méningées.

Par ailleurs, l'infiltration des organes par les cellules leucémiques entraîne d'autres syndromes tels que :

- L'augmentation du volume du foie et/ou de la rate.
- L'élévation du volume des ganglions lymphatiques.
- Des douleurs osseuses ou ostéo-articulaires.
- Des douleurs abdominales.
- Une hypertrophie hémorragique des gencives (gingivite) (Oikawa et al, 2003; Ruud et al, 2006; Diop et al, 2005; Ifrah et al, 1987).

III.3.3.1. Hémogramme

L'hémogramme donne deux types de renseignements:

Lorsque l'examen est pratiqué précocement, au stade "aleucémique", où les cellules cancéreuses ne sont pas encore apparues dans la circulation sanguine, il ne montre que les signes de l'insuffisance médullaire traduisant de sérieuses présomptions quant à l'origine de cette insuffisance.

Pratiqué plus tardivement, l'examen met en évidence la présence de cellules jeunes anormales (blastes) qui sont passées dans la circulation. Ces résultats imposent de pratiquer dans ce cas une ponction de la moelle afin de réaliser un frottis ou myélogramme dans le but de préciser la lignée des cellules tumorales où on distingue en effet deux formes principales:

- Une lignée lymphoblastique, induisant une leucémie aiguë lymphoblastique ou L.A.L. Plus fréquente entre 18 mois et 16 ans, elle est très sensible aux traitements modernes puisque des rémissions complètes sont atteintes dans 90% des cas pendant de nombreux mois.

- L'autre lignée myéloïde donne les leucémies aiguës myéloblastiques ou L.A.M. Celle-ci est plus grave touchant surtout les enfants de plus de 12 ans (Diop et al, 2005; Ifrah et al, 1987).

III.3.3.2. Myélogramme

Cet examen est indispensable pour confirmer le diagnostic et préciser le type cellulaire exact, ce qui est fondamental pour le traitement et le pronostic. Il est le plus souvent pratiqué au niveau des crêtes iliaques.

L'examen cytologique permet d'affirmer le diagnostic de leucémie en montrant typiquement un infiltrat massif de cellules monomorphes dont l'aspect correspond soit à l'aspect FAB L1, soit FAB L2. Le pourcentage des cellules pathologiques peut parfois être plus modéré, mais doit être par définition supérieur à 30 % (Diop et al, 2005; Ifrah et al ; 1987).

Plusieurs examens supplémentaires très spécialisés visent à caractériser la prolifération clonale :

III.3.3.3. Immunophénotype

L'identification de protéines de surface des lymphocytes, dénommée par les initiales CD (**Cluster de Différenciation**), aux quelles est associé un numéro permettent d'attribuer une identité à la prolifération clonale (Dighiero, 1979). On distingue en effet des marqueurs de la lignée T (CD 2, CD 3, CD 4, CD 5, CD 7, CD 8), des marqueurs de la lignée B (CD 19, CD 20, CD 21, CD 21, CD 22, CD 23, CD 24, immunoglobulines intra cytoplasmiques, immunoglobulines de surface), des marqueurs de la lignée myéloïde (CD 13, CD 14, CD 33), et des marqueurs de cellules médullaires indifférenciées (CD 34, CD 10). Environ 15 % des leucémies expriment des marqueurs de type T et 85 % des marqueurs de type B (Oikawa et al, 2003; Ruud et al, 2006).

III.3.3.4. Cytogénétique

Les clones malins présentent souvent des anomalies cytogénétiques. On décrit des anomalies liées au nombre de chromosomes (hypodiploïdie - 45 chr, ou hyperdiploïdie + 46 chr) et des anomalies associées à la structure des chromosomes.

III.3.3.5. Biologie moléculaire

Au niveau du matériel génétique issu des clones malins, deux types d'anomalies sont décrites. L'une concerne des transcrits de fusion correspondant à une fusion de 2 gènes situés sur 2 chromosomes différents, aboutissant parfois à une protéine dotée de fonction, le plus souvent

intéressant la régulation du cycle cellulaire. On décrit ainsi les transcrits BCR-ABL, MLL, TEL-AML 1, correspondant respectivement aux translocations t (9 ; 22), t (4 ; 11) t (12 ; 21). L'autre concerne un réarrangement des différents gènes codant pour les immunoglobulines – lignée B ou le récepteur T – lignée T, au sein de clones de cellules lymphoïdes (Fliedner et al, 1981; Jeannet and Carpentier, 1986).

Il convient d'utiliser les techniques de biologie moléculaire pour un double but. L'un permet de mieux apprécier la diminution du nombre de cellules lors du traitement, l'autre est essentiellement une aide au diagnostic. On notera dans le premier cas que l'intérêt de ces techniques est l'augmentation de la sensibilité de la détection des cellules clonales résiduelles à des seuils proches de 1/10 000 cellules. Cependant en routine, ces techniques ne sont informatives que pour environ 70 % des patients. (Oikawa et al, 2003; Ifrah et al, 1987).

III.3.3.6. Autres anomalies biologiques

Il est à noter que parmi les formes hyperleucocytaires, diverses anomalies peuvent être présentes telles que la coagulation intravasculaire disséminée, l'hyperuricémie et l'anomalies du métabolisme phosphocalcique (hyperphosphorémie, hypo ou hypercalcémie). Par ailleurs une insuffisance rénale peut être présente soit par infiltration du parenchyme rénal, soit consécutive au désordre hydro-électrolytique (hyperuricémie, troubles du métabolisme phosphocalcique).

III.3.4. Diagnostic positif

Il est suspecté devant l'association plus ou moins complète des signes d'insuffisance médullaire et/ou syndrome tumoral et confirmé par l'hémogramme et le myélogramme qui objectivent une leucoblastémie et une infiltration médullaire supérieure à 30% par les mêmes blastes (Oikawa et al, 2003; Ruud et al, 2006; Diop et al, 2005; Ifrah, et al, 1987).

III.3.5. Diagnostic différentiel

Devant un tableau clinique complet, le diagnostic se discute rarement, cependant le diagnostic différentiel se pose en plusieurs termes:

Le premier terme apparaît dans la difficulté d'affirmer le caractère lymphoïde de la leucémie aigue. Le caractère négatif des examens mis en oeuvre correspond aux leucémies aigues dites indifférenciées. La discordance des examens correspond, soit aux leucémies aigues biphénotypiques volontiers observées en présence d'un chromosome Philadelphie (Phi), soit aux

leucémies aiguës multi lignées. Ainsi 10% des leucémies aiguës sont en fait des formes frontières; leur pronostic reste ambigu.

Le second terme exprime deux situations cliniques différentes: soit la leucémie aiguë vient compliquer un lymphome de haut grade et le pronostic en est critique, soit la moelle est envahie au diagnostic, mais la masse tumorale ganglionnaire est prédominante. Il est clair donc qu'à la frontière entre le diagnostic différentiel et les formes cliniques se situent les lymphomes leucémisés, dans lesquels le siège initial de la pathologie est le ganglion, et l'infiltration médullaire secondaire. Le diagnostic de lymphome est retenu si l'infiltration médullaire est inférieure à 25%.

Enfin le troisième terme, dont l'éventualité est rare; un sympathoblastome ou un cancer à petites cellules métastasés au niveau médullaire peut parfaitement simuler une leucémie aiguë, si la tumeur primitive est encore indétectable (Oikawa et al, 2003; Ruud, et al, 2006; Diop et al, 2005; Ifrah, et al, 1987; Valik et al, 2005).

III.4. Leucémie aiguë lymphoblastique

La classification des leucémies aiguës, distingue deux formes; l'une lymphoblastique et l'autre myéloïde. Même si cette classification traditionnelle reste justifiée, une certaine ambiguïté s'impose encore dans certains cas.

Les leucémies aiguës lymphoïdes (LAL) ou lymphoblastiques, objet de ce travail, sont caractérisées par une prolifération incontrôlée de lymphocytes immatures. Différentes d'une région du monde à l'autre (taux pour 100 000 habitants/an allant de 1,3 aux Indes à 5,3 au Costa-Rica, 2,1 en France), les leucémies aiguës lymphoblastiques ont une incidence comparable dans les deux sexes. Elles affectent toutes les tranches d'âges mais surtout les enfants (80 à 90 % des leucémies aiguës de l'enfant sont des leucémies aiguës lymphoïdes. La mortalité des sujets atteints par cette maladie a fortement diminué ces cinq dernières décennies (Matthews et al, 1998; Diop et al, 2005; Ifrah et al, 1987; Valik et al, 2005).

Sur le plan étiologique, une certaine obscurité demeure encore quant aux causes précises de la maladie. Cependant, la survenue de celle-ci est favorisée par certains facteurs génétiques ou toxiques. Chez les sujets porteurs d'une trisomie 21, le risque est multiplié par 20 et à un moindre degré dans d'autres affections congénitales comme l'ataxie-télangiectasie, le syndrome de Li-Fraumeni. (Matthews et al; 1998; Diop et al, 2005; Jin Yizun, 1998).

Il est établi par ailleurs que l'implication des virus dans les LAL humaines est limitée à des cas très rares et précis. Le mieux connu est celui des HTLV 1 et HTLV 2, à l'origine de leucémies particulières, au Japon du Sud, aux Caraïbes, aux États Unis et chez les juifs.

Les facteurs environnementaux les mieux étudiés sont les rayonnements, dont le rôle a été illustré par les conséquences à long terme des explosions nucléaires de Hiroshima et Nagasaki (incidence maximale relevée entre 1950 et 1952). Pour le cas de Tchernobyl, les données actuelles ne sont pas fiables. De même que pour la proximité des centrales nucléaires, les registres de surveillance spécifiques ne confirment pas une incidence quelconque. L'effet leucémogène potentiel des irradiations médicales diagnostiques (radiographies), thérapeutiques (radiothérapie), ou de toxiques comme le benzène et les chimiothérapies anticancéreuses (alkylants) semblent affecter d'autres variétés de leucémies (myéloïdes) (Diop et al, 2005; JinYizun, 1998; Evrard et al, 2005).

Les signes cliniques révélateurs de la maladie ne diffèrent pas en globalité des autres formes de leucémie. Cependant, la différence qui peut être notée est celle se rapportant à la spécificité de la nature des cellules qui apparaissent dans le sang et qui envahissent certains organes (rate, moelle...).

Ces dernières sont visibles lors des examens habituels à savoir hémogramme et myélogramme

L'examen de la moelle osseuse confirme le diagnostic. Celle-ci est envahie par les lymphoblastes. Selon l'aspect des cellules, on distingue les formes L1 et L2, les plus communes et une variété L3, ou leucémie de type Burkitt, plus rare (Matthews et al, 1998; Diop et al, 2005; Delpech et al, 1992).

Sont utiles pour préciser le pronostic, l'aspect des chromosomes (caryotype) et L'appartenance immunologique (B ou T).

On notera par ailleurs que certains facteurs augmentent la difficulté de guérison, et justifiant donc des traitements plus intenses (Keuzenkamp-Jansen et al, 1996; Morita et al, 1981). A savoir l'âge inférieur à 1 an ou supérieur à 10 ans, le degré d'envahissement des organes (volume tumoral), le taux sanguin de lymphoblastes supérieur à $30 \times 10^9/l$ chez l'adulte et à $50 \times 10^9/l$ chez l'enfant, certaines anomalies des chromosomes des lymphoblastes, par exemple les translocations 4;11 et 9;21, l'hypodiploïdie, ou certains caractères exprimés par les cellules malignes (degré de maturation immunologique, expression simultanée de caractères lymphoïdes et myéloïdes notamment) (Matthews, et al; 1998; Diop et al, 2005; Delpech et al, 1992).

Il s'avère donc qu'en raison d'une modification génétique induisant des mutations au niveau de leur ADN, les cellules leucémiques se comportent anormalement, envahissant la moelle osseuse et s'interposent à la fabrication de cellules sanguines normales. La typologie des leucémies est variée et se repartit en de nombreux genres dépendant des cellules malignes d'origine dont elles sont issues.

On distingue aujourd'hui deux lignées de leucémies l'une lymphoïdes et l'autre myéloïdes demandant chacune un traitement spécifique.

Si de nombreuses victoires ont été réalisées par la recherche scientifique dans la connaissance de cette maladie, de nombreuses zones d'ombre persistent encore sur le plan étiologique et par conséquent sur la prise en charge cliniques des malades.

PARTIE PRATIQUE

CHAPITRE IV
MATERIELS ET METHODES

Afin d'accéder à une analyse fine des échantillons sur le plan génétique et biochimique nécessaire pour mettre en évidence les éléments susceptibles d'intervenir dans l'apparition de la leucémie lymphoblastique aigue, un certain nombre de techniques modernes s'imposent.

En effet pour notre travail, nous avons d'abord dosé un certain nombre de paramètres biochimiques, ensuite nous avons procédé à l'extraction de l'ADN dans le but de réaliser l'analyse génétique de nos échantillons par PCR en temps réel.

IV.1. Echantillonnage

Notre échantillonnage s'est effectué par des prélèvements sanguins sur une population de 47 patients dont la moyenne d'âge ($27 \text{ ans} \pm 1.86$) pour laquelle une leucémie lymphoblastique aigue a été diagnostiquée, et une population saine de 95 témoins dont la moyenne d'âge est de 29 ans. A ce titre deux prélèvements ont été réalisés :

Le premier a été effectué sur tube sec. Après centrifugation, le sérum a été récupéré, et le caillot éliminé.

Le second c'est fait sur un tube en présence d'un anticoagulant, (EDTA). La centrifugation nous a permis d'isoler, le culot et le plasma dans des tubes séparés.

L'ensemble des prélèvements a été effectué au laboratoire d'hématologie du CHU de Batna. Les échantillons y ont été hermétiquement conservés avant analyse à une température de -20°C . Les analyses génétiques et biochimiques ont été effectuées au CHU de NANCY, au sein du laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire.

Lors du transfert des échantillons du CHU de Batna vers le CHU de Nancy, nous avons bien veillé à la non rupture du cycle thermique de conservation. Lors des analyses génétiques et biochimiques, tous les protocoles ont été scrupuleusement respectés.

IV.2. Extraction de l'ADN

L'ADN (acide desoxyribonucléique) est le support de notre information génétique et permet par conséquent le dépistage de nombreuses pathologies moléculaires par comparaison de séquences et recherche de mutation.

Son extraction se fait à partir du sang total prélevé sur EDTA (Ethylène Diamine Tétracétique), car un sang hépariné ne permet pas un assez bon rendement, l'héparine étant un inhibiteur de la TAQ polymérase utilisée pour la PCR.

L'extraction se fait à partir des globules blancs car ces cellules, contrairement aux hématies, sont des cellules nucléées. Ceci justifie la première étape d'élimination des globules rouges.

L'extraction se fait grâce au kit BACC nucléon 3 ® commercialisé par Amersham Biosciences.

Les étapes de l'extraction sont les suivantes figure ci-après (**Figure 8**)

IV.2.1. Lyse des GR

Pour cela, il faut verser 4 volumes de réactif A dilué au 1/4 pour 1 volume de sang total. Cette solution hypotonique permet l'éclatement des membranes par une entrée massive d'eau dans les hématies.

Une centrifugation permet de récupérer le culot de globules blanc, l'élimination du surnageant (ghosts + hémoglobine) se faisant par pompe aspirante sous vide.

L'opération est renouvelée avec un mL de réactif A et mise dans la glace des tubes pour favoriser la lyse des globules résiduels.

.

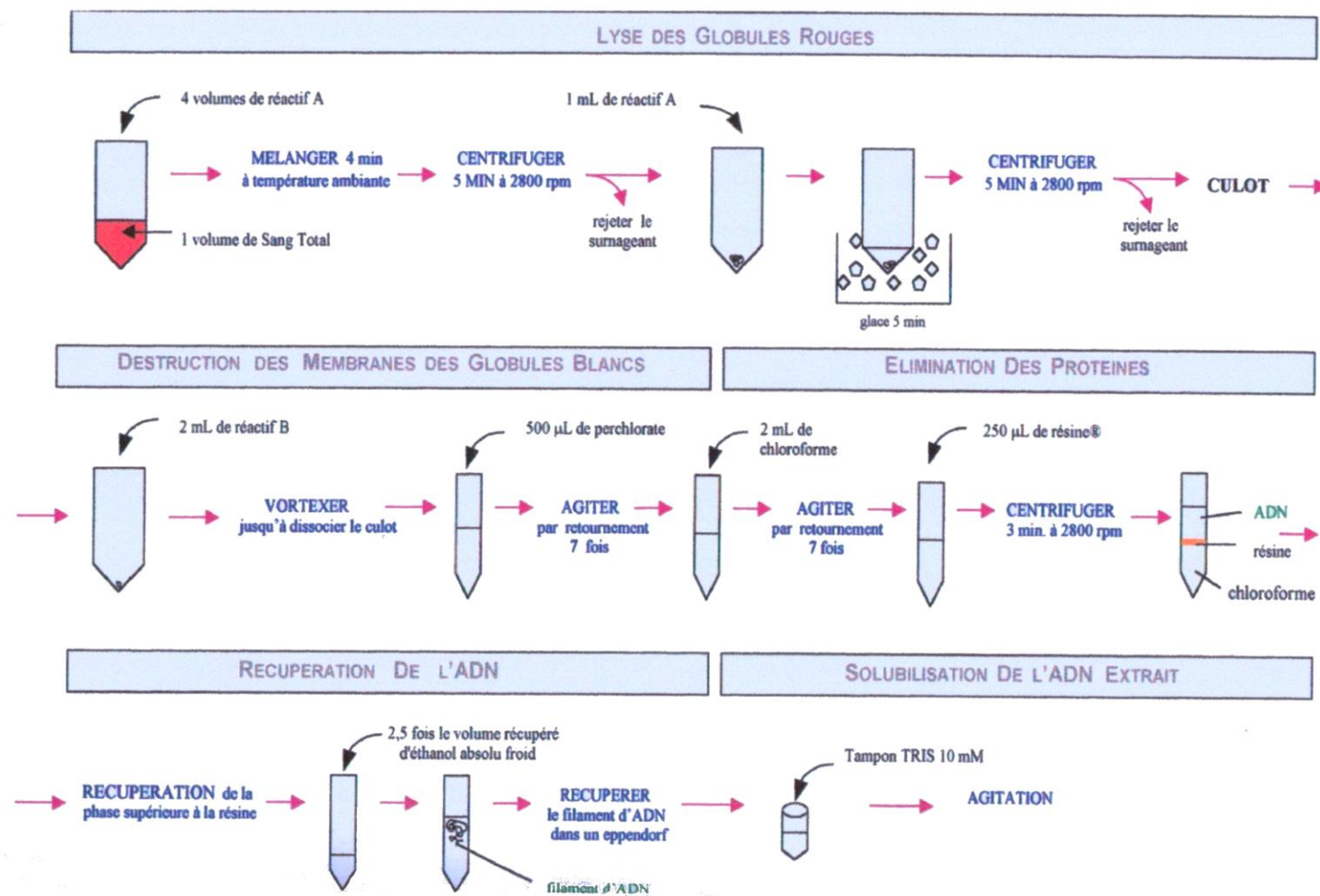


Figure 8. Extraction de l'ADN

IV.2.2. Destruction des membranes des globules blancs

L'ADN est toujours enfermé dans les noyaux des leucocytes qui sont toujours intacts. Il faut donc détruire les membranes de façon à libérer l'ADN contenu dans ces globules.

Cette destruction passe par l'ajout du réactif B (majoritairement composé de SDS = Sodium Dodécyl Sulfate) qui est un détergent qui se lie aux membranes et dissocie les lipides et les protéines pour former des complexes micellaires détergent-lipides et détergent- protéines (**Figure 9**)

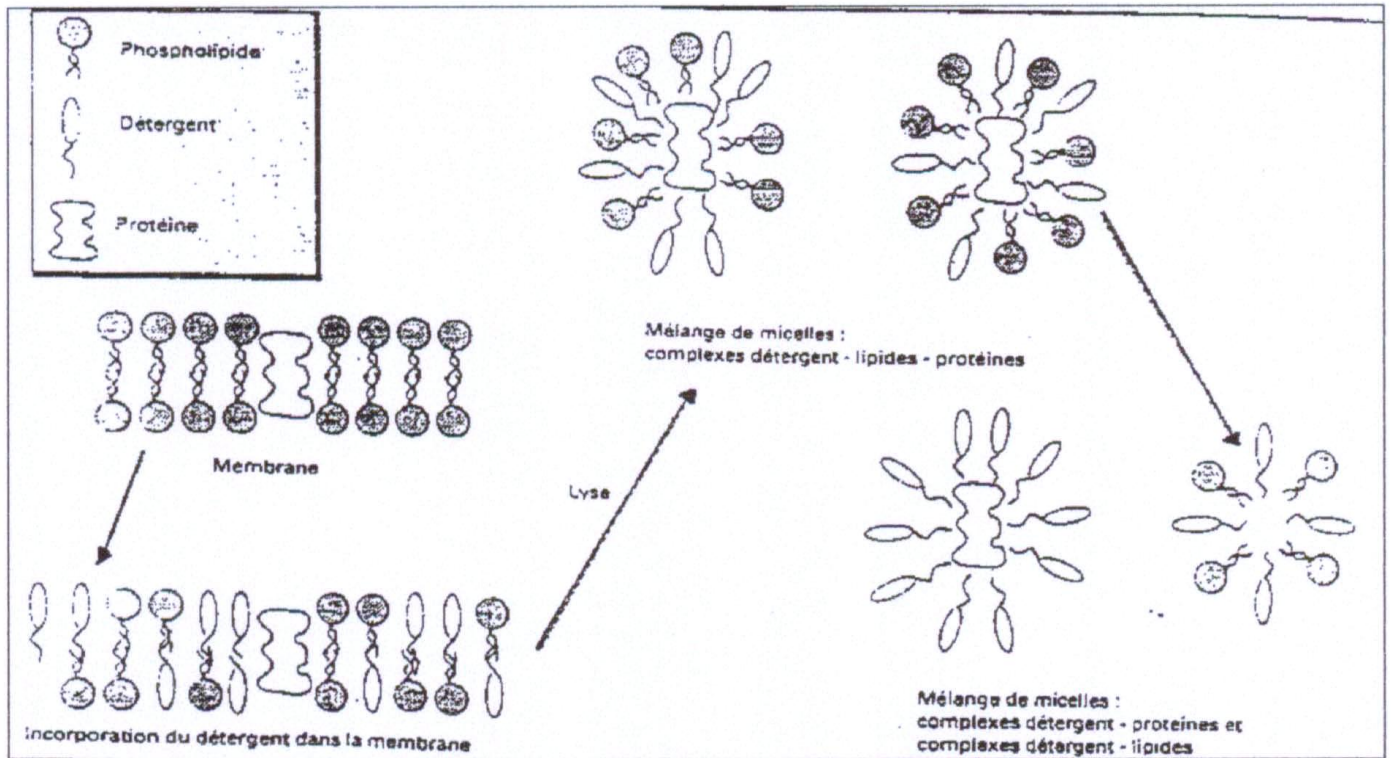


Figure 9. Destruction des membranes des globules blancs

IV.2.3. Elimination des protéines

La lyse des membranes des leucocytes ne libère pas seulement l'ADN nucléaire, mais également des protéines, partie intégrantes de toute cellule humaine. Ces protéines doivent absolument être éliminées car dans la suite des opérations, elles poseraient des problèmes, en bloquant les processus enzymatiques de la PCR, par exemple. La pureté de l'échantillon obtenu est donc capitale (dosage par spectrophotométrie)

Pour cette élimination, on utilise du perchlorate qui permet la dénaturation des protéines et le chloroforme pour ses propriétés physiques qui permettent de créer une phase organique différente de la phase aqueuse contenant l'ADN. Cette phase organique contient les protéines hydrophobes et les lipides à éliminer. On récupère donc la phase aqueuse supérieure après avoir centrifugé l'ensemble avec une résine qui permet une séparation nette des deux phases.

IV.2.4. Récupération de l'ADN

Après avoir récupéré cette phase supérieure, on introduit dans le tube de l'éthanol froid qui va permettre la précipitation du filament d'ADN que l'on pourra ainsi appréhender pour le transvaser dans un eppendorf.

IV.2.5. Solubilisation de l'ADN - Obtention de l'extrait

Dans cet eppendorf, on ajoute maintenant du tampon Tris HCL ce qui ressolubilise l'ADN. Pour l'homogénéité de l'extrait obtenu, les eppendorfs sont placés sur une roue à mélanger pendant au moins deux heures.

Remarque : toutes les quantités indiquées sur la (**Figure 8**) sont à prendre en compte pour des quantités de sang total entre 7 et 10 mL ce qui n'est généralement pas le cas. Les quantités étant le plus souvent inférieures, on applique un demi-protocole en divisant par deux l'ensemble des volumes notés.

IV.2.6. Pureté et concentration de l'extrait

Comme nous l'avons déjà dit plus haut, la qualité de l'extrait est essentielle pour l'étape suivante qui est l'amplification du matériel génétique par Polymérisation en chaîne (PCR). Cependant, sa concentration est également essentielle car une surconcentration entraînerait une inhibition de la réaction de PCR.

Il sera donc nécessaire de contrôler ces deux paramètres avant de passer à la phase suivante, et ceci se fait grâce à une même technique : la spectroscopie UV-visible :

On introduit successivement dans des cuves en quarts (et non en plastique car aux longueurs d'ondes où se fait la manipulation, il absorbe) les extraits précédents pour les soumettre à deux mesures : une à 260 nm et l'autre à 280nm.

IV.2.7. Pureté

Elle est exprimée par le rapport cité précédemment car les protéines susceptibles de contaminer l'extrait n'absorbent qu'à 280nm. On considère donc que l'extrait est suffisamment pur si le rapport d'absorbances se situe entre 1.5 et 2, ce qui est le cas de tous nos échantillons.

IV.2.8. Concentration

Elle est donnée par le tableau directement car la requête ci-de sous lui à été intégrée :

$$[\text{ADN}]_{\text{ng}/\mu\text{l}} = A_{260 \text{ nm}} \times \text{facteur dilution} \times 50$$

Ici, le facteur de dilution est de 20 et une unité d'Absorbance correspond à 50 µg/ml d'ADN ce qui explique le facteur 50.

IV.3. PCR en temps réel

La technologie de PCR en temps réel devient de plus en plus populaire dans différents secteurs d'activité. Cette technologie est basée sur la détection et la quantification d'un reporter fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR. La réaction en chaîne par polymérase en temps réel est une technologie basée sur une réaction enzymologique et sur la mesure en continu de son produit.

La quantité d'ADN total ou d'amplicon est mesurée à chaque cycle d'amplification, grâce au marqueurs fluorescents. Une quantification absolue de la quantité initiale d'ADN cible, est permise par l'obtention de la cinétique complète de la réaction de polymérisation, ce qui était très difficile à obtenir sans biais en PCR en point final. Il n'existe aucune différence théorique, du point de vue enzymatique, entre les deux types de PCR (point finale et temps réel).

Au cours de notre travail, nous avons utilisé cette technique pour le gènotypage de nos échantillons, et pour cela nous avons utilisé le Light Cycler.

IV.3.1. Principe de l'appareil

Le Light Cycler est un thermocycleur rapide (grâce à de l'air pulsé), couplé à un microspectrofluorimètre. Il est piloté par un ordinateur qui permet l'acquisition et le suivi en temps réel des données ainsi que leur traitement (**Figure 10**) (Nakamura et al, 2002).

L'ADN, les sondes, les amorces, le tampon et MgCl₂ sont introduits en mixture dans des capillaires fermés puis placés sur le carrousel. La programmation est rentrée dans l'ordinateur.

Le Light Cycler s'appuie sur deux méthodes basées sur la fluorescence pour la détection des produits d'amplification :

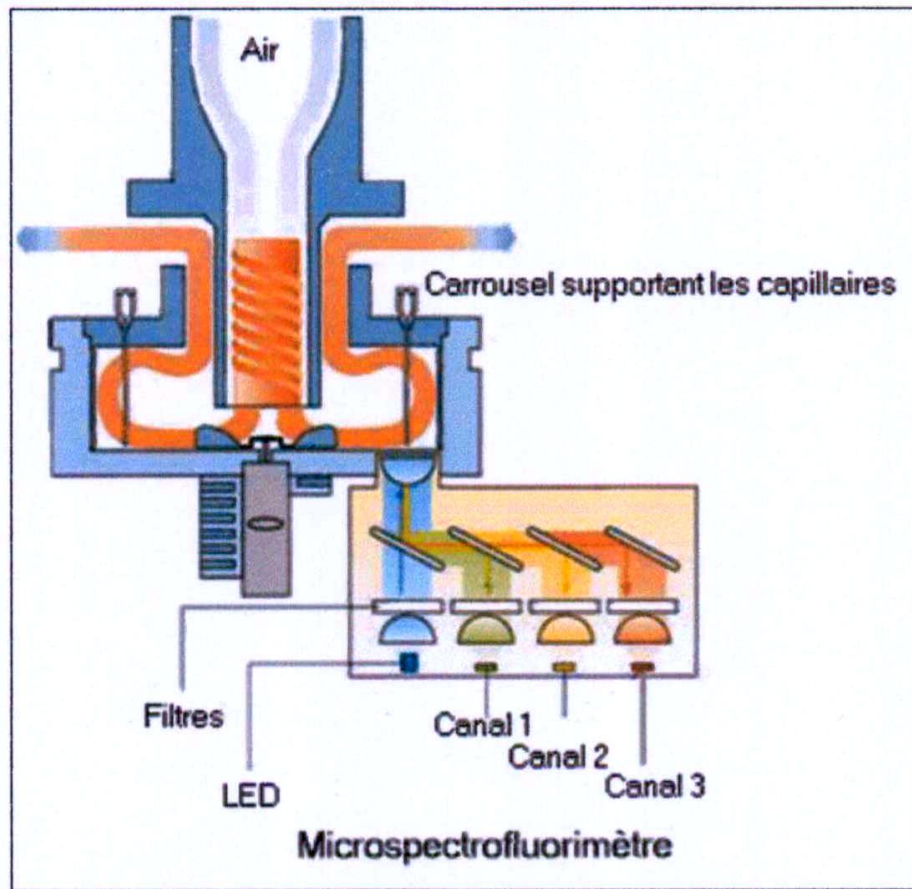


Figure 10. Le Light Cycler

IV.3.2. Détection de l'ADN avec un fluorophore, le SYBR Green

Le SYBR Green est un fluorophore capable de se lier à l'ADN double brin. En solution, le SYBR Green n'est pas fluorescent lorsqu'il est sous sa forme libre, alors qu'il est très fluorescent lorsqu'il est lié à l'ADN. Il est très stable : au bout de 30 cycles d'amplification (**Figure 11**).

Seulement 6% de son activité est perdue. Le microspectrofluorimètre couplé à l'appareil permet de lire cette fluorescence (Nakamura et al, 2002).

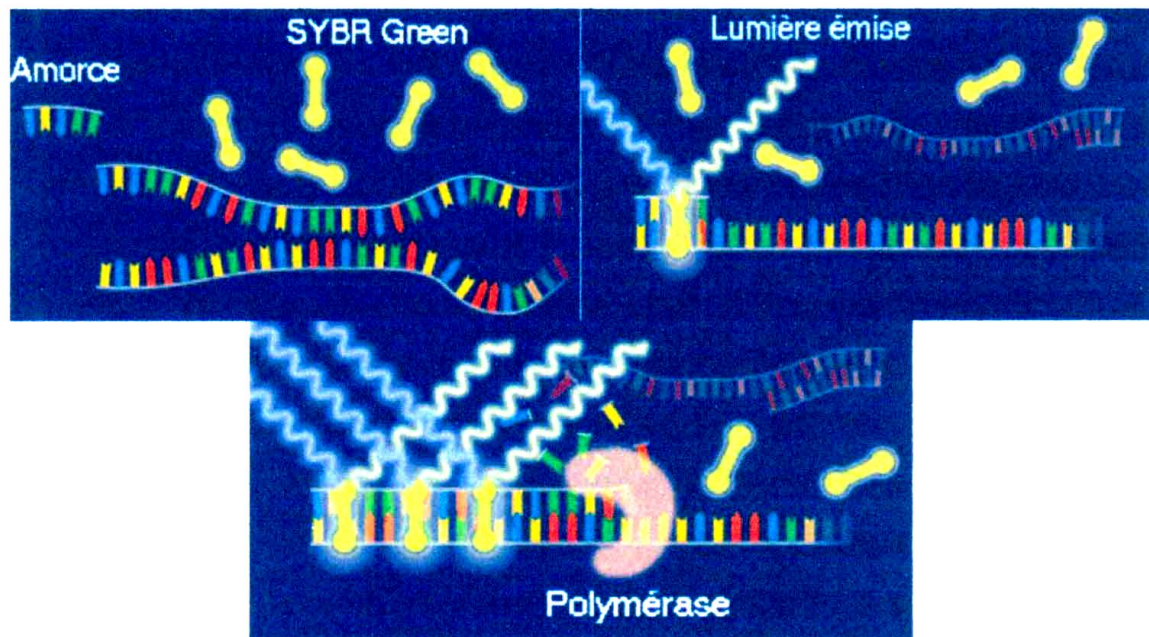


Figure 11. Le fluorophore SYBR Green

Pendant l'étape d'élongation, le nombre de molécules de fluorophore lié à l'ADN synthétisé augmente, ce qui se traduit par une augmentation de la fluorescence. La fluorescence est mesurée à la fin de l'étape d'élongation de chaque cycle

Cette méthode ne nous intéresse pas directement car elle ne permet pas la détection de mutations pour les différents polymorphismes de nos enzymes

IV.3.3. Sondes d'hybridation

Le second système utilise un couple de sondes très courtes dont chacune porte un fluorophore (la fluorescéine pour l'une et un LC red pour l'autre). Les sondes doivent avoir 25 à 30 nucléotides et leurs T_m (température de fusion) doivent être proches (Nakamura et al, 2002; Elyse Houde and Alain Houde, 2002) (**Figure 12**).

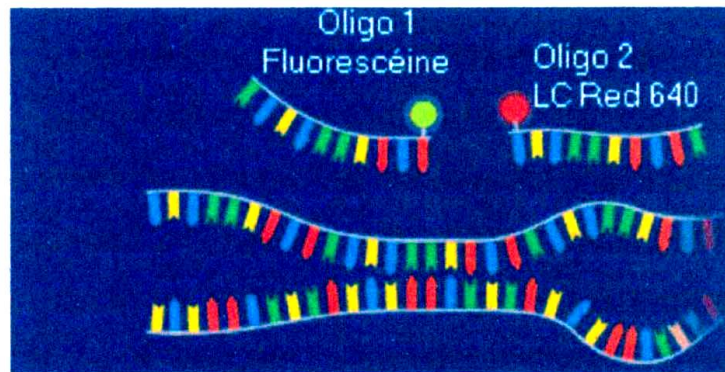


Figure 12. Les sondes d'hybridation fluorescéine et LC red

Dans un premier temps, la fluorescéine est excitée et émet une lumière verte à 530 nm (**Figure 13**).

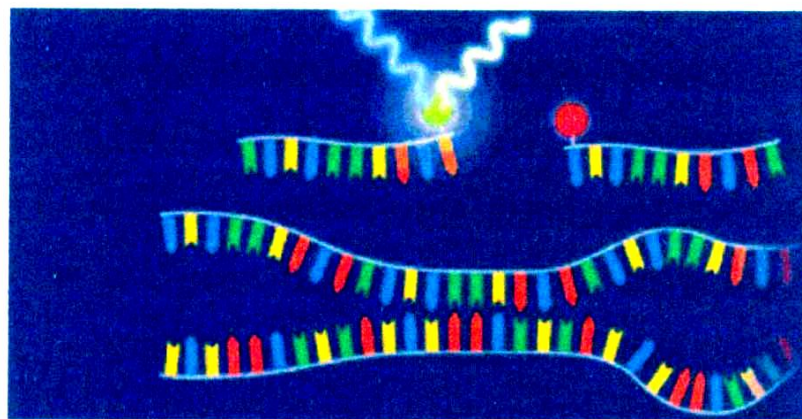


Figure 13. Excitation de la fluorescéine

Ensuite, les deux sondes vont s'hybrider en même temps que les amorces sur l'ADN. Les deux marqueurs étant très proches l'un de l'autre, la fluorescence émise par la fluorescéine va exciter le second marqueur qui va alors émettre une fluorescence rouge à 640 nm, ce transfert d'énergie étant directement lié à la distance séparant les deux marqueurs. C'est cette fluorescence rouge qui sera mesurée dans le canal à la fin de l'étape d'élongation de chaque cycle (Nakamura et al, 2002; Higuchi et al, 1992) (**Figure 14**).

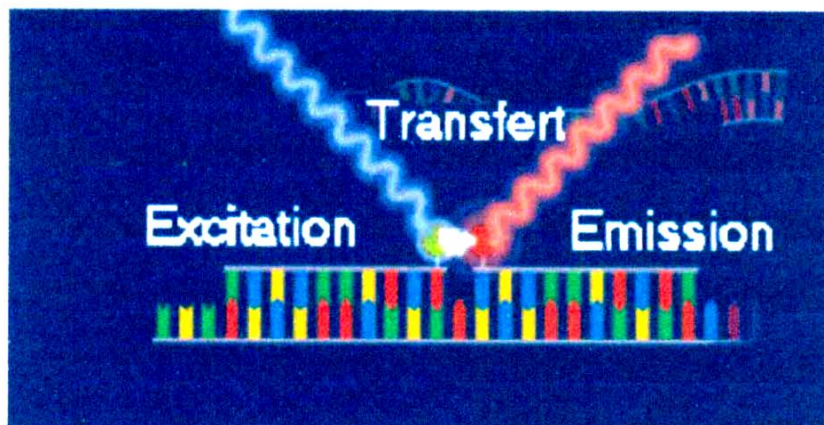


Figure 14. Hybridation des sondes

IV.3.4. Courbes de fusion

Chaque produit d'ADN double brin synthétisé a une température de fusion (T_m) spécifique, définie comme étant la température à partir de laquelle 50 % de l'ADN est sous forme double brin et 50 % sous forme simple brin.

Après le dernier cycle de PCR, la température est rapidement élevée à 95°C pour dénaturer l'ADN double brin, puis elle est abaissée à la température de couplage ce qui provoque la reformation d'ADN double brin. La température est ensuite élevée lentement à 95°C. La fluorescence est lue en continu pendant cette remontée :

- 1-les fluorophores sont fluorescents tant qu'ils sont liés à l'ADN double brin,
- 2-quand la température augmente, l'ADN double brin se dissocie, ce qui entraîne la libération des fluorophores dans le milieu et une diminution progressive de la fluorescence,
- 3-lorsque 50 % de l'ADN double brin sont dissociés, la fluorescence chute brutalement, c'est à cette température que correspond la température de fusion du produit synthétisé (Nakamura et al, 2002; Elyse Poitras and Alain Houde, 2002; Higuchi et al, 1992) (**Figure 15**).

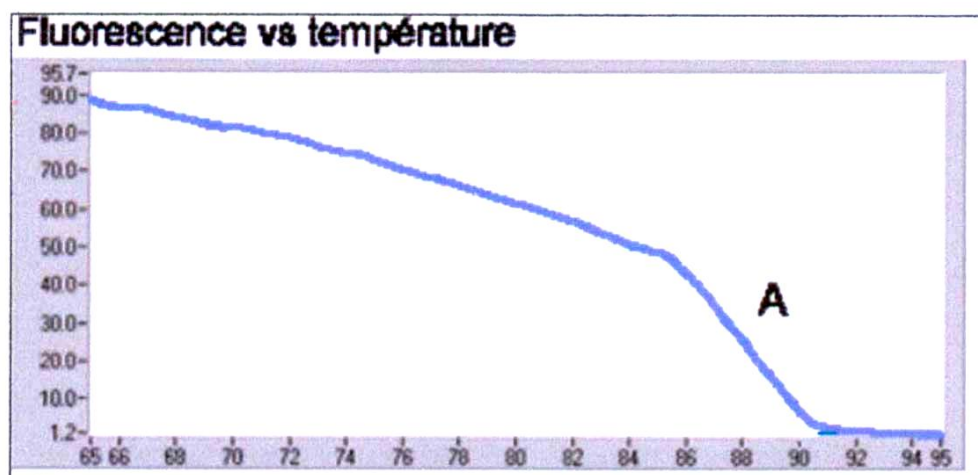


Figure 15. Courbe de fusion

L'exploitation des résultats du LightCycler, se fait grâce aux courbes de température de fusion qui sont obtenues en traçant la dérivée première négative de la fluorescence en fonction de la température : elle correspond au maximum de la courbe. C'est cette dérivée qui va être différente selon les polymorphismes

Les températures des pics étant très proches, l'utilisation de témoins, est fondamentale pour pouvoir exploiter les résultats.

Cette technique du Light Cycler, bien que chère à mettre en œuvre, constitue une avancée fondamentale car elle permet en seulement 40 minutes d'effectuer les génotypages.

IV.4. Techniques de dosage

En complément de l'étude génétique, il nous est apparu nécessaire d'apporter d'avantage de précision sur les complications de la leucémie sur le plan biochimique (bilan inflammatoire, lipidique, hépatique, rénale et cardiaque), pour cela un certain nombre d'analyses qui ne sont pas usuelles pour cette pathologie ont fait l'objet de caractérisation passant forcément par les différentes techniques de dosages.

En effet, le dosage de l'homocysteine a été effectué par technique immunologique par polarisation de fluorescence (FPIA), pour la PCR (protéine c-reactive): par mesure cinétique de l'intensité de la lumière diffusée par des complexes antigène-anticorps. En ce qui concerne la créatinine, on mesure, à 505 nanomètres, l'intensité de la coloration rouge-orangé du complexe que forment la créatinine et l'acide picrique en milieu alcalin. Le dosage du cholestérol se fait par

méthode cinétique, la concentration en cholestérol est déterminée par voie enzymatique à l'aide de cholestérol-estérase et de cholestérol-oxydase. Le dosage du cholestérol LDL, fait appel à la solubilisation micellaire sélective du cholestérol LDL à l'aide d'un détergent non ionique et à l'interaction d'un dérivé glucidique et de lipoprotéines (VLDL et chylomicrons). En revanche pour le cholestérol HDL, en présence de l'ion du magnésium, le sulfate de dextran forme des complexes sélectivement solubles dans l'eau avec LDL. L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration du cholestérol, est mesurée par photométrie. L'hydrolyse rapide et complète des triglycérides en glycérol et acides gras permet leurs dosages, en présence de peroxydase, l'eau oxygénée formée réagit avec l' amino-4 phénazone et le chloro-4 phénol avec formation d'un dérivé coloré rouge. Pour la TGO et la TGP le dosage a été réalisé par la mesure photométrique de l'AST pour l'une et l'ALT pour l'autre. En ce qui concerne la BNP, le dosage s'est fait par une méthode radio-immunologique (**voir l'annexe**).

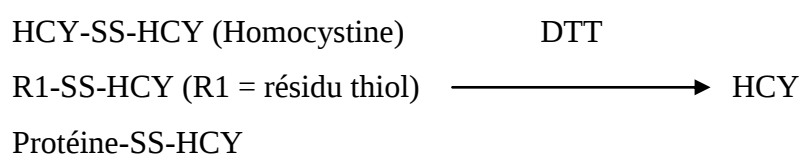
IV.4.1. Homocystéine

IV.4.1.1. Principes de dosage

Le dosage IMx Homocystéine est basé sur la technologie immunologique par polarisation de fluorescence (FPIA).

L'homocystéine liée (forme oxydée) est réduite en homocystéine libre, qui est à son tour convertie enzymatiquement en S- adénosyl-L-homocystéine (SAH) comme décrit ci-dessous :

- **Réduction** : L'homocystine, ses formes disulfures ainsi que les formes mixtes protéine-HCY présentes dans l'échantillon sont réduites en HCY libre sous l'action du dithiothréitol (DTT).



- **Conversion enzymatique** : L'HCY libre totale est convertie en S- adénosyl-L-homocystéine (SAH) en utilisant de la SAH-hydrolase et de l'adénosine en excès.



Dans des conditions physiologiques, la SAH-hydrolase convertit la SAH en homocystéine. L'adénosine en excès dans la solution de prétraitement permet de convertir l'Hcy en SAH par la SAH-hydrolase bovine.

Une partie de la SAH est mise avec le tampon de dilution FPIA1 et l'anticorps monoclonal pour mesurer le bruit de fond par le système optique FPIA. L'autre partie de la SAH est mise en présence de traceur marqué à la fluorescéine et de l'anticorps monoclonal, la SAH et le traceur entrent en compétition.

L'intensité de la polarisation de fluorescence est mesurée par le système optique FPIA.

IV.5. Méthodes statistiques

Une fois en possession des résultats génétiques et biochimiques on s'aperçoit que leur interprétation n'est pas toujours aisée car si certaines valeurs sont expressives, d'autres le sont moins voir même à la limite de l'ambiguïté. L'approche statistique s'impose alors avec force. L'analyse statistique des valeurs obtenues permet de dégager des relations entre variables paramétriques et définit des seuils de signification. Ainsi les opérations suivantes doivent être entreprises:

- Classification des différentes variables génétiques et biochimiques
- Opération de d'homogénéité et de stationnarité des échantillons
- Calcul de différents paramètres empiriques (Moyennes, variances, écarts types, coefficient de variation...)
- Calcul des différents tests d'adéquation (Chi2, Student...)
- Calcul des coefficients de corrélation

CHAPITRE V

RESULTATS ET DISCUSSION

A l'issue des travaux d'analyse effectués sur les échantillons sur le plan génétique et biochimique, il convient donc de présenter les résultats auxquels nous sommes arrivés. Ces résultats feront l'objet d'une présentation chiffrée et appuyée par une illustration graphique. Afin de mettre en évidence la relation éventuelle entre la maladie et son biomarqueur, objet de notre travail, l'ensemble des valeurs obtenues par analyse seront soumises à une analyse statistique; outil nécessaire à une interprétation dénuée de subjectivité.

V.1. Pour la MTHFR1 (C677T)

Cette variante du gène consiste en une mutation ponctuelle où la cytosine est remplacée par la thymine, soit une substitution de l'alanine par la valine au niveau protéique noté A222V ou au niveau allélique: C677T (Ueland et al, 2001; Zetterberg et al, 2002).

Ce polymorphisme relatif aux enzymes du métabolisme de l'homocystéine est celui qui a fait l'objet du plus grand nombre d'études dans les différents types de cancers et autres pathologies. Dans la plupart des études, les génotypes CC et CT ont été regroupés et comparés au génotype TT. Ce dernier est associé à une réduction très considérable de l'activité enzymatique de l'ordre de 50% à 37°C, ce qui vaut à l'enzyme mutée d'être qualifiée de thermolabile (Krajinovic et al.2005; Bosco et al, 2003). Toutefois, l'hétérozygotie s'accompagne d'une diminution de l'activité de l'enzyme moins importante qu'en cas de mutation homozygote (Frosst et al, 1995; Amouzou et al, 2004; Isolato et al, 2000).

Suite à la lecture des résultats, nous constatons que la population leucémique présente plus de sujets homozygotes mutés TT et moins de sujets hétérozygotes CT que la population témoins, cependant les deux populations ont montré presque la même proportion pour le génotype homozygote sain CC (**Tableau 3**) (**Figure 16, 17**).

Tableau 3. Fréquence des génotypes chez les deux populations.

ENZYMES	Malades			Témoins			Chi2
	Génotype	Nombre	Fréquence	Génotype	Nombre	Fréquence	> 5,99
MS	AA	29	61%	AA	64	67.3%	35.87
	AG	13	27%	AG	28	29.5%	
	GG	5	11%	GG	03	03.2%	
MSR	AA	22	47%	AA	34	35.8%	11.2
	AG	19	40%	AG	45	47.3%	
	GG	6	13%	GG	16	16.8%	
MTHFR1	CC	20	43%	CC	43	45%	24.1
	CT	18	38%	CT	44	46.3%	
	TT	9	19%	TT	8	08.42%	
MTHFR2	AA	27	58%	AA	62	65%	13.05
	AC	19	40%	AC	28	29.47%	
	CC	1	02%	CC	5	05.26%	

Les deux génotypes (CT) et (TT) ont présenté une hyperhomocystéinémie modérée significative entre les deux populations.

En effet les leucémiques montrent une concentration en homocysteine de **18,2 ± 2,24** pour le génotype hétérozygote (CT) et **21,77 ± 2,50** pour le génotype muté (TT). En revanche la population témoin présente, pour les même génotypes (CT) et (TT) des valeurs respective de **13.02 ± 0,79** et **13.25 ± 3,89** (Tableau 4).

Tableau 4. Concentration de l'Hcy chez les différents génotypes des populations témoin et malades.

ENZYMES	Malades		Témoins		Student
	Génotype	Moyenne Hcy $\mu\text{mol/L}$	Génotype	Moyenne Hcy $\mu\text{mol/L}$	
MS	AA	14.81 ± 1.69	AA	13 ± 0.66	5.56 / 2.07
	AG	19.12 ± 2.48	AG	13.65 ± 0.96	12.86 / 2.01
	GG	25 ± 6.31	GG	13 ± 4.86	8.37 / 2.45
MSR	AA	19.83 ± 4.76	AA	12.87 ± 0.85	18 / 2.07
	AG	16.70 ± 2.55	AG	13.15 ± 0.89	2.6 / 2.01
	GG	15.95 ± 3.35	GG	$13,64 \pm 1.12$	5.55 / 2.45
MTHFR1	CC	13.95 ± 2.73	CC	13.09 ± 0.75	3.18 / 2.09
	CT	18.20 ± 2.24	CT	13.03 ± 0.79	12.89 / 2.08
	TT	21.78 ± 2.50	TT	13.25 ± 3.89	5.14 / 2.16
MTHFR2	AA	18.45 ± 3.72	AA	13.58 ± 0.68	15.57 / 2.05
	AC	18.10 ± 3.15	AC	12.54 ± 0.94	12.24 / 2.09
	CC	8.5 ± 0.0	CC	13.02 ± 2.55	Néant

En faisant la comparaison des concentrations en homocysteine entre les différents génotypes, pour la même population malade, (CC), (CT), (TT), on retrouve une différence significative en concentration homocysteinémique entre les différents gènes (**Tableau 5**). Ceci nous conduit à déduire que le génotype le plus impliqué dans l'hyperhomocysteinémie est bien le muté TT.

Tableau 5. Comparaison de la concentration de l'Hcy pour la MTHFR1 entre les différents génotypes de la population malade.

ENZYMES	CC versus CT	CT versus TT	CC versus TT
MTHFR1	3.90 / 2.05	3.07 / 2.09	5.85 / 2.06

Les résultats auxquels notre modeste travail à aboutit doivent être considérés comme des résultats partiels. Cependant pour asseoir les bases solides d'une nouvelle méthode prospective de diagnostic, il sera nécessaire de travailler sur un plus grand nombre de malades qui assurera

d'avantage de fiabilité aux résultats. Néanmoins, le caractère significatif de ces derniers peut être considéré comme l'ouverture d'une petite voie dans la recherche de biomarqueurs tumoraux.

On peut considérer en effet que cette augmentation constatée dans la fréquence de la forme homozygote mutée accompagnée par une augmentation de l'homocystéine peut être associée au risque de leucémie lymphoblastique aigue. Ces données sont en accord avec des indications récentes de la littérature incitant à la réalisation d'études prospectives (Krajinovic, et al.2005; Valik, et al. 2005; Ruud, et al. 2006; Boduroglu et al, 2004).

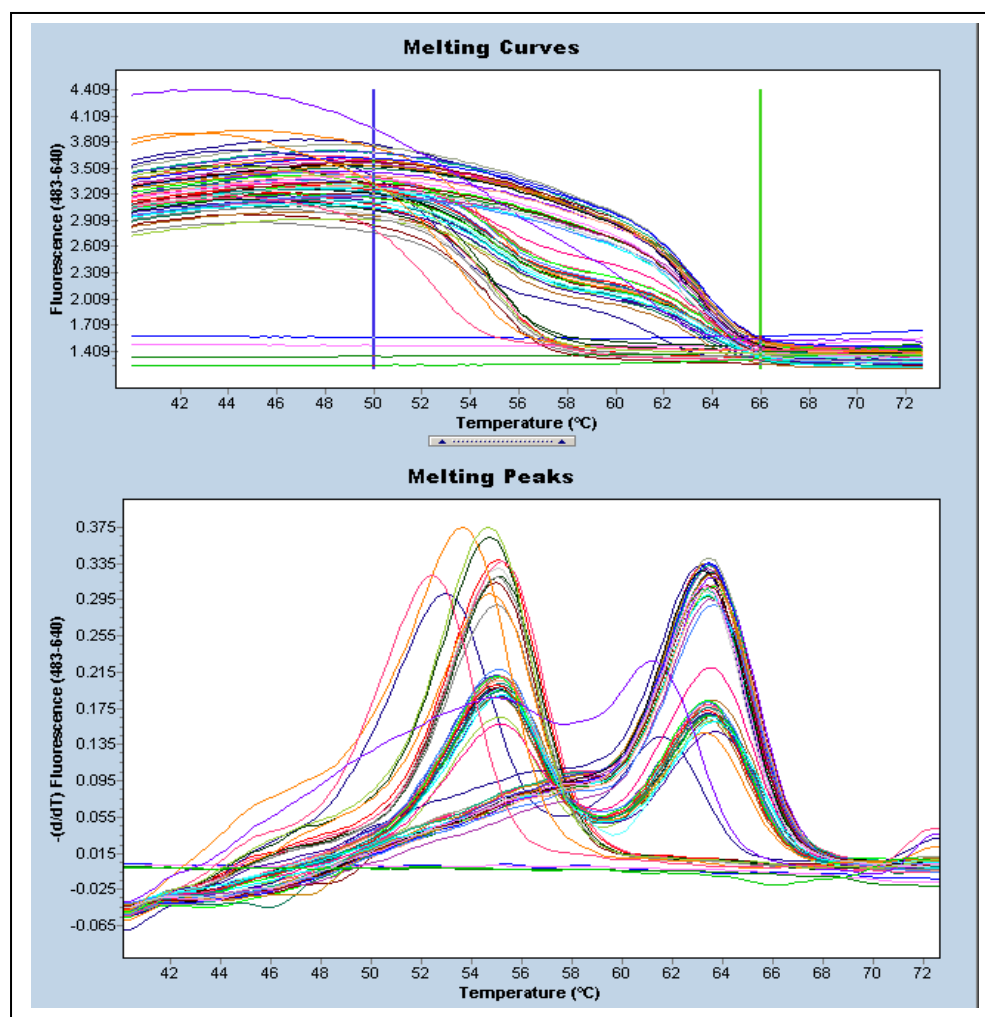


Figure 16. Détermination du polymorphisme génétique de la MTHFR1 avec PCR en temps

réel (Courbe de fusion pour les patients)

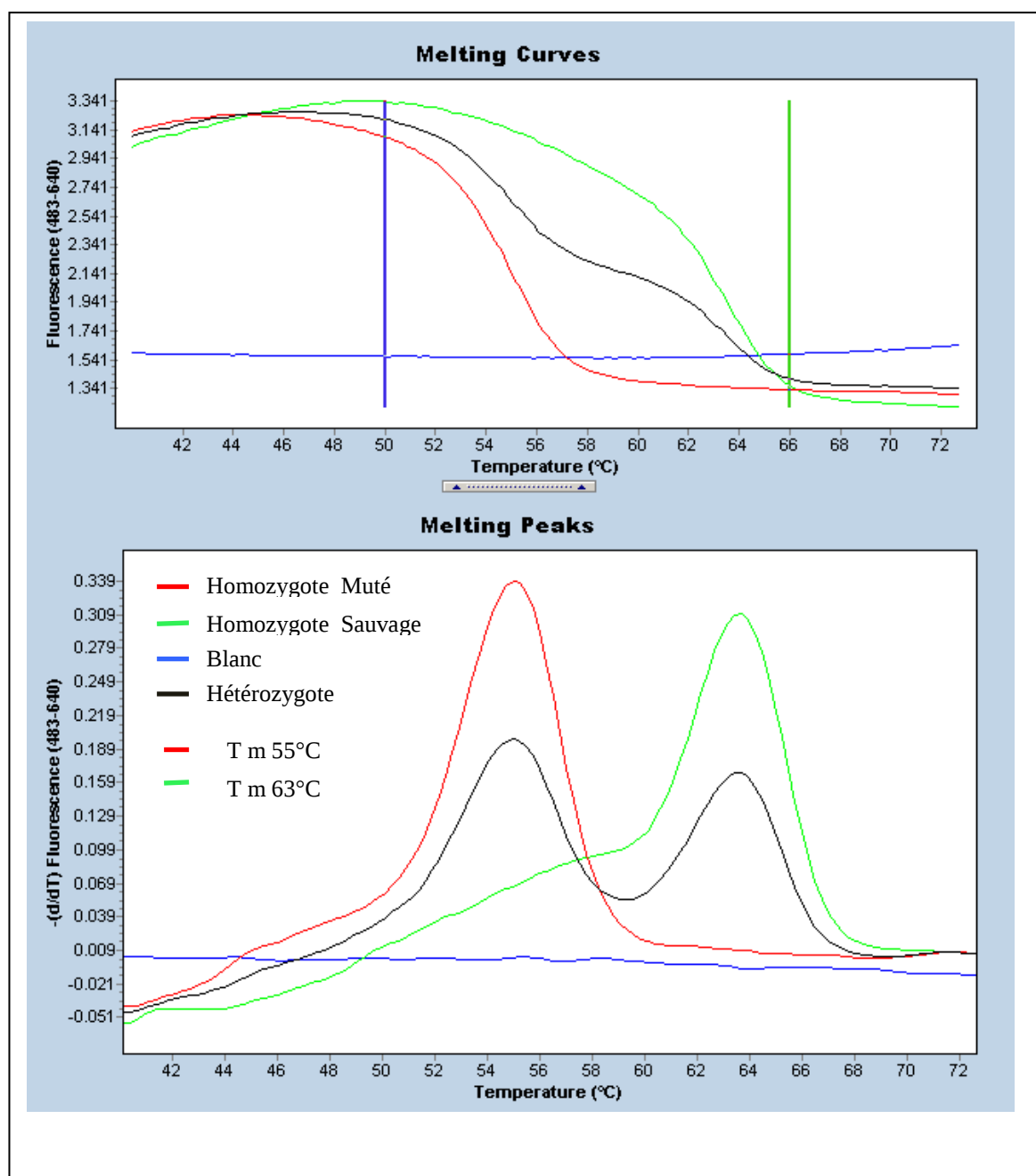


Figure 17. Détermination du polymorphisme génétique de la MTHFR1 avec PCR en temps réel (Courbe de fusion pour témoins)

V.2. Pour la MTHFR2 (A1298C)

Il s'agit d'une substitution d'une adénine en cytosine (A1298C), correspondant au niveau protéique par le remplacement d'un glutamate par une alanine au niveau du site de régulation de l'enzyme. Dans nos populations étudiées, les génotypes homozygotes mutés (CC) et sains (AA) sont moins fréquents chez les malades que les sains, alors que les sujets hétérozygotes (AC) sont beaucoup plus importants que dans la population saine (**Tableau 3**) (**Figure 18, 19**).

Beaucoup d'études ont montré que cette mutation n'est pas associée à une élévation du taux plasmatique d'homocystéine, que ce soit à l'état homozygote ou hétérozygote, (Sterba et al, 2006; Oikawa et al. 2003; Valik et al. 2005; Blount et al, 1997).

Cependant notre étude nous a permis d'enregistrer que pour deux génotypes (AA) et (AC) une hyperhomocystéinémie modérée significative (**Tableau 4**) chez les malades par rapport aux témoins. En revanche pour le génotype (CC) celle-ci n'est pas significative.

Même en comparant les génotypes de la population malade entre eux, nous ne trouvons pas de différence significative (Tableau 6)

Tableau 6. Comparaison de la concentration de l'Hcy pour la MTHFR2 entre les différents génotypes de la population malade.

ENZYMES	AA versus AC	AC versus CC	AA versus CC
MTHFR2	0.23 / 2.02	Néant	Néant

Il est très probable que la présence de MTHFR1 et MTHFR2 ensemble chez un sujet surtout à l'état homozygote conduit à une baisse de l'activité de la MTHFR plus importante que pour MTHFR1 seul (De Franchis et al, 1995; Gaughan et al, 2000)

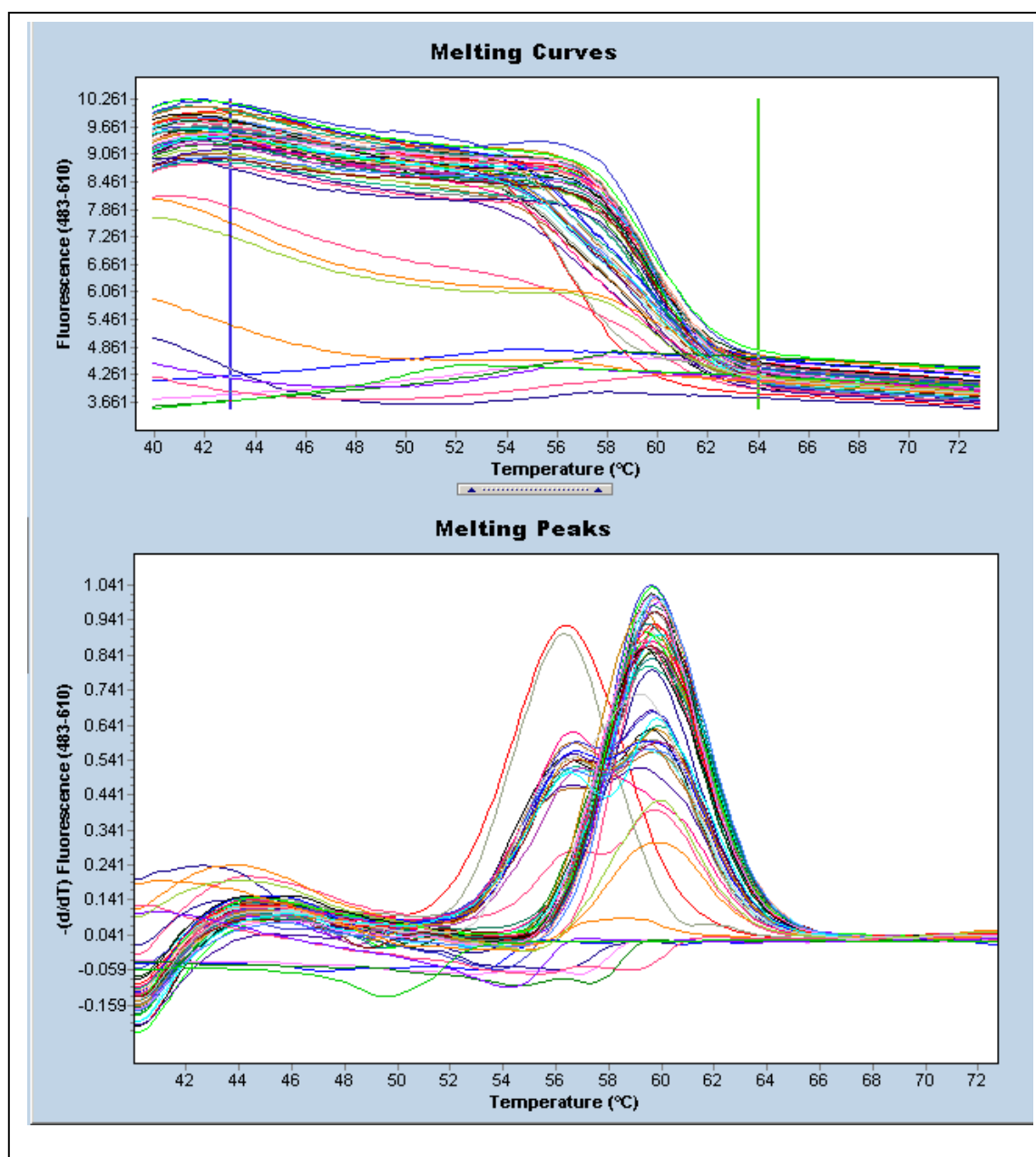


Figure 18. Détermination du polymorphisme génétique de la MTHFR2 avec PCR en temps réel (Courbe de fusion pour les patients)

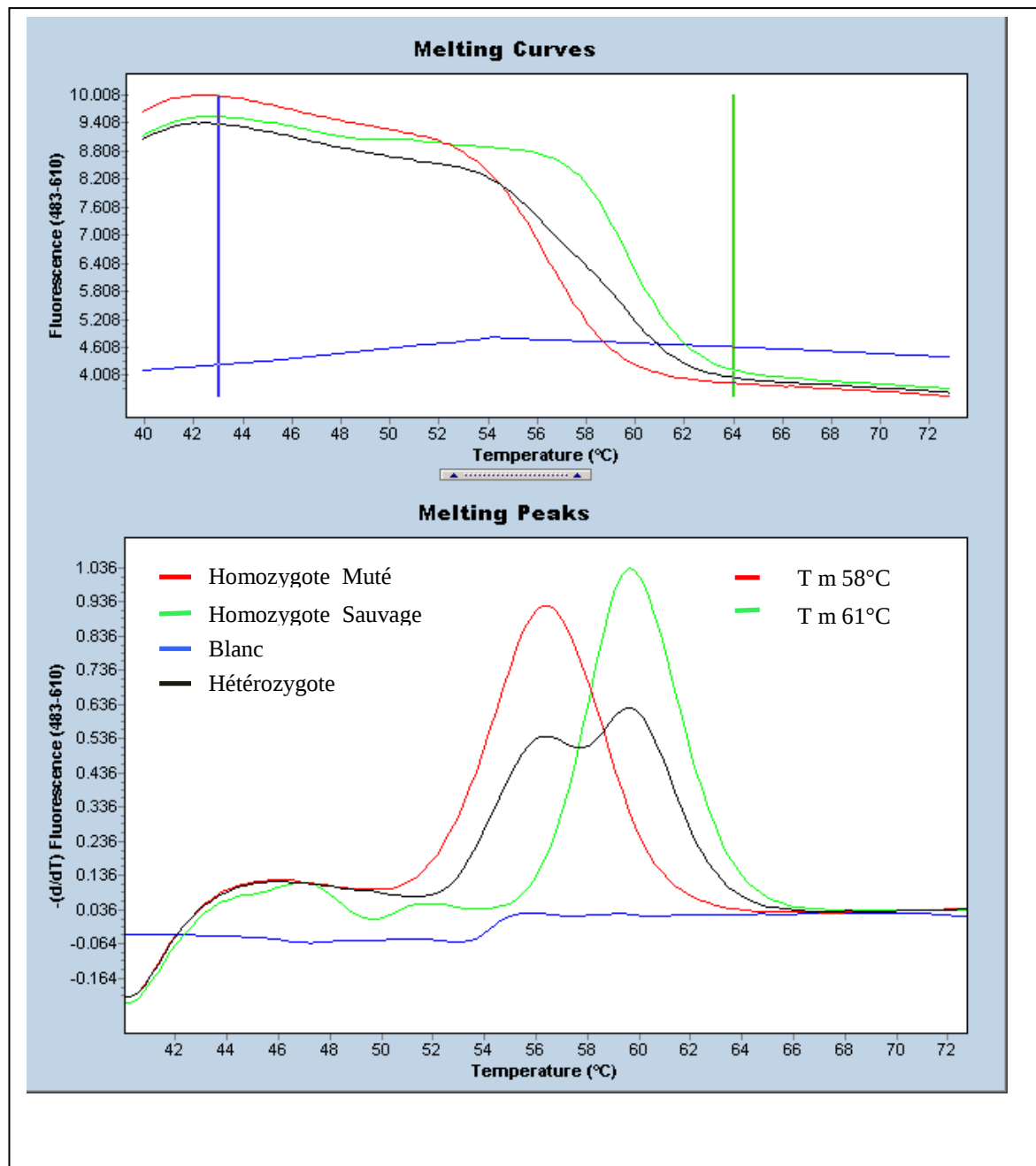


Figure 19. Détermination du polymorphisme génétique de la MTHFR2 avec PCR en temps réel (Courbe de fusion pour les témoins)

Pour la MS ou la MTR (A2756G)

Ce polymorphisme est situé à proximité de la zone de liaison entre l'apoenzyme et son cofacteur la vitamine B. Cette variante du gène consiste en une substitution d'une adénine par une guanine, en position 2756 dans la séquence nucléotidique, et qui dans la séquence protéique, se traduit par la substitution d'un acide aspartique par une glycine. D'après nos résultats, les génotypes homozygotes sains (AA) et hétérozygotes (AG) sont moins fréquents chez les malades que les sains, alors que les sujets mutés (GG) sont beaucoup plus importants que dans la population saine (**Tableau 3**) (**Figure 20, 21**).

Les trois génotypes (AA), (AG) et (GG) ont montré une hyperhomocystéinémie modérée significative entre les deux populations. Même si la concentration en homocystéine pour le génotype (AA) est à la limite inférieure de l'hyperhomocystéinémie modérée 14.81 ± 1.69 , on observe que les taux de cette dernière sont indicateurs d'hyperhomocystéinémie modérée pour les deux autres génotypes. En effet les leucémiques montrent une concentration en homocystéine de 19.12 ± 2.48 pour le génotype hétérozygote (AG) et pour le génotype muté (GG) une valeur de 21 ± 6.31 (**Tableau 4**).

Ces résultats sont confortés par la comparaison des valeurs de l'homocystéine pour les trois génotypes de la population malade. Cette comparaison indique une différence significative pour les génotypes AA versus AG et AA versus GG ce qui n'est pas le cas pour AG versus GG (**Tableau 7**).

Tableau 7. Comparaison de la concentration de l'Hcy pour la MS entre les différents génotypes de la population malade.

ENZYMES	AA versus AG	AG versus GG	AA versus GG
MS	12.15 / 2.11	1.86 / 2.09	3.61 / 2.03

Ce même résultat a été également rapporté par d'autres études, (Krajinovic et al. 2005; Valik, et al, 2005; Ruud et al, 2006; Geisel et al, 2001), tandis que d'autres travaux rapportent que ce polymorphisme n'est pas un facteur de risque de la leucémie lymphoblastique (Kishi et al, 2003; Jin and Yizun, 1998).

Ces différences de résultats pourraient être expliquées par les différences d'ethnie et du statut vitaminique.

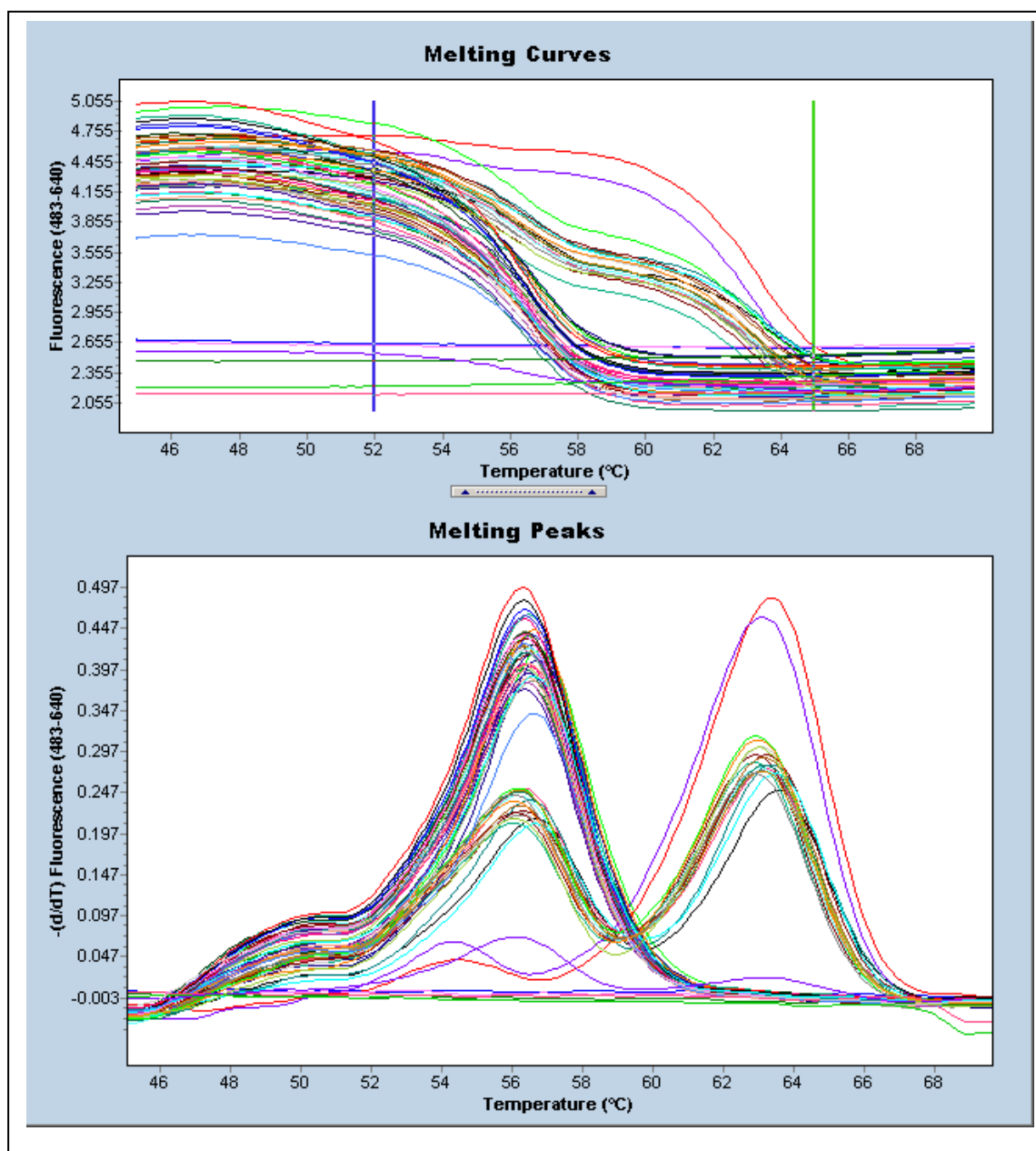


Figure 20. Détermination du polymorphisme génétique de la MTR avec PCR en temps réel
(Courbe de fusion pour les patients)

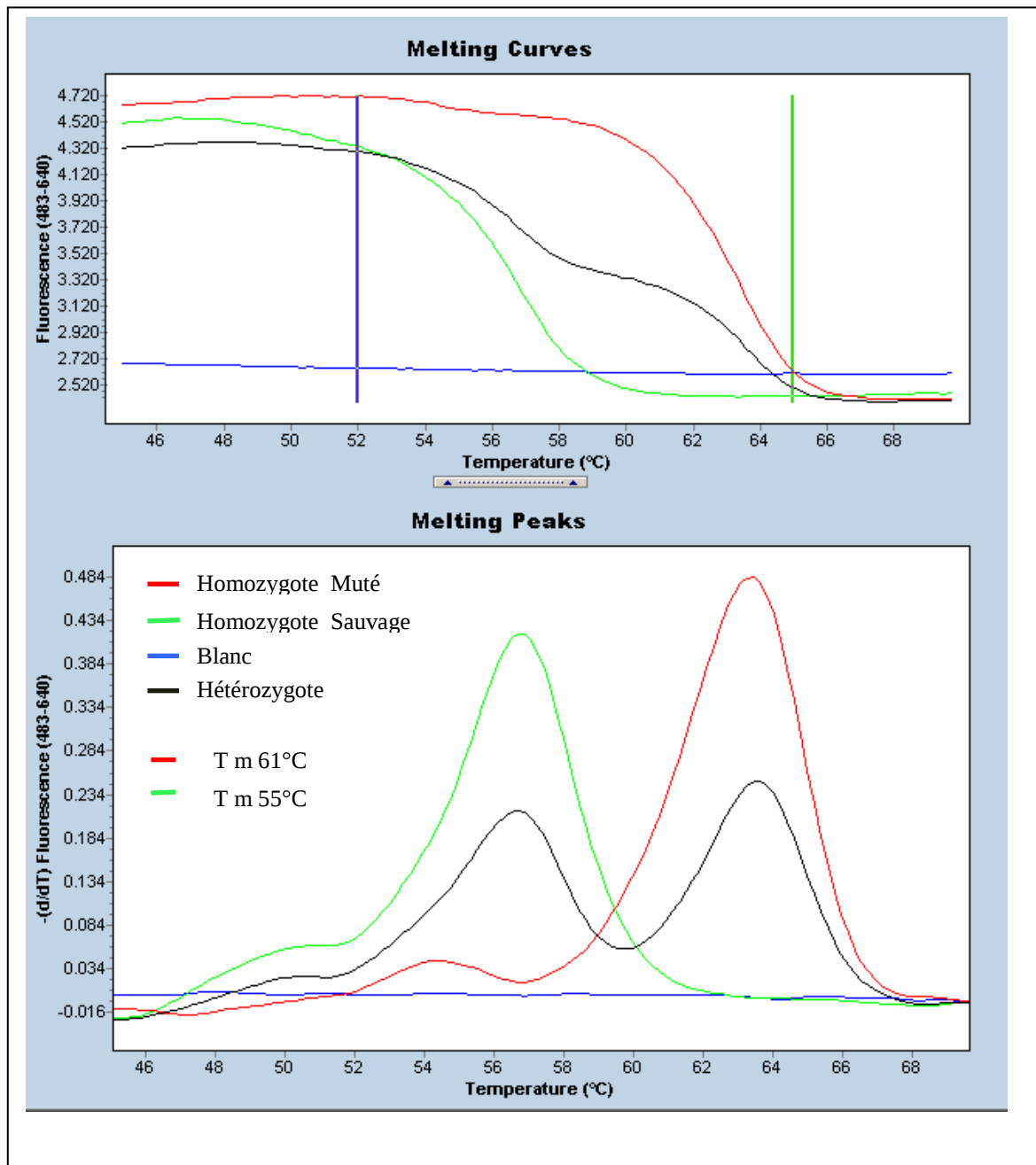


Figure 21. Détermination du polymorphisme génétique de la MTR avec PCR en temps réel

(Courbe de fusion pour les témoins)

Concernant la MSR ou la MTRR (A66G)

Cette mutation correspond à une substitution d'une adénine en position 66 sur la séquence d'ADN par une guanine, soit un remplacement d'une isoleucine par une méthionine au niveau protéique. Nos résultats ont montré que la population leucémique présente moins de sujets homozygotes mutés (GG=13%) et moins de sujets hétérozygotes (AG=40%) que la population témoins. Cependant, elle présente plus de sujets homozygotes sains (47%) (**Tableau 3**) (**Figure 22, 23**).

Deux des trois génotypes de cette enzyme ont montré une hyperhomocystéinémie modérée chez les leucémiques à savoir les génotypes (AA) et (AG) (**Tableau 4**).

En comparant les différents génotypes, AA, AG, GG, de la population malade entre eux, on s'aperçoit qu'il n'y a pas de différence significative qu'entre deux génotypes à savoir, AA et GG (**Tableau 8**).

Tableau 8. Comparaison de la concentration de l'Hcy pour la MSR entre les différents génotypes de la population malade.

ENZYMES	AA versus AG	AG versus GG	AA versus GG
MSR	1.66 / 2.06	0.51 / 2.16	2.53 / 2.04

Ces résultats pourraient orienter vers une implication de certains génotypes de ces quatre enzymes étudiés dans l'hyperhomocystéinémie et dans la leucémie lymphoblastique aiguë, cette implication de ces polymorphismes a été également rapportée par d'autres études (Krajinovic, et al, 2005; Valik et al, 2005; Ruud et al, 2006; Boduroglu et al, 2004).

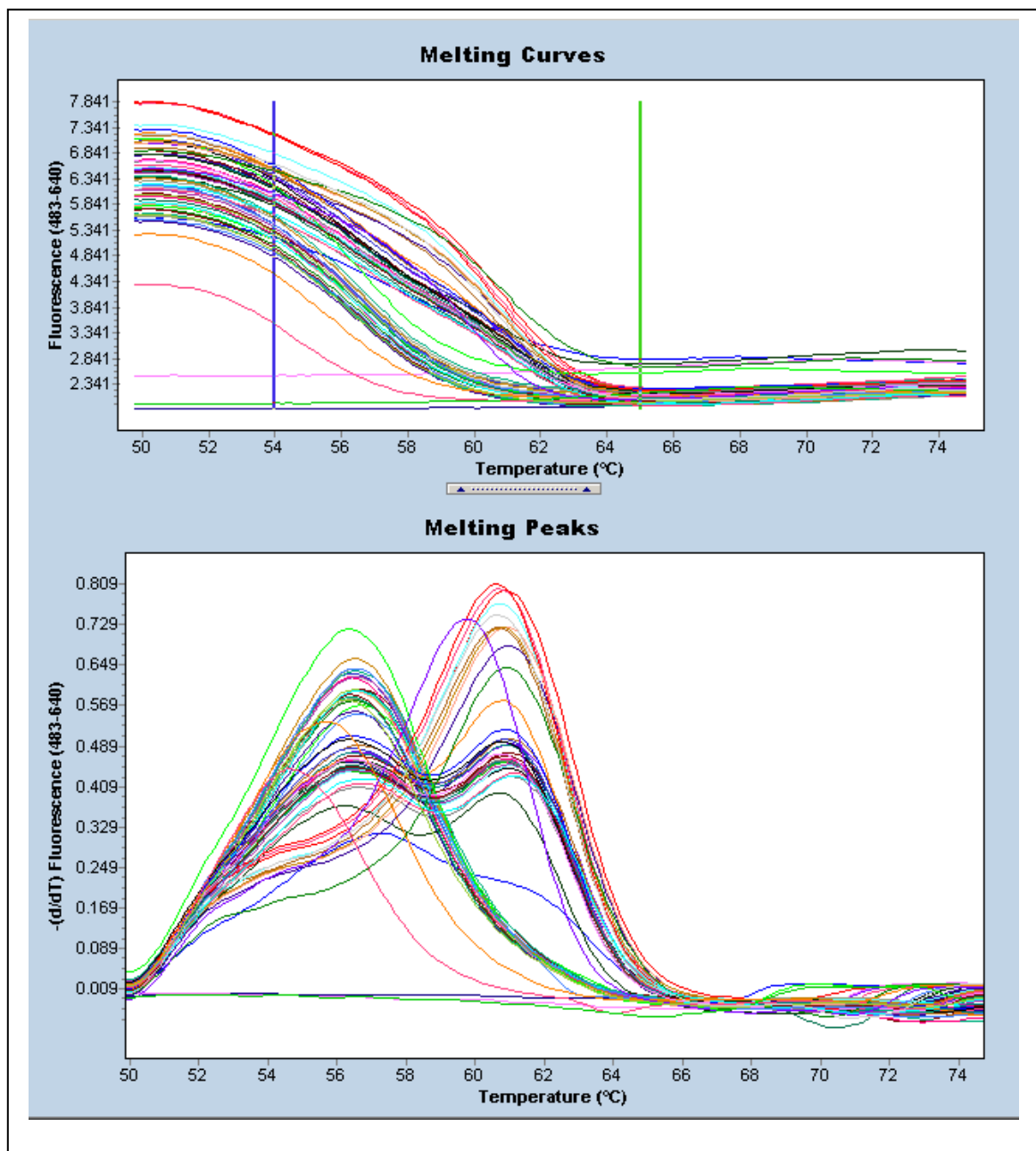


Figure22. Détermination du polymorphisme génétique de la MTRR avec PCR en temps réel

(Courbe de fusion pour les patients)

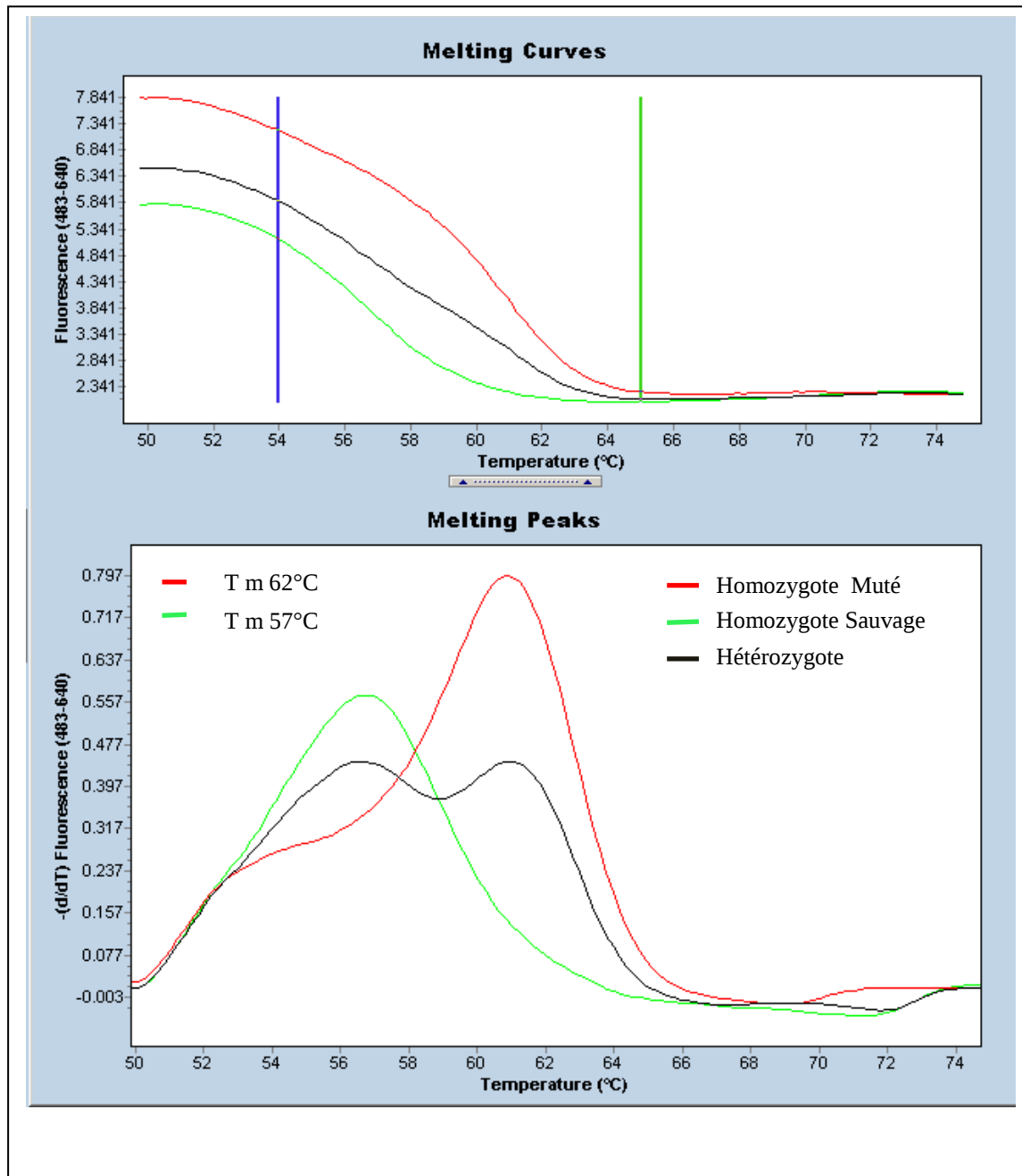


Figure 23. Détermination du polymorphisme génétique de la MTRR avec PCR en temps réel

(Courbe de fusion pour les témoins)

Sur le plan physiopathologique, la méthylation d'ADN est une réaction indispensable de l'expression du gène, et toute hypométhylation est impliquée de manière prépondérante dans le développement des cancers, En effet l'hyperméthylation est un des signes de fermeture du gène, donc ce gène ne sera pas transcrit, par contre une hypométhylation entraîne une activation de la transcription, c'est pourquoi l'hypométhylation est considérée comme un facteur de prolifération tumorale (Friso et al, 2002; Cedar, 1988; Tate et al, 1993).

La méthylation de l'homocystéine conduit à la formation de la méthionine qui à son tour est transformée en S-adénosyl-méthionine (SAM) qui est la molécule donneuse universelle de méthyle, cette dernière cède son groupement (CH₃) aux protéines, aux phospholipides et surtout à l'ADN. Cette voie métabolique est sous la dépendance de deux enzymes vitamines B dépendantes; la MS et la MTHFR, un défaut génétique concernant ces deux enzymes entrainera un défaut de méthylation de l'homocystéine et donc une hyperhomocystéinémie susceptible de se traduire par une hypométhylation de l'ADN (Bestro, 1998).

Pour que toutes ces réactions puissent se reproduire, la cellule doit disposer d'une source continue de SAM, dont la synthèse nécessite un apport suffisant de vitamine B12, vit B9 (acide folique), vit B6, vit B2 ainsi que du manganèse, d'où l'importance de ces facteurs nutritionnels à coté des facteurs génétiques dans le métabolisme de l'homocystéine (Ingrosso et al, 2003).

Le dosage d'autres paramètres biochimiques nous a permis de mieux comprendre quelques complications issues de cette pathologie ainsi que leur effet sur la modification de la composition biochimique du plasma de ces malades par rapport à celui des témoins.

L'une de ces conséquences constatées est l'augmentation très significative de la protéine C réactive (29.4 ± 13.97 versus $4,11 \pm 1.94$) (**Tableau 9**), cette dernière est présente à l'état normal à une valeur inférieure 5mg/l, mais qui s'élève de façon très importante est rapide dans tous syndrome inflammatoire. Celle-ci est actuellement considérée comme l'une des protéines dont le dosage permet de diagnostiquer et de suivre le processus inflammatoire (Anderson et al, 2000).

Tableau 9. Résultats des paramètres biochimiques chez les sains et les malades.

	Malade	Sains	Student	Student Théorique
HCY $\mu\text{mol/L}$	18,42 $\pm$ 1.68	13,71 $\pm$ 0.62	2,25	1,96
BNP pg/ml	65,34 $\pm$ 49	7,01 $\pm$ 2.36	2,52	
URE g/L	0,449 $\pm$ 0.12	0,478 $\pm$ 0.46	0,17	
CRE mg/L	10,31 $\pm$ 2.53	8,98 $\pm$ 0.41	0,98	
TGO UI/L	67,58 $\pm$ 28.6	32,62 $\pm$ 2.27	2,15	
TGP UI/L	14,63 $\pm$ 3.88	16,16 $\pm$ 1.64	1,23	
PCR mg/L	29,4 $\pm$ 13.97	4,78 $\pm$ 2.34	3,63	
CHOL g/L	1,23 $\pm$ 0.11	1,72 $\pm$ 0.13	4,75	
TRIGLYC g/L	1,29 $\pm$ 0.20	1,13 $\pm$ 0.14	2,51	
LDL g/L	0,28 $\pm$ 0.04	0,41 $\pm$ 0.02	6,43	
HDL g/L	0,60 $\pm$ 0.08	0,94 $\pm$ 0.05	6.56	

Ce marqueur de l'inflammation est synthétisé par le foie en réponse à la production de cytokines telles que IL-6, IL-1 β , IL-8 dont la production augmente en raison des lésions des cellules endothéliales sous l'effet de l'hyperhomocystéinémie ou suite à leur activation par des interactions avec des cytokines des macrophages, et le facteur de nécrose tumorale (TNF) dont la sécrétion est stimulée par des endotoxines provenant essentiellement des membranes des cellules tumorales (Bergmann et al, 1994).

Cette protéine pentraxine est capable de reconnaître des motifs moléculaires propres aux pathogènes, elle se lie aux résidus phosphorylcholine des lipopolysaccharides des parois de certaines germes opportunistes nouvellement installés suite à la faiblesse des capacités immunitaires des malades, cette liaison ne consiste pas à opsoniser ces microorganismes, mais elle peut aussi activer la cascade du complément en se liant au C1q, premier composant de la voie classique d'activation du complément (Anderson et al, 2000; Berliner et al, 1995).

A propos du bilan lipidique:

* Triglycérides

Forment une catégorie de composés lipidiques de l'organisme. Ils constituent la principale réserve énergétique et sont stockés dans les tissus adipeux, seules de petites quantités se trouvent dans le sang. Leur taux augmente avec des apports de sucre, d'alcool et le surpoids. On considère qu'un taux de triglycérides inférieur à 1,50 g/l est normal chez une personne dépourvue de facteur risque cardiovasculaire. Leur augmentation peut accroître le risque de maladies cardiovasculaire surtout en présence d'un taux élevé de cholestérol LDL (Yavasoglu, 2008; Alfthan et al, 1994)

La comparaison entre leucémiques et témoins a montré une légère différence significative ($1.29 \pm 0,20$ versus $1,02 \pm 0.08$) (**Tableau 9**), entre les deux populations en triglycérides, mais, elle reste sans conséquences étant donné que les concentrations moyennes obtenues sont de la catégorie d'un bilan normal.

* Le cholestérol

Est un des principaux lipides de l'organisme, très indispensable par son rôle dans la production des membranes, de certaines hormones et de la vitamine D. Son origine est double : pour une grande partie, il est fabriqué par le foie; pour le reste, il est d'origine alimentaire. Sa synthèse est augmentée en cas de l'alimentation en acides gras dits « saturés » d'origine animale. Normalement, le taux de cholestérol total doit être inférieur ou égal à 2g/l. Il est insoluble dans le sang, il doit s'unir à des « protéines de transport » ou lipoprotéines (Yavasoglu. 2008; Horton et al, 2002).

Nos populations d'étude ont montré des concentrations non pathologiques ($< 2\text{g/l}$) (**Tableau 9**), même si les malades ont présenté une légère diminution du cholestérol.

* Le HDL-cholestérol

Est une lipoprotéine de haute densité (HDL ou high density protein) qui a pour fonction de transporter l'excédent de cholestérol dans le sang vers le foie et participe à l'élimination de cette graisse par l'organisme. Il est parfois appelé bon cholestérol : car plus son niveau est élevé, plus le risque de développer des maladies cardiaques ou des AVC est faible, grâce à sa capacité d'éliminer les plaques artérielles et le ralentissement de leurs accumulation. On considère habituellement que sa concentration doit dépasser au minimum 0,40 g/l. Un HDL-cholestérol inférieur à 0,40 g/l, quel que

soit le sexe, constitue un facteur de risque cardiovasculaire. A l'inverse, un HDL-cholestérol supérieur ou égal à 0,60 g/l est un facteur protecteur (Yavasoglu. 2008; Heinecke et al, 1987).

Selon nos résultats, cette fraction lipidique reste dans l'intervalle des valeurs normales en dépit d'une diminution plus ou moins considérable chez la population leucémique (**Tableau 9**).

* Le LDL cholestérol

Est une lipoprotéine de basse densité (LDL ou low density protein) qui transporte le cholestérol provenant des aliments ou synthétisé par le foie vers les tissus. Il est parfois appelé le mauvais cholestérol car un haut taux peut augmenter la probabilité de maladies cardiovasculaires, en effet, d'autant plus forte que la valeur du LDL-cholestérol est élevée. Le taux de LDL-cholestérol considéré comme normal dépend de la présence ou non d'autres facteurs de risque cardiovasculaire : hypertension artérielle, diabète, tabagisme, excès de poids et sédentarité.

Généralement un taux de LDL cholestérol < 130 mg est l'indice d'une fraction de la norme, ce qui est compatible avec nos résultats (**Tableau 9**) (Yavasoglu. 2008; Friedewald et al, 1972; Heinecke et al, 1987).

D'après nos résultats, aucune dyslipidémie considérable ni sur le plan quantitative ou qualitative n'a été trouvée dans le cas de cette maladie sanguine, et le peu de différence constatée entre les deux groupes de patients est probablement liée aux comportements alimentaires des leucémiques.

* TGO et TGP

Ce sont des enzymes ayant une activité métabolique importante à l'intérieur des cellules, elles font partie des **transaminases**, par leur capacité de transférer un groupement aminé (NH₂) d'un acide aminé vers un acide α -cétonique. Elles interviennent dans la synthèse et la dégradation des acides aminés. Leur augmentation reflète une lésion cellulaire en particulier au niveau hépatique, cardiaque, rénal ou musculaire. Leurs valeurs normales dans le sang sont situées entre 4 – 45 UI/L pour la transaminase glutamate oxaloacétique, et de 5 à 45 UI/L pour la transaminase glutamate pyruvate (Bird et al, 1990). D'après nos résultats, on constate une augmentation très significative de TGO chez les leucémiques par rapport aux sains ($67,58 \pm 28,6$ UI/L versus $37,62 \pm 2,10$ UI/L) $T > 1, 96$, (**Tableau 9**), ce qui reflète une situation pathologique caractérisée par une souffrance cellulaire issue soit : d'un manque d'ATP qui va perturber le fonctionnement des pompes d'où l'augmentation du volume cellulaire qui se gonflent et s'éclatent, soit à l'augmentation du Ca^{++} intracellulaire qui ira activer des filaments contractiles à l'intérieure de la membrane, ce qui

conduira à la formation de vésicules et brèches ou pores cellulaires à travers lesquelles les enzymes vont quitter les cellules atteintes. Les lésions cellulaires entraînées par une hyperhomocystéinémie de ces malades peuvent être une autre origine de cette augmentation.

On notera qu'à propos de la TGP, aucune différence n'a été constatée entre les deux populations ($T < 1,96$) (**Tableau 9**).

*** Créatinine (CREA)**

La créatinine sérique est un produit de déchet métabolique normal qui est excrété dans l'urine, suite à la dégradation spontanée de la créatine dans le muscle. La majeure partie de la créatine se trouve dans les tissus musculaires sous forme de créatine phosphate et joue le rôle de réservoir de stockage de haute énergie pour la conversion en adénosine triphosphate (ATP).

Le taux de formation de créatinine est pratiquement constant : 1 ou 2 % de la créatine est convertie en créatinine toutes les 24 heures. Son taux normal dans le sang est de 6 à 13 mmol/l. Il est dosé pour surveiller la fonction rénale ou dans le dépistage d'une altération de celle-ci (Bostom and Lathrop, 1997; Dennis and Robinson, 1996; Aldamiz-Echevarria et al, 2002.).

Aucune différence significative n'a été constatée entre la population malade et la population contrôle ($T < 1,96$) (**Tableau 9**), ce qui indique que la fonction rénale est normale, et aucune corrélation ne peut être suscitée entre la fonction rénale et leucémie.

*** L'urée**

Appelée également diamide de l'acide carbonique, formée dans le foie lors du cycle de l'urée à partir de l'ammoniac provenant de la dégradation des acides aminés, elle est éliminée par le rein, son dosage est moins fiable que celui de la créatinine pour évaluer la fonction rénale, car la variation de son taux dépend également d'autres facteurs, elle augmente en particulier lors des régimes riches en protéines et dans certaines autres situations. Les quantités normales d'urée dans le sang varient de 0,2 à 0,5 g/l (Bostom and Lathrop; 1997; Levey et al, 1999; Xu Tao et al; 2008).

D'après nos résultats, la fonction rénale des leucémiques est intacte, donc l'absence de toute corrélation entre la maladie en question est l'insuffisance rénale (**Tableau 9**).

*** BNP (Brain Natriuretic Peptide)**

Est une petite hormone cardiaque; sécrétée par les myocytes de la paroi ventriculaire gauche en réponse à une hypoxie, une ischémie et une augmentation de la tension pariétale. Le dosage du

BNP semble être considéré actuellement comme un marqueur utile des fonctions du myocarde et dont la valeur référence est < 100 ng/L.

Selon nos résultants, les malades présentent une élévation considérable de BNP par rapport aux sains (65.34 ± 49 versus 6.37 , $T > 1,96$), (**Tableau 9**), ce qui n'exclue pas l'existence de corrélation entre la BNP et leucémie lymphoblastique aigue.

CONCLUSION GENERALE

Au terme de ce travail de recherche, il convient de conclure sur les principaux aspects traités à travers un survol rapide du document à présenter.

Les cancers sont les maladies qui font le plus de décès dans le monde. Les efforts financiers et humains déployés dans le domaine de la recherche pour la lutte contre ces maladies sont énormes. Cependant les résultats restent encore en deçà des espérances et des attentes des populations malades.

L'ensemble des spécialistes s'accordent sur le fait qu'un diagnostic précoce et précis augmente considérablement les possibilités de guérison.

Un diagnostic précoce ne peut être pratiqué cependant que grâce à des indicateurs spécifiques en l'occurrence les *biomarqueurs* dont la détection et la mise en évidence peut prélude le plus souvent à l'apparition de la maladie.

De nombreuses voies de recherche dans ce domaine ont été ouvertes parfois avec succès. Ainsi de nombreux marqueurs se sont imposés comme outils de diagnostic dans certains cancers.

Cependant la grande variété des cancers et le nombre important des marqueurs potentiels pouvant leur être associés nous montre combien le chemin est encore long pour la maîtrise du problème et incite à plus d'effort dans la recherche de nouveaux marqueurs concernant cette maladie hautement mortelle.

Le travail de recherche mené en collaboration avec le CHU de Batna et le CHU de NANCY a porté essentiellement sur la recherche de nouveau biomarqueurs dans le diagnostic des cancers. La recherche s'est focalisée sur l'éventuelle relation pouvant lier l'homocystéinémie à un type de cancer en l'occurrence la leucémie lymphoblastiques aigues dont certains travaux récents ont commencé à s'y intéresser.

En effet la recherche de marqueurs fiables pour la détection précoce des cancers, constitue aujourd'hui une voie importante dans le domaine de la recherche médicale.

L'hypothèse de départ dans ce travail consiste à établir une éventuelle relation significative entre l'hyperhomocystéinémie comme marqueur tumoral et la LLA. Cette hypothèse a été abordée à travers l'analyse comparative portant sur des sujets sains et des sujets atteints de leucémie lymphoblastique aigüe. Les sujets malades ont été sélectionnés parmi ceux n'ayant pas reçu de traitement chimiothérapique, dans le but d'éviter de biaiser les résultats sachant que ce type de

traitement clinique peu induire une hyperhomocystéinémie modérée et influencer les autres paramètres.

Ces précautions étant prises, les échantillons de sang ont fait l'objet d'analyses génétiques et biochimiques

Il ressort des résultats obtenus que certains se distinguent par des valeurs qui semblent significatives. Celles-ci appellent une analyse statistique capable d'établir d'une manière objective les différentes relations d'une part entre variables génétiques hyperhomocystéinémie et d'autre part certains paramètres biochimiques et cette pathologie.

Sur le plan génétique nous avons constaté d'une part que certains génotypes tels que CT et TT de la MTHFR1 ont présenté une hyperhomocystéinémie modérée significative entre les deux populations, et d'autre part le génotype muté TT apparaît comme le plus associé à l'hyperhomocystéinémie.

Par ailleurs, cette dernière se trouve associée d'une manière significative aux deux génotypes (AA) et (AC) de la MTHFR2. On notera que les deux génotypes AG et GG de la MTR (A2756G) semblent liés à cette concentration élevée de l'acide aminé en question chez les leucémiques.

Concernant la MTRR (A66G), il est à noter que seuls les polymorphismes AA et AG ont montré une hyperhomocystéinémie modérée significative entre les deux populations.

Sur le plan biochimique certains paramètres notamment la PCR, la BNP et La TGO accusent des niveaux de concentration considérables qui pourrait éventuellement être issues des complications pathologiques de cette forme de leucémie.

Il apparaît donc clairement que l'hyperhomocystéinémie peut être corrélée d'une manière significative avec ce type de cancer sanguin.

Il n'y a aucun doute sur le caractère partiel de nos résultats en dépit de leur aspect encourageant. Néanmoins une confirmation du rôle de l'homocystéine en tant que biomarqueur tumoral affirmé de la leucémie lymphoblastique aigue nécessitera d'avantage de recherche sur cette voie qui touchera des populations à effectifs plus importants permettant une meilleure validation des résultats. Ces derniers sont à même d'assurer une démarche prospective dans les diagnostics précoces de cette maladie hautement mortelle.

ANNEXE

TECHNIQUES DE GENOTYPAGE

COMPOSITION DE LA MIXTURE D'AMPLIFICATION :

	µl/tube		Concentration finale	MIX (Nb de tubes + 1)
H2O	10.25			
Amorce MTHFR 1 sens C677T 4picoM/µl 5'TGGCAGGTTACCCCAAAGG 3'	2.5 de SF		0,5µM	
Amorce MTHFR 1 anti-sens C677T 4picoM/µl 5'TGATGCCCATGTCGGTGC 3'	2.5 de SF		0.5µM	
Probe Flu MTHFR 1 4picoM/µl TGAGGCTGACCTGAAGCACTTGAAGG AGAAGGTGTC TX	0.5 (1µl de SM+24µl H2O ou 2µl de SM+48µl H2O)		0.2µM	
Probe Red MTHFR 1 8picoM/µl CGGGAGCCGATTTTCATCAT p	0.25 (2µL de SM+23µl H2O ou 4µL SM+46µl H2O)		0.2µM	
Kit LC 480 genotyping 5X (pret à l'emploi)	2 de SM			

Déposer 18µl de mix dans chaque puits et ajouter ensuite 2µl de DNA
(concentration finale comprise entre 10 et 20 ng/analyse) **Centrifuger la plaque à 1500g
(2730rpm) pendant 2mn.**

PROGRAMME

Temps de réaction :			
target (°C)	Acquisition Mode = Type	Hold (hh :mm :ss)	Ramp Rate (°C/s) = Pente
DENATURATION		Cycles : 1	Analysis Mode : None
95	None	00 :10 :00	4.4
PCR		Cycles : 45	Analysis Mode : Quantification
95	None	00 :00 :10	4.4
55	Single	00 :00 :10	2.2
72	None	00 :00 :10	4.4
COURBES DE FUSION		Cycles : 1	Analysis Mode : Melting curves
95	None	00 :00 :30	4.4
40	None	00 :02 :00	2.2
85	Continuous		
REFROIDISSEMENT		Cycles : 1	Analysis Mode : None
40	None	00 :00 :30	2.2

RESULTATS :

MTHFR 1	génotypage	Températures de fusion (Tm)
Homozygote sauvage	CC	63°C
Homozygote muté	TT	55°C
hétérozygote	CT	54°C+64°C

COMPOSITION DE LA MIXTURE D'AMPLIFICATION :

	µl/tube		Concentrati on finale	MIX (Nb de tubes + 1)
H2O	10.25			
Amorce MTHFR 2 sens A1298C 4picoM/µl 5'CTTTTGGGAGCTGAAGGACTACTAC 3'	2.5 de SF		0,5µM	
Amorce MTHFR 2 anti-sens A1298C 4picoM/µl 5'CACTTTGTGACCATTCGGGTTTG 3'	2.5 de SF		0.5µM	
Probe Flu MTHFR 2 4picoM/µl AAGGAGGAGCTGCTGAAGATGTGGGGGG AGGAGCTX	0.5 (1µl de SM+24µl H2O ou2µl de SM+48µl H2O)		0.2µM	
Probe Red MTHFR 2 8picoM/µl LC Red 610 ACCAGTGAAGAAAGTGTCTTTGAp	0.25 (2µL de SM+23µl H2O ou 4µL SM+46µl H2O)		0.2µM	
Kit LC genotyping 5X (prêt à l’emploi)	2 de SM			

Déposer 18µl de mix dans chaque puits et ajouter ensuite 2µl de DNA

(Concentration finale comprise entre 10 et 20 ng/analyse) Centrifuger la plaque à 1500g (2730rpm) pendant 2mn.

PROGRAMME

Temps de réaction :			
target (°C)	Acquisition Mode = Type	Hold (hh :mm :ss)	Ramp Rate (°C/s) = Pente
DENATURATION		Cycles : 1	Analysis Mode : None
95	None	00 :10 :00	4.4
PCR		Cycles : 45	Analysis Mode : Quantification
95	None	00 :00 :10	4.4
55	Single	00 :00 :10	2.2
72	None	00 :00 :10	4.4
COURBES DE FUSION		Cycles : 1	Analysis Mode : Melting curves
95	None	00 :00 :30	4.4
40	None	00 :02 :00	2.2
73	Continuous		
REFROIDISSEMENT		Cycles : 1	Analysis Mode : None
40	None	00 :00 :30	2.2

RESULTATS :

MTHFR 2	génotypage	Températures de fusion (Tm)
Homozygote sauvage	AA	61°C
Homozygote muté	CC	58°C
hétérozygote	AC	58°C+61°C

COMPOSITION DE LA MIXTURE D'AMPLIFICATION :

	µl/tube	Concentration finale	MIX (Nb de tubes + 1)
Amorce sens MTR (5µM) 5'TAT GGC TAT CTT GCA TTT TCA G 3'	1	0.5µM	
Amorce antisens MTR (5µM) 5'TTT ACA CTC CTC AAA ACC ATT 3')	1	0.5µM	
Probe Flu MTR (4µM) 5'AGACTCATAATGG CCCTGT CTAATAT 3'	0.5 (1µL de SM+24µL H2O ou 2µL de SM+48µL H2O)	0.2µM	
Probe Red MTR (8µM) LC Red 640 5'TCATATTCTTCCAT GATTCCTCAAAGTATTCATCCT3'	0.5 (2µL de SM+23 µL H2O ou 4µL de SM+46µL H2O)	0.4µM	
Mix probe masterLC 480 (pret à l'emploi)	5		

Déposer 8µl de mix dans chaque puits et ajouter 2µl de DNA

(Concentration finale comprise entre 10 et 20 ng/analyse) Centrifuger la plaque à 1500g (2730rpm) pendant 2mn.

PROGRAMME

Detection format : Multi Color HybryProbe

Temps de réaction :			
target (°C)	Acquisition Mode = Type	Hold (hh :mm :ss)	Ramp Rate (°C/s) = Pente
DENATURATION		Cycles : 1	Analysis Mode : None
95	None	00 :10 :00	4.4
PCR		Cycles : 50	Analysis Mode : Quantification
95	None	00 :00 :10	4.4
50	Single	00 :00 :15	2.2
72	None	00 :00 :15	4.4
COURBES DE FUSION		Cycles : 1	Analysis Mode : Melting curves
95	None	00 :00 :20	4.4
45	None	00 :02 :00	2.2
80	Continuous		
REFROIDISSEMENT		Cycles : 1	Analysis Mode : None
40	None	00 :00 :30	2.2

choisir filtre comb : Red 640 (483-640)

RESULTATS :

MTR	géotypage	Températures de fusion (Tm)
Homozygote sauvage	AA	55°C
Homozygote muté	GG	61°C
hétérozygote	AG	55°C+61°C

COMPOSITION DE LA MIXTURE D'AMPLIFICATION :

	$\mu\text{l}/\text{tube}$	Concentration finale	MIX (Nb de tubes +1)
H2O	3		
Amorce sens MSR1 (5pM) 5' GCA AAG GCC ATC GCA GAA GAC AT 3'	1	0.5 μM	
Amorce antisens MSR2 (5pM) 5'GTG AAG ATC TGC AGA AAA TCC ATG TA 3'	1	0.5 μM	
Probe Flu MTRR (4 μM) 5' CCA CAG CTT GCT CAC ACA TTT C 3'	0.5 (1 μL de SM+24 μL H2O ou 2 μL de SM+48 μL H2O)	0.2 μM	
Probe Red MTRR (8 μM) LC Red 640 5' CTG CGA TGG CCT TTG CCT GTC CCT 3'	0.5 (2 μL de SM +23 μL H2O ou 4 μL de SM+46 μL H2O)	0.4 μM	
Kit LC genotyping 5X (prêt à l'emploi)	2 de SM		

Déposer 8 μl de mix dans chaque puits et ajouter 2 μl de DNA

(concentration finale comprise entre 10 et 20 ng/analyse) Centrifuger la plaque à 1500g (2730rpm) pendant 2mn.

PROGRAMME

Temps de réaction :			
target (°C)	Acquisition Mode = Type	Hold (hh :mm :ss)	Ramp Rate (°C/s) = Pente
DENATURATION		Cycles : 1	Analysis Mode : None
95	None	00 :10 :00	4.4
PCR		Cycles : 50	Analysis Mode : Quantification
95	None	00 :00 :10	4.4
58	Single	00 :00 :15	2.2
72	None	00 :00 :15	4.4
COURBES DE FUSION		Cycles : 1	Analysis Mode : Melting curves
95	None	00 :00 :20	4.4
50	None	00 :03 :00	2.2
75	Continuous		
REFROIDISSEMENT		Cycles : 1	Analysis Mode : None
40	None	00 :00 :30	2.2

RESULTATS :

MTRR	génotypage	Températures de fusion (Tm)
Homozygote sauvage	AA	57°C
Homozygote muté	GG	62°C
hétérozygote	AG	57°C+62°C

TECHNIQUES DE DOSAGE

Protéine c réactive (PCR)

Principe de dosage

Le Beckman ICS utilisé est un néphélémètre manuel dont le principe d'utilisation est basé sur la mesure cinétique de l'intensité de la lumière diffusée par des complexes antigène-anticorps.

Le réactif anticorps est constitué par un antisérum de chèvre anti-CRP humaine. La calibration est réalisée en un point grâce à un sérum d'origine humaine (Kallestad titrant 56,4 mg/l).

Le contrôle de la calibration est effectué grâce à un pool de patients. La mesure est réalisée dans des cuves à usage unique contenant chacune un barreau aimanté pour l'agitation. Les spécimens doivent être préalablement traités : le sérum (100µl) est dilué au 1/6° à l'aide du tampon fourni dans le coffret ; après centrifugation, 1 00 µl de surnageant sont déposés dans la cuvette-agitateur ; 42 µl d'antisérum de chèvre anti-CRP humaine permettent ensuite la réaction d'immunoprécipitation.

Créatinine

Principe de dosage

Les techniques les plus utilisées sont fondées essentiellement sur la réaction de Jaffé, décrite en 1886. Elles mesurent, à 505 nanomètres, l'intensité de la coloration rouge-orangé du complexe que forment la créatinine et l'acide picrique en milieu alcalin.

Les modalités d'application de la réaction de Jaffé sont fort nombreuses la technique qu'on a utilisé est la Technique basée sur une réaction au picrate alcalin et une mesure cinétique.

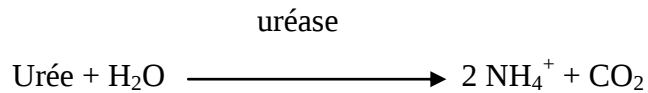
Ce principe est de loin le plus utilisé dans les laboratoires. Les réactifs commercialisés les plus employés sont ceux proposés par les sociétés Biotrol .

Certaines substances réagissent avec le picrate alcalin plus lentement que la créatinine (glucose, lactulose, protéines, céphalosporines...), d'autres plus rapidement (acétoacétate...) ; c'est pourquoi le dosage de la créatinine par mesure de la cinétique de la réaction de Jaffé permet de minimiser l'effet de ces substances "Jaffé positives" et "Jaffé négatives".

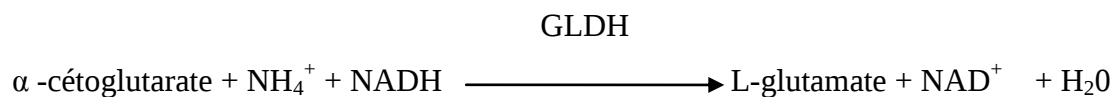
Urée

Principe de dosage

- Le réactif R1 (tampon/NADH) est ajouté à l'échantillon.
- L'addition du réactif R2 (tampon/enzymes/substrat) conduit au déclenchement de la réaction:
Sous l'action catalytique de l'uréase l'urée est hydrolysée en CO₂ et ammoniac:



L'ammoniac formé réagit ensuite avec l' α -cétoglutarate et le NADH en présence de GLDH avec formation de glutamate et de NAD⁺ :



La diminution d'extinction due à la consommation de NADH est ensuite mesurée par une méthode cinétique.

Cholestérol

Principe de dosage

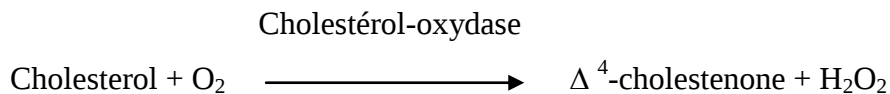
L'addition, à l'échantillon, du réactif R1 (réactif cholestérol) conduit au déclenchement de la réaction:

La concentration en cholestérol est déterminée par voie enzymatique à l'aide de cholestérol-estérase et de cholestérol-oxydase.

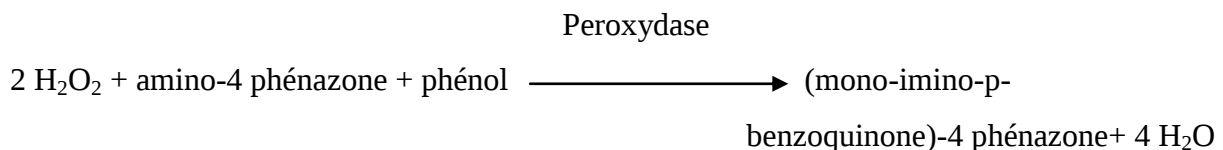
Sous l'action de la cholestérol-estérase les esters du cholestérol sont scindés en cholestérol et acides gras:



Dans une réaction ultérieure catalysée par la cholestérol-oxydase le cholestérol est transformé, en présence d'oxygène, en, Δ^4 -cholestenone avec formation d'eau oxygénée:



En présence de peroxydase l'eau oxygénée formée réagit avec l'amino-4 phénazone et le phénol avec formation d'un dérivé coloré en rouge:



L'intensité de la coloration développée est directement proportionnelle à la concentration en cholestérol et est mesurée par photométrie.

LDL

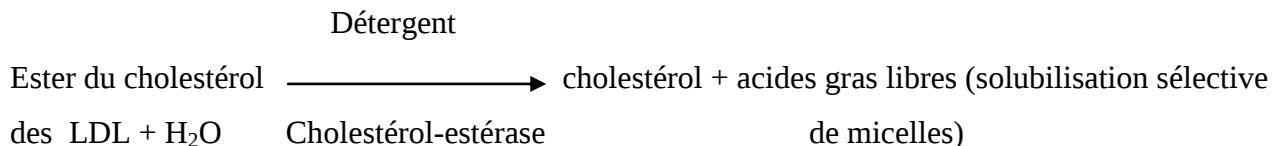
Principe de dosage

La méthode directe de dosage du cholestérol LDL, fait appel à la solubilisation micellaire sélective du cholestérol LDL à l'aide d'un détergent non ionique et à l'interaction d'un dérivé glucidique et de lipoprotéines (VLDL et chylomicrons).

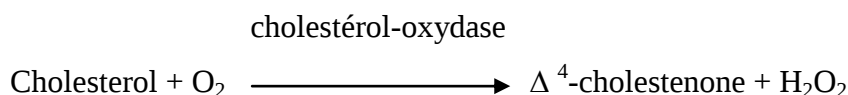
Si l'on intègre un détergent dans le dosage enzymatique du cholestérol effectué à l'aide de cholestérol-estérase et de cholestérol-oxydase, le cholestérol des différentes fractions lipoprotéiques présente une réactivité croissante dans l'ordre suivant : HDL < chylomicrons < VLDL < LDL. En présence de Mg^{++} , la réaction enzymatique du cholestérol des VLDL et des chylomicrons est considérablement diminuée par un dérivé glucidique. L'utilisation conjointe d'un dérivé glucidique et d'un détergent rend possible le dosage sélectif du cholestérol LDL dans le sérum.

Des valeurs post-prandiales comparables ont été obtenues avec la méthode Bêta-Ouant.^{9'10''} Cette méthode directe de dosage du cholestérol LDL répond aux objectifs de performance du N.C.E.P. (National Cholesterol Education Program, 1995) avec un CV global

< 40/0, une erreur systématique < 4% par rapport à la méthode de référence et une erreur analytique globale < 12%.



Sous l'action de la cholestérol-estérase modifiée par le PEG, les esters du cholestérol des HDL sont scindés en cholestérol et en acides gras.



Dans une réaction ultérieure catalysée par la cholestérol-oxydase modifiée par le PEG, le cholestérol est transformé, en présence d'oxygène, en Δ^4 -cholesténone avec formation d'eau oxygénée.



*HSDA = (N-(hydroxy-2 sulfo-3 propyl) diméthoxy-3,5 aniline)

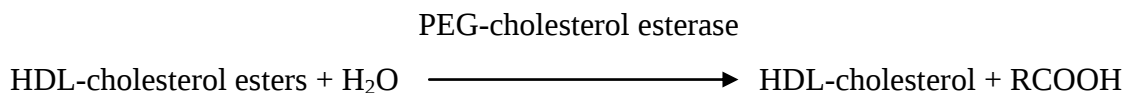
En présence de peroxydase, l'eau oxygénée formée réagit avec l'amino-4 phénazone et l'HSDA avec formation d'un dérivé coloré. L'intensité de la coloration développée, directement proportionnelle à la concentration en cholestérol, est mesurée par photométrie

HDL

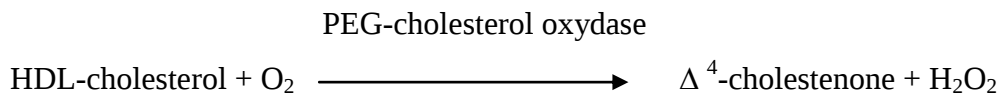
Principe

En présence de l'ion du magnésium, le sulfate de dextran forme des complexes sélectivement solubles dans l'eau avec LDL, VLDL et chylomicrons, qui sont résistants à la PEG-enzymes modifié

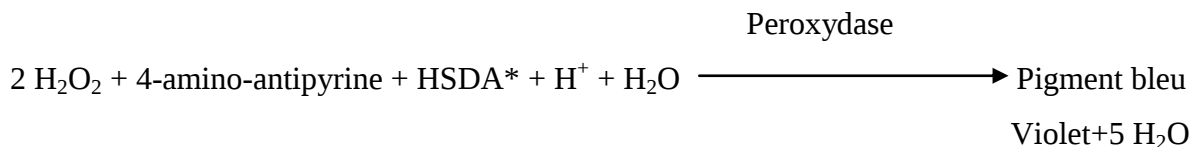
L'addition du réactif 2 (PEG-enzymes modifié/4-amino-antipyrine/buffer) lance la réaction.



Le Cholestérol esters est dissocié quantitativement en cholestérol libre et en acides gras par la cholestérol-estérase.



En présence d'oxygène, le cholestérol est oxydé par la cholestérol-oxydase en Δ^4 -cholestenone et en hydrogène peroxyde.



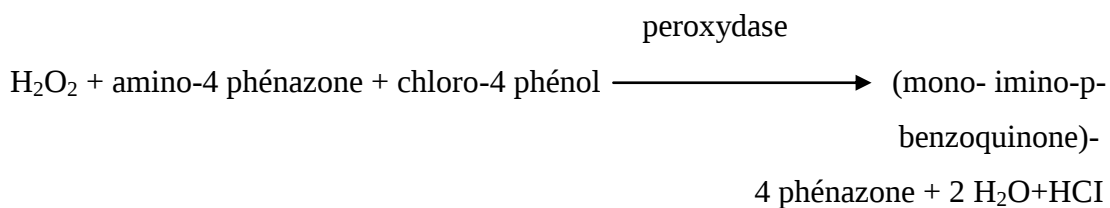
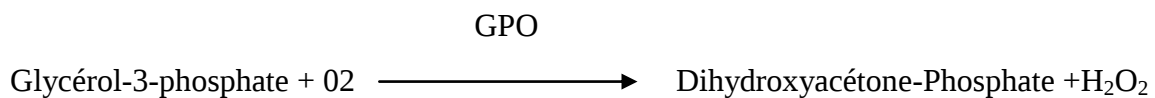
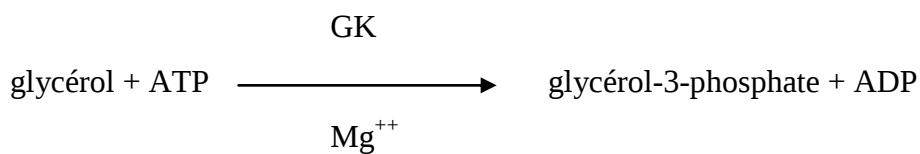
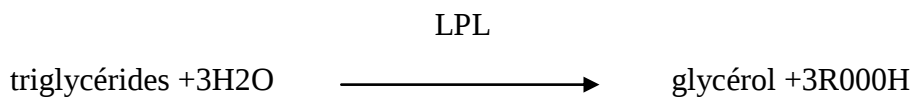
En présence de peroxydase, le H_2O_2 génère la réaction avec le 4-amino-antipyrine et l'HSDA pour former un pigment bleu violet. L'intensité de la coloration est directement proportionnelle à la concentration du cholestérol, est mesurée par photométrie

Triglycéride

Principes de dosage

La méthode de dosage décrite ci-après repose sur les travaux de Wahlefeld qui fait appel, pour l'hydrolyse rapide et complète des triglycérides en glycérol et acides gras, à une lipoprotéine-lipase de micro-organismes; le glycérol formé est ensuite transformé en glycérol-3-phosphate, puis oxydé en dihydroxyacétone-phosphate avec formation d'eau oxygénée; en présence de peroxydase. L'eau oxygénée formée réagit, dans une réaction selon Trinder, avec l'amino-4 phénazone et le chloro-4 phénol avec formation d'un dérivé coloré rouge :

- Addition de R2 (Tampon/chloro-4 phénol/enzymes) et début de la réaction :



TGO

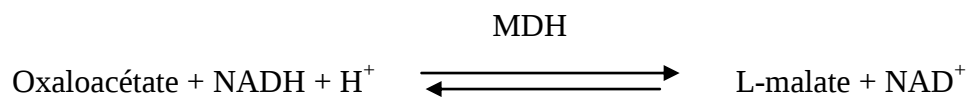
Principes de dosage

- Le réactif R1 (tampon/enzymes/coenzyme) est ajouté à l'échantillon.
- L'addition du réactif R2 (α-cétoglutarate) conduit au déclenchement de la réaction:

L'AST catalyse la réaction d'équilibre ci-dessous:



L'oxaloacétate formé est dosé à l'aide d'une réaction indicatrice catalysée par la malate-déshydrogénase:



Au cours de cette réaction le NADH est oxydé en NAD. La vitesse de diminution du NADH, directement proportionnelle à la vitesse de formation de l'oxaloacétate et donc à l'activité de l'AST, est mesurée par photométrie.

TGP

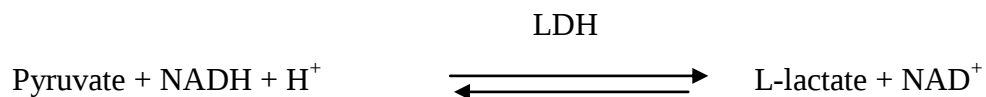
Principes de dosage

- Le réactif R1 (tampon/enzyme/coenzyme) est ajouté à l'échantillon.
- L'addition du réactif R2 (α-cétoglutarate) conduit au déclenchement de la réaction:

L'ALT catalyse la réaction d'équilibre ci-dessous:



Le pyruvate formé est dosé à l'aide d'une réaction indicatrice catalysée par la lactate-déshydrogénase:



Au cours de cette réaction le NADH est oxydé en NAD. La vitesse de diminution du NADH, directement proportionnelle à la vitesse de formation du pyruvate et donc à l'activité de l'ALT, est mesurée par photométrie.

BNP

Principes de dosage

La méthode de référence ou « méthode chaude » est une méthode radio-immunologique disponible au moyen d'un kit de dosage, Shionoria® BNP (CIS Diagnostics, Gif-sur-Yvette, France). Ce kit utilise une méthode « sandwich » sur phase solide. Deux anticorps monoclonaux ont été préparés contre deux sites antigéniques dont l'un, marqué à l'iode radio-actif, est utilisé comme traceur. La radioactivité mesurée est donc proportionnelle à la quantité de BNP présente. Cette technique nécessite cependant une incubation d'environ 20 heures ce qui limite son utilisation en urgence. D'autres techniques de dosage existent mais sont moins développées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Abdelmouttaleb I, Danchin N, Aimone-Gastin I, Namour F, Angioi M, Gelot MA, Bennani N, Lambert D, Jeandel C, Gueant JL. Homocysteine, vitamins B6, B12, folate, and risk of coronary artery disease in patients undergoing diagnostic coronary angiography. *Amino Acids* 2000; 18: 139-46.
2. Aldamiz-Echevarria L, Sanjurjo P, Vallo A, Aquino L, Perez-Nanclares G, Gimeno P, Rueda M, Ruiz I, Urreti R, Rodriguez-Soriano. Hyperhomocysteinemia in children with renal transplants. *Pediatr Nephrol*. 2002; 17: 718-23.
3. Alfthan G, Pekkanen J, Jauhiainen M, Pitkaniemi J, Karvonen M, Tuomilehto J, Salonen JT, Ehnholm C. Relation of serum homocysteine and lipoprotein(a) concentrations to atherosclerotic disease in a prospective Finnish population based study. *Atherosclerosis* 1994; 106: 9-19
4. Allen LH. Folate and vitamin B12 status in the Americas. *Nutr Rev* 2004; 62: S29-33.
5. American Society of Clinical Oncology. Clinical practice guidelines for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer. *J Clin Oncol* 1996; 14: 2843-77.
6. Amouzou EK, Chabi NW, Adjalla CE, Rodriguez-Gueant RM, Feillet F, Villaume C, Sanni A, Gueant JL. High prevalence of hyperhomocysteinemia related to folate deficiency and the 677C-->T mutation of the gene encoding methylenetetrahydrofolate reductase in coastal West Africa. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 619-24.
7. Anderson JL, Muhlestein JB, Home BD, Carlquist JF, Bair TL, Madsen Te, Pearson RR. Plasma homocysteine predicts mortality independently of traditional risk factors and c-reactive in patients with angiographically defined coronary artery disease. *Circulation* 2000; 102: 1227-32

8. Bergmann S., Shatrov V., Ratter F, Schiemann S, Schulze-Osthoff K and Lehmann V
Adenosine and homocysteine together enhance TNF-mediated cytotoxicity but do not alter
activation of nuclear factor-kB in L929 cells. J Immunol 1994; 153: 173

9. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD and Lusis AJ. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 1995; 91: 2488-96.
10. Bestro TH. Gene silencing. Methylation meets acetylation. *Nature* 1998; 393: 311-2.
11. Bird GL, Sheron N, Goka AK, Alexander GJ, Williams RS, Increased plasma tumor necrosis factor in severe alcoholic hepatitis. *Ann Intern Med* 1990; 112: 917-20.
12. Birnboim & J Doly A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *HC* (1979) *Nucleic acids res.* 7: 1513-1523
13. Blount BC, Mack MM, Wehr CM, acGregor JT, Hiatt RA, Wang G, Wickramasinghe SN, Everson RB, Ames BN. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94: 3290-5.
14. Boduroglu K, Alanay Y, Koldan B, Tuncbilek E. Methylenetetrahydrofolate reductase enzyme polymorphisms as maternal risk for Down syndrome among Turkish women. *Am J Med Genet* 2004; 127: 5-10.
15. Bollander-Gouaille C. Focus on Homocysteine and the Vitamins involved in its metabolism. Paris: Springer-Verlag, 2nd Edition, 2002.
16. Bosco P, Gueant-Rodriguez RM, Anello G, Barone C, Namour F, Caraci F, Romano A, Romano C, Guéant JL. Methionine synthase (MTR) 2756 (A-G) polymorphism, double heterozygosity methionine synthase 2756 AG/methionine synthase reductase (MTRR) 66 AG, and elevated homocysteinemia are 3 risk factors for having a child with Down syndrome. *Am. J. Med. Genet* 2003; 121: 219-24.
17. Bostom AG and Lathrop L. Hyperhomocysteinemia in end-stage renal disease: prevalence, etiology, and potential relationship to arteriosclerotic outcomes. *Kidney Int* 1997; 52: 10-20.

18. Brouet J C Cell membrane markers in acute lymphoblastic leukemia. *Nouvelle revue francaise d'hematologie* (1979), Suppl: III-V
19. Cedar H, DNA methylation and gene activity. *Cell* 1988; 53: 3-4.
20. Chadeaux-Vekemans B, Coude M, Muller F, Oury J, Cali A, Kamoun P. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms in the etiology of Down syndrome. *Pediatr Res* 2002; 51: 766-7.
21. Chen LH, Liu ML, Hwang HY, Chen LS, Korenberg J, Shane B. Human methionine synthase: cDNA cloning, gene localization, and expression. *J Biol Chem* 1997; 272: 3628-34.
22. Chen P, Poddar R, Tipa EV, Dibello PM, Moravec CD, Robinson K, Green R, Kruger WD, Garrow TA, Jacobsen DW. Homocysteine metabolism in cardiovascular cells and tissues: implications for hyperhomocysteinemia and cardiovascular disease. *Adv Enzyme Regul* 1999; 39: 93-109
23. Christensen B, Arbour L, Tran P, Leclerc D, Sabbaghian N, Platt R, Gilfix BM, Rosenblatt DS, Gravel RA, Forbes P, Rozen R. Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. *Am J Med Genet.* 1999; 84: 151-7.
24. De Bree A, Verschuren WM, Blom HJ, Kromhout D. Association between B vitamin intake and plasma homocysteine concentration in the general Dutch population aged 20-65 y. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 1027-33.
25. De bree A, Verschuren WM, Kromhout D, Kluijtmans LA, Blom HJ. Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease. *Pharmacol Rev.* 2002; 54: 599-618.
26. De Franchis R, Sebastio G, Andria G, Mastroiacovo P. Spina bifida, 677T mutation, and role of folate. *Lancet* 1995; 346: 1703.

27. Delpech B; Girard N; Vannier J P; Tilly H; Piguet H Laboratoire d'Oncologie moleculaire, Centre Henri-Becquerel, Rouen Production of hyaluronan-binding glycoprotein by human monocytes. Its use as marker in myeloid leukemia Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie (1992), 314(13): 579-85.
28. Dennis VW, Robinson K. Homocysteinemia and vascular disease in end-stage renal disease. Kidney Int 1996; 50(Suppl 57): S11-17.
29. Dierkes J and Westphal S. Effect of drugs on homocysteine concentrations. Semin Vasc Med 2005; 5: 124-39.
30. Dighiero G Lymphocyte membrane markers in chronic lymphoid leukemia Nouvelle revue francaise d'hematologie (1979), Suppl VII-IX.
31. Diop S; Letestu R; Orsolani D; Leboeuf Y; Le Tutour P; Thiam D; Diakhate L; Valensi F Service d'Hematologie, Universite de Dakar, BP 5002 Dakar-Fann Senegal Expression of proliferation marker Ki 67 in chronic lymphocytic leukemia. Dakar medical (2005), 50(2): 65-8.
32. Dubois JB, Grenier J, Pujol H. Les marqueurs tumoraux sériques. De la théorie à la pratique. Montpellier: Edition Espaces; 1996.
33. Durand P, Prost M, Blache D. Pro-thrombotic effects of a folic acid deficient diet in rat platelets and macrophages related to elevated homocysteine and decreased n-3 polyunsaturated fatty acids. Atherosclerosis 1996; 121: 231-43.
34. Elyse Poitras et Alain Houde. La PCR en temps réel: principes et applications. Reviews in Biology and Biotechnology (Canada). Vol.2, No 2, December 2002. pp.2-11
35. Evrard S; Gaussem P; Helley D; Darnige L Service d'hematologie biologique, Hopital europeen Georges Pompidou, Paris Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia: contribution of recent biological markers. Annales de biologie clinique (2005), 63(6),

36. Fliedner V; Carrel S; Morell A; Heumann D; Losa G; Hirt A; Jeannet M; Mach J P; Cruchaud A Classification of acute leukemias by surface markers and correlation with the morphological diagnosis. Results of 111 cases. Schweizerische medizinische Wochenschrift (1981),
37. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem 1972; 18: 499-502.
38. Friso S, Choi SW, Girelli D, Mason JB, Dolnikowski GG, Bagley PJ, Olivier O, Jacques PF, Rosenberg IH, Corrocher R, Selhub J.A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction in the folate status. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 5606-11.
39. Fulla Y, Paycha F. Place des marqueurs tumoraux circulants dans le diagnostic et le suivi des tumeurs colorectales. Méd Nucl 1996; 20: 269-75.
40. Frosst P, Blom HL, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews TH, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylene tetrahydrofolate reductase. Nat Genet 1995; 10:111-113.
41. Gaughan DJ, Barbaux S, Kluijtmans LA, Whitehead AS. The human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes: genomic organization, mRNA structure and linkage to the CLCN6 gene. Gene 2000; 257: 279-89.
42. Geisel J, Zimbelmann I, Schorr H, Knapp JP, Bodis M, Hubner U, Herrmann W. Genetic defects as important factors for moderate hyperhomocysteinemia. Clin Chem Lab Med 2001; 39: 698-704.
43. Goyette P, Pai A, Milos R, Frosst P, Tran P, Chen Z, Chan M, Rozen R. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). Mammalian Genome 1998; 9: 652-6.

44. Goyette P, Sumner JS, Milos R, Duncan AMV, Rosenblatt DS, Matthews RG, Rozen R. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nature Genet* 1994; 7: 195-200.
45. Green R and Jacobsen DW. Clinical implications of hyperhomocysteinemia. Bailey LB eds. *Folate in health and disease* Marcel Dekker, Inc. New York 1995:75-122.
46. Guillaud JC, Lequeu B. Les vitamines: Du nutriment au médicament. *EM internationales*. Paris. 1992. p357.
47. Heinecke JW, Rosen H, Suzuki LA, Chait A. The role of sulfur-containing amino acids in superoxide production and modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1987; 262: 10098-103.
48. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R., Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences. *Bio-Technology* 1992.10 (4): 413–417
49. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest* 2002; 109: 1125-31.
50. Ingrosso D, Cimmino A, Perna AF, Masella L, De Santo NG, De Bonis ML, Vacca M, D'EspositoM, D'Urso M, Galletti P, Zappia V. Folate treatment and unbalanced methylation and changes of allelic expression induced by hyperhomocysteinaemia in patients with uraemia. *Lancet*. 2003; 361: 1693-9.
51. Isolato PA, Wells GA, Donnelly JG. Neonatal and fetal methylene-tetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: an examination of C677T and A1298C mutations. *Am J Hum Genet* 2000; 67: 986-90.
52. Ifrah N; Perrot J Y; Marie J P; Boasson M; Zittoun R Service de Medecine D, C. H. U. d'Angers Lymphoblastic leukemia and immunological markers *Annales de medecine interne* (1987), 138(7): 527-32.

53. Jeannet M; Carpentier N HLA markers in leukemia patients. *Pathologie-biologie* (1986), 34(6): 747-52.
54. Jin, Yizun. (Shanghai Medical Univ., Peop. Rep. China). Antitumor compounds containing S-alkyl-DL-homocysteine-S,R-sulfinylimine. Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu (1998), 8 pp
55. Keuzenkamp-Jansen, Carin W.; De Abreu, Ronney A.; Blom, Henk J.; Boekkerink, Jos P. M.; Trijbels, J. M. Frans. Lab. Pediatrics, Cent. Pediatric Oncol. S.E. Netherlands, Univ. Hosp., Nijmegen, Neth. Effects on transmethylation by high-dose 6-mercaptopurine and methotrexate infusions during consolidation treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Biochemical Pharmacology* (1996), 51(9): 1165-71.
56. Kishi, Shinji; Griener, James; Cheng, Cheng; Das, Soma; Cook, Edwin H.; Pei, Deqing; Hudson, Melissa; Rubnitz, Jeffrey; Sandlund, John T.; Pui, Ching-Hon; Relling, Mary V. Department of Pharmaceutical Sciences, Biostatistics, Hematology-Oncology, St. Jude Children's Research Hospital, and University of Tennessee, Memphis, TN, USA. Homocysteine, pharmacogenetics, and neurotoxicity in children with leukemia. *Journal of Clinical Oncology* (2003), 21(16): 3084-3091.
57. Koziorowska, Jadwiga; Pienkowska, Krystyna; Tautt, Jadwiga. Inst. Drug Res. Control, Warsaw, Pol Dependence on exogenous methionine of rat sarcoma and murine leukemia cells in culture. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* (1980), 28(5): 709-16.
58. Krajcinovic, Maja; Robaey, Philippe; Chiasson, Sonia; Lemieux-Blanchard, Emilie; Rouillard, Melanie; Primeau, Melanie; Bournissen, Facundo Garcia; Moghrabi, Albert. Hopital Sainte-Justine, Servide d'Hematologie-Oncologie, Centre de Recherche, Montreal, QC, Can. Polymorphisms of genes controlling homocysteine levels and IQ score following the treatment for childhood ALL. *Pharmacogenomics* (2005), 6(3): 293-302.

59. Levey AS, Bosch JP, Lewis BJ, Greene T, Rogers N, Roth D for the Modification of Diet in Renal disease Study Group. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: A new prediction equation. *Ann Int Med* 1999; 130: 461-70.
60. Li YN, Gulati S, Baker PJ, Brody LC, Banerjee R, Kruger WD. Cloning, mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene. *Hum Molec Genet* 1996; 5: 1851-8.
61. Matthews, J. H. Department of Medicine, Queen's University, Kingston, ON, Can. The cytotoxic effect of the vitamin B12 inhibitor cyanocobalamin [c-lactam], and a review of other vitamin B12 antagonists. *Leukemia & Lymphoma* (1998), 31(1/2): 21-37.
62. Marie J P; Escribano L; Perrot J Y; Boucheix C; Kayibanda M; Martyre M C; Cadiou M; Rosenfeld C; Zittoun R Ultrastructural peroxidases and immunological markers in acute adult leukaemia: therapeutic applications (author's transl). *La Nouvelle presse medicale* (1982), 11(21): 1603-6.
63. McCully KS and Wilson RB. Homocysteine theory of arteriosclerosis. *Atherosclerosis* 1975; 22: 215-27.
64. McCully KS. Homocysteine and vascular disease. *Nat Med* 1996; 2: 386–9.
65. SES, Evrovski J, Cole DEC. Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: an update. *Clin Biochem* 1997; 30: 189-201.
66. Morita, Yutaka; Siraganian, Reuben P. Lab. Microbiol. Immunol., Natl. Inst. Dent. Res., Bethesda, MD, USA. Inhibition of IgE-mediated histamine release from rat basophilic leukemia cells and rat mast cells by inhibitors of transmethylation. *Journal of Immunology* (1981), 127(4): 1339-44.
67. Nakamura S, Aoshima T, Ikeda M, Sekido Y, Shimokata K, Niwa T. Simultaneous detection of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms, C677T and A1298C, by melting curve analysis with LightCycler. *Anal Biochem* 2002 J; 306: 340-3.

68. Oikawa, Shinji; Murakami, Katsuhiko; Kawanishi, Shosuke. Department of Environmental and Molecular Medicine, Mie University School of Medicine, Mie, Japan Oxidative damage to cellular and isolated DNA by homocysteine: implications for carcinogenesis. *Oncogene* (2003), 22(23): 3530-3538.
69. Robinson K, Mayer EL, Miller DP, Green R, van Lente F, Gupta A, Kottke-Marchant K, Savon SR, Selhub J, Nissen SE, Kutner M, Topol EJ, Jacobsen DW. Hyperhomocysteinemia and low pyridoxal phosphate. Common and independent reversible risk factors for coronary artery disease. *Circulation* 1995; 92: 2825-30.
70. Rouesse J; Berger R; Amiel J L Myelomonocytoid leukemia, abnormal cellular clone with a marker chromosome, evolution with a possible cure *Annales de medecine interne* (1978), 129(3): 215-8
71. Ruud, E.; Holmstrom, H.; Brosstad, F.; Wesenberg, F. Department of Paediatrics, National Hospital, Oslo, Norway. Children with acute lymphoblastic leukaemia have high plasma levels of total homocysteine at time of diagnosis. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* (2006), 66(1): 67-78.
72. Scott JM and Weir DG. Folic acid, homocysteine and one-carbon metabolism: a review of the essential biochemistry. *J Cardiovasc Risk* 1998; 5: 223–7.
73. Sterba, Jaroslav; Dusek, Ladislav; Demlova, Regina; Valik, Dalibor. Department of Pediatric Oncology, University Hospital, Brno, Czech Rep. 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* (Washington, DC, United States) (2006), 52(4): 692-700.
74. Tate PH, Bird AP. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 1993; 3: 226-31.
75. Telford J, Boseley P, Schaffner W, Birnstiel M. Novel screening procedure for recombinant plasmids. *Science*. 1977 Jan 28; 195(4276):391–393

76. Tisdale, Michael; Eridani, Sandro. Med. Sch., St. Thomas's Hosp., London, UK Methionine requirement of normal and leukemic hemopoietic cells in short term cultures. *Leukemia Research* (1981), 5(4-5): 385-94
77. Ueland PM, Refsum H, Brattström L. Plasma homocysteine and cardiovascular disease. In: Francis Jr RB Ed. *Atherosclerotic cardiovascular disease 1992*. Marcel Dekker, Inc. hemostasis, and endothelial function. New York, 183-236.
78. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993; 39: 1764-79.
79. Ueland, Per Magne; Refsum, Helga; Schneede, Jorn. Clinical Pharmacology Unit Central Laboratory Haukeland Hospital, University of Bergen, Bergen, Norway. Determinants of plasma homocysteine. *Developments in Cardiovascular Medicine* (2000): 230 59-84.
80. Ueland PM, Hustad S, Schneede J, et al. Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22: 195-201.
81. Valik, Dalibor; Sterba, Jaroslav; Bajciová, Viera; Demlova, Regina. Department of Laboratory Medicine, Masaryk Memorial Cancer Institute, University Hospital Brno, Brno, Czech Rep Severe Encephalopathy Induced by the First but Not the Second Course of High-Dose Methotrexate Mirrored by Plasma Homocysteine Elevations and Preceded by Extreme Differences in Pretreatment Plasma Folate. *Oncology* (2005), 69(3): 269-272.
82. Von Kleist S, Hesse Y, Kananeeh H. Comparative evaluation of four tumor markers, CA 242, CA 19/9, TPA, and CEA in carcinomas of the colon. *Anticancer Res* 1996; 16: 2325-31.
83. Xu Tao; Zhang Xiao-wei; Qu Xing-ke; Ye Hai-yun; Huang Xiao-bo; Zhang Xiao-peng; Hou Shu-kun; Wang Xiao-feng Department of Urology, Peking University People's Hospital, Beijing, People's Republic of China Treatment of hyperhomocysteinemia and endothelial dysfunction in renal transplant recipients with B vitamins in the Chinese population. *The Journal of urology* (2008): 179(3),

84. Yavasoglu Irfan; Tombuloglu Murat; Kadikoylu Gurhan; Donmez Ayhan; Cagiran Seckin; Bolaman Zahit Division of Hematology, Adnan Menderes University Faculty of Medicine, 09100, Aydin, Turkey Cholesterol levels in patients with multiple myeloma. *Annals of hematology* (2008); 87(3): 223-8.
85. Zetterberg H, Regland B, Palmer M, Ricksten A, Palmqvist L, Rymo L, Arvanitis DA, Spandidos DA, Blennow K. Increased frequency of combined methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutated alleles in spontaneous aborted embryos, *Eur J Hum Genet* 2002; 10:113-8.

Résumé

L'hyperhomocystéinémie est incriminée depuis longtemps dans plusieurs pathologies, principalement cardiovasculaires. Ces dernières années, elle a été rapportée dans certains types de cancers. Afin de rechercher de nouveaux biomarqueurs dans le diagnostic de la leucémie lymphoblastique aiguë ainsi que ses conséquences sur la composition biochimique du sang, 47 patients chez qui la maladie a été confirmée, et 95 témoins sains, ont bénéficié d'un bilan biologique assez élaboré (Homocystéine, Cholestérol, Triglycéride, HDL, LDL, TGO, TGP, Protéine C réactive, Urée, Créatinine, BNP). L'identification des polymorphismes de 4 enzymes clés intervenant dans le métabolisme de ce marqueur ciblé en l'occurrence de l'homocystéine a été réalisée par PCR en temps réel (Light Cycler). Les résultats obtenus montrent des différences significatives en Hcy, PCR, BNP et en TGO entre le groupe contrôle et pathologique, ce qui confirme la corrélation positive même faible entre la leucémie et ces paramètres.

Les résultats du génotypage ont montré que la variante TT de la MTHFR1 (C 677T) est plus fréquente chez les patients malades et se trouve associée à une hyperhomocystéinémie modérée avec le génotype CT de la même enzyme. Le même résultat a été obtenu pour les polymorphismes AA et AC de la MTHFR2(A1298C).

Cependant, les deux génotypes AG et GG de la MTR(A2756G) ont présenté aussi une hyperhomocystéinémie chez le groupe leucémique.

Enfin, l'ensemble des formes AA, AG et GG de la MTRR (A66G) ont montré une élévation de l'homocystéine dans le sang.

Même si ces résultats sont encore partiels, ils semblent confirmer potentiellement nos présomptions quand à la relation Hcy / LLA. A ce titre, ils ouvrent une petite voie pour une nouvelle approche prédictive en termes de diagnostic de cette maladie hautement mortelle.

Mots clés:

Biomarqueurs, hyperhomocystéinémie, leucémie lymphoblastique aiguë, polymorphisme génétique, PCR en temps réel, cancer, marqueurs tumoraux.

المخلص

تتسبب حالة إفراط الهوموسيستين في الدم في كثير من الأمراض خاصة منها الوعائية القلبية ، بالإضافة إلى بعض أنواع الأمراض السرطانية التي ذكرتها كثير من الدراسات الحديثة . ومن أجل البحث عن بعض الواسمات الحيوية للكيمياء للمفاوية الحادة ، أجريت الدراسة على 47 مريض تم تشخيص المرض لديهم بالاختبارات الدموية والنخاعية وعلى 95 شاهدا سليما . استفادت المجموعتان بإجراء معايرة لمجموعة معتبرة من المركبات المتواجدة في الدم نذكر منها الهوموسيستين ، الجلوسيدات الثلاثية ، الكوليسترول ، الكريتينين ، اليوريا ، LDL ، TGO ، TGP ، PCR ، HDL ، BNP) . كما تم دراسة البوليمورفيزمات المختلفة لأربعة انزيمات أساسية في أيض هذا الحمض الأميني المستهدف في هذه الدراسة وذلك عن طريق PCR في الوقت الحقيقي . لقد أظهرت النتائج المحصل عليها فيوق معنوية بين المجموعتين فيما يخص بعض المركبات وهي : الهوموسيستين ، TGO ، BNP ، PCR) وهذا مايبين تواجد العلاقة بين تركيز هذه المواد المعاييرة في الدم وهذا النوع من السرطان الدموي .

- كما سمحت دراسة البوليمورفيزمات بتحديد الأنماط التكوينية المرتبطة بالارتفاع المتواضع للهوموسيستين في الدم لدى الفئة المريضة وهي على النحو التالي .
- النمطان TT و CT بالنسبة لمTHFR1 (C677T) ، AC و AA بالنسبة لمTHFR2 (A1298C) .
 - AG ، GG بالنسبة لمTR (A2756G) و أخيرا AA ، GG ، AG بالنسبة لمTRR (A66G) .
 - إن هذه النتائج في مجملها تبين تواجد علاقة محتملة بين إفراط الهوموسيستين والوالميميا اللمفوية الحادة ، ورغم أنها جزئية إلا أنه يمكن أن تفتح طريقا جديدا للتشخيص المبكر لهذا المرض القاتل .
- الكلمات المفتاحية : افراط الهوموسيستين في الدم ، الواسمات الحيوية السرطانية ، الكيمياء للمفاوية الحادة ، البوليمورفيزم الوراثي ، PCR في الوقت الحقيقي، السرطان .

