

Place de la cytogénétique dans la prise en charge de la leucémie myéloïde chronique : actualisation par le Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH)

Cytogenetics in the management of “chronic myeloid leukemia”: an update by the Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH)

Catherine Roche-Lestienne¹

Elise Boudry-Labis¹

Marie-Joëlle Mozziconacci²

¹ Institut de génétique médicale,
CHU Lille, Lille, France
<catherine.roche@chru-lille.fr>

² Laboratoire de cytogénétique
hématologique et moléculaire, Institut
Paoli Calmettes, Marseille, France

Résumé. L'analyse cytogénétique est essentielle au diagnostic de la leucémie myéloïde chronique (LMC) car elle permet non seulement de poser le diagnostic avec la mise en évidence de la translocation réciproque t(9;22)(q34;q11), mais également d'identifier les translocations variantes et la présence éventuelle d'anomalies cytogénétiques additionnelles pouvant avoir un impact sur la qualité de la réponse au traitement. Au cours du suivi, la nature de la réponse cytogénétique constitue un des critères précoces pris en considération dans l'évaluation de la réponse au traitement par inhibiteurs de tyrosine kinase et l'adaptation thérapeutique. Le Groupe francophone de cytogénétique hématologique propose ici une actualisation des données récentes concernant les facteurs prédictifs au diagnostic et l'évaluation de la qualité de la réponse au traitement de la LMC, ainsi que de nouvelles recommandations concernant la prise en charge cytogénétique au diagnostic et au suivi de la maladie.

Mots clés : caryotype, cytogénétique, leucémie myéloïde chronique

Abstract. Cytogenetic evaluation is one the most important criteria for diagnosis and response to treatment in chronic myeloid leukemia, and recent baseline prognostic factors including particular additional clonal cytogenetic abnormalities have been established. The French cytogenetic group in hematology GFCH proposes here an updating of recommendations for cytogenetic assessment of CML in the era of tyrosine kinase inhibitors.

Key words: karyotype, cytogenetic, chronic myeloid leukemia

Article reçu le 24 février 2016,
accepté le 29 février 2016

Bases scientifiques des recommandations du GFCH

Physiopathologie de la LMC

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une hémopathie myéloproliférative caractérisée par la prolifération incontrôlée de progéniteurs hématopoïétiques. Son inci-

dence est estimée à 1,5 cas/100 000 habitants par an en France. Elle a été la première hémopathie humaine associée à une anomalie cytogénétique acquise au caryotype, la translocation équilibrée t(9;22)(q34;q11), véritable marqueur chromosomique spécifique de la pathologie. Le dérivé du chromosome 22 issu de cette translocation a été nommé chromosome « Philadelphie » (Ph) en référence à la ville dans laquelle il a été découvert [1, 2]. Décelable au caryotype dans 95 % des cas de LMC, ce remaniement peut également exister sous forme de translocation variante t(9;22;v) impliquant plusieurs chromosomes (3 ou plus), ou sous forme d'une insertion. Dans ce dernier cas, le

Tirés à part : C. Roche-Lestienne

remaniement est cryptique en cytogénétique conventionnelle (Ph masqué) mais la fusion issue de la t(9;22) peut être mise en évidence par hybridation *in situ* fluorescente (FISH) en 22q11, ou plus exceptionnellement en 9q34 [3]. Au niveau moléculaire, la translocation conduit à la fusion de la région 5' du gène *ABL1* en 9q34 et de la région 3' du gène *BCR* en 22q11. Cette fusion génère un transcrite hybride *BCR-ABL1* aboutissant à l'expression d'une protéine chimérique avec une activité tyrosine kinase constitutive [4]. Dans 95 % des cas, le transcrite de fusion est de type majeur *MBCR-ABL1* avec fusion au niveau des exons 13-14 de *BCR* conduisant à la synthèse d'une protéine chimérique *BCR-ABL1* de 210 kDa. Plus rarement, les points de cassure dans le gène *BCR* se situent au niveau de l'exon 1 (*mBCR*), ou de l'exon 19 (*μBCR*), générant des protéines *BCR-ABL1* de 190 ou 230 kDa, respectivement [5]. L'identification du type de transcrite est nécessaire au diagnostic pour permettre un suivi de la maladie résiduelle par RT-PCR quantitative (RQ-PCR). Le transcrite de fusion *BCR-ABL1* est également présent dans le cas d'une insertion cryptique. La LMC est alors dite « Ph-négative *BCR-ABL1* positive » (Ph- *BCR-ABL1*+).

Dans 5 % des LMC au diagnostic, on détecte des anomalies cytogénétiques additionnelles (ACA) dans les mitoses présentant la t(9;22) (ACA Ph+). En particulier, la trisomie du chromosome 8 ou 19, la duplication du chromosome Ph ou l'isochromosome Ph, et l'isochromosome 17q, font partie des signaux d'alarme au diagnostic dans les recommandations de l'*European leukemia net* (ELN) 2013 [6, 7]. En effet, ces anomalies dites "majeures" ne modifient pas la survie globale des patients, notamment depuis le développement des nouveaux traitements, mais sont associées à une diminution de la survie sans progression ou sans événement. Les autres anomalies cytogénétiques telles que la perte du chromosome Y, la trisomie 21 ou la monosomie 7 n'ont pas d'impact pronostique au diagnostic [6-8]. Les caryotypes complexes au diagnostic ont un impact défavorable sur la survie sans progression [8, 9]. La valeur pronostique des translocations variantes sur la progression est controversée [6-8, 10]. Dans 10 à 15 % des cas (plus fréquemment en cas de remaniement complexe), la translocation peut être associée à la perte de petites régions chromosomiques (de quelques centaines de paires de bases à moins de 5 Mb) au niveau des points de cassures des gènes *BCR* ou *ABL1*. Ces microdélétions peuvent être mises en évidence par FISH ou par analyse cytogénétique sur puce à ADN, mais elles ont perdu leur valeur pronostique avec les traitements actuels [11-13].

D'un point de vue clinico-biologique, la LMC se caractérise par une phase chronique peu symptomatique, avec l'expansion clonale de cellules différenciées de la lignée granuleuse porteuses de la translocation t(9;22) ou son équivalent moléculaire. En l'absence de tout traite-

ment, la maladie évolue naturellement vers une phase d'accélération, notamment caractérisée par une augmentation de la blastose sanguine et médullaire, et une instabilité génétique accrue. Il est alors possible d'observer l'émergence d'anomalies cytogénétiques additionnelles au caryotype dans les clones porteurs de la t(9;22) (ACA Ph+). Selon l'ELN [7], la transformation aiguë (myéloïde ou lymphoïde) de la LMC est définie par une blastose médullaire ou sanguine comprise entre 15-29 % (ou une proportion de blastes et promyélocytes ≥ 30 % avec un taux de blastes < 30 %), une basophilie sanguine d'au moins 20 %, et une thrombopénie persistante sous traitement inférieure à 100 G/L avec un tableau clinique proche de celui d'une leucémie aiguë. Des ACA Ph+ sont alors retrouvées dans 80 % des cas [8, 14, 15], la présence d'ACA Ph+ majeures sous traitement complétant la définition de la transformation [7]. Depuis le début des années 2000, les patients atteints de LMC bénéficient d'une thérapie ciblée inhibant spécifiquement l'activité tyrosine kinase excessive de la protéine de fusion *BCR-ABL1*. Les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) tels que l'imatinib (première génération), le dasatinib et le nilotinib (deuxième génération), ou le ponatinib et le bosutinib (troisième génération), ont révolutionné le pronostic de la maladie, offrant aux patients une survie comparable dans la plupart des cas à la survie de la population générale [16-20]. À l'heure actuelle, la résistance ou l'échappement aux ITK concerne 5 à 10 % des patients traités.

Une particularité cytogénétique dans la LMC est la possibilité d'émergence au caryotype et sous ITK d'ACA dans des clones sans chromosome Ph (ACA Ph-) dont l'origine et la signification biologique sont encore méconnues. Les ACA Ph- sont essentiellement une perte du chromosome Y, une trisomie du chromosome 8, une délétion 20q, une monosomie 7 ou une délétion 7q, et n'ont pas d'impact sur la survie globale ni sur la progression [21-25]. Cependant, les anomalies du chromosome 7 (-7/del7q) pourraient être en lien avec la présence de signes de dysmyélopôïèse et risquer d'évoluer vers le développement d'une LAM *de novo* Ph-, à différencier d'une transformation myéloïde Ph+ [26-28].

Définition de la réponse cytogénétique au traitement

Réponse optimale

La réponse optimale aux ITK en première ligne est définie par [7] :

- à 3 mois de traitement, une réponse cytogénétique majeure (mitoses Ph+ ≤ 35 %) et/ou un taux de transcrite *BCR-ABL1* normalisé ≤ 10 % ;
- à 6 mois de traitement, une réponse cytogénétique complète (0 % de mitoses Ph+) et/ou un taux de transcrite *BCR-ABL1* normalisé ≤ 1 % ;

– à 12 mois de traitement ou à tout moment, une maladie résiduelle moléculaire $\leq 0,1\%$.

Les exigences sont moindres dans le cas de traitement en seconde ligne, avec comme critères cytogénétiques :

- à 3 mois, une réponse cytogénétique mineure (mitoses Ph+ < 65 %) et/ou un taux de transcrit *BCR-ABL1* normalisé $\leq 10\%$;
- à 6 mois, une réponse cytogénétique majeure (mitoses Ph+ < 35 %) et/ou un taux de transcrit *BCR-ABL1* normalisé $\leq 10\%$;
- à 12 mois une réponse cytogénétique complète (0 % de mitoses Ph+) et/ou un taux de transcrit *BCR-ABL1* normalisé < 1 % ;
- à tout moment, une maladie résiduelle moléculaire $\leq 0,1\%$.

Échec du traitement

En 1^{re} ligne :

- à 3 mois, absence de réponse hématologique complète et/ou absence de réponse cytogénétique (mitoses Ph+ > 95 %) ;
- à 6 mois, mitoses Ph+ > 35 % et/ou taux de transcrit *BCR-ABL1* normalisé > 10 % ;
- à 12 mois, mitoses Ph+ > 0 % et/ou taux de transcrit *BCR-ABL1* normalisé > 1 % ;
- à tout moment, perte de la réponse hématologique, cytogénétique ou moléculaire, ou apparition d'ACA Ph+.

Pour les traitements de 2^e ligne :

– à 3 mois, absence de réponse hématologique complète et/ou absence de réponse cytogénétique (mitoses Ph+ > 95 %) ;

- à 6 mois, mitoses Ph+ > 65 % et/ou taux de transcrit *BCR-ABL1* normalisé > 10 % ;
- à 12 mois, mitoses Ph+ > 35 % et/ou taux de transcrit *BCR-ABL1* normalisé > 10 % ;
- à tout moment, perte de la réponse hématologique, cytogénétique ou moléculaire, ou apparition d'ACA Ph+.

Signaux d'alarme

Les signaux d'alarme sont :

- la présence d'ACA majeures dans les mitoses Ph+ ;
- les résultats cytogénétiques et/ou moléculaires situés entre les critères de réponse optimale et d'échec ;
- à tout moment, l'apparition d'ACA Ph-, en particulier -7/7q-.

Recommandations du GFCH pour la prise en charge de la LMC : place du caryotype et de la FISH

La moelle osseuse est le prélèvement de choix pour la réalisation du caryotype au diagnostic et au suivi. À défaut, le caryotype pourra être réalisé sur sang, mais uniquement si la myélémie est suffisante (LMC au diagnostic ou en transformation aiguë). L'analyse doit être réalisée sur au

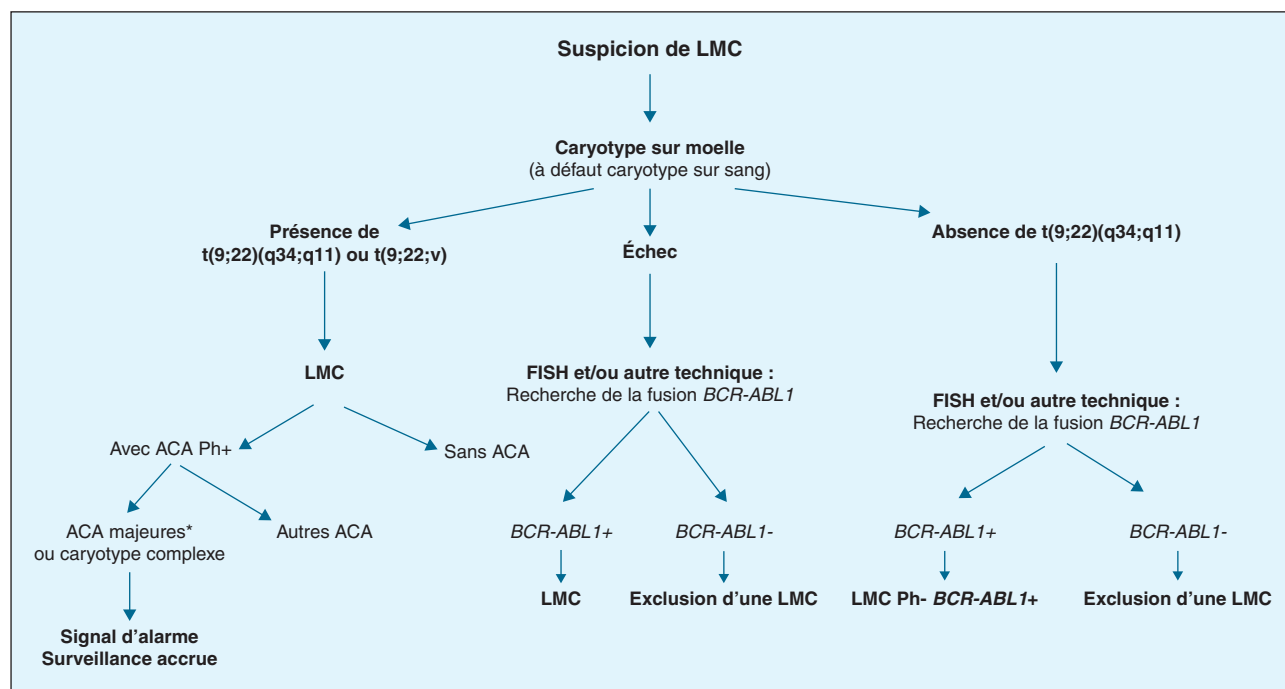


Figure 1. Prise en charge cytogénétique de la LMC au diagnostic. Caryotype complexe : nombre d'anomalies supérieur ou égal à 3 ; ACA : anomalies cytogénétiques additionnelles ; ACA majeures* : +8,+19,+Ph, ider(22), i(17)(q10).

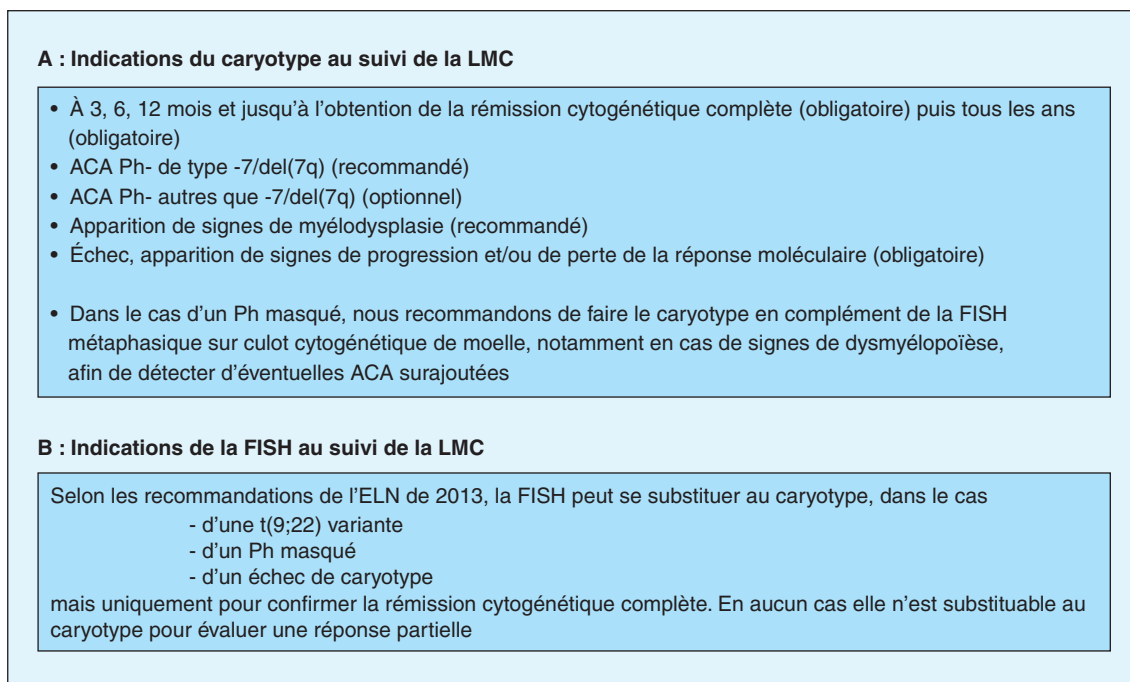


Figure 2. Indications de la cytogénétique conventionnelle et de la FISH au suivi de la LMC. **A** : indications du caryotype au suivi de la LMC. **B** : indications de la FISH au suivi de la LMC.

moins 20 métaphases. Une analyse FISH complémentaire doit être faite uniquement en cas d'absence de translocation t(9;22), pour détecter les translocations variantes ou les anomalies cryptiques. Il n'est pas nécessaire de rechercher la présence de micro-délétions 9q34/22q11 par FISH, celles-ci n'ayant actuellement plus d'impact sur la réponse et la survie. De même, il n'est pas nécessaire de caractériser le type de transcrite *MBCR* ou *mBCR-ABL1* par FISH (seules les sondes de type Es (extra signal) permettent cette distinction), l'analyse par biologie moléculaire recherchant couramment les différents types de transcrits. La présence d'ACA Ph+ majeures en phase chronique ou un caryotype complexe doivent être signalés en raison du risque accru de transformation aiguë qui leur est associé. La cinétique de la réponse cytogénétique permet de définir la réponse optimale, sub-optimale, ou l'échec [7].

Le suivi cytogénétique doit être fait à 3, 6 et 12 mois jusqu'à l'obtention d'une rémission cytogénétique complète et/ou d'une réponse moléculaire $\leq 1\%$, puis tous les ans [7, 28]. Le suivi par FISH peut être indiqué en cas de LMC Ph- *BCR-ABL1*+, en cas d'échec du caryotype ou pour rechercher une réponse cytogénétique complète. Il n'est en aucun cas un marqueur de substitution pour évaluer une réponse partielle [7].

Un suivi en cytogénétique conventionnelle est souhaitable en cas d'apparition de signes de myélodysplasie, ou en cas d'augmentation significative de la maladie résiduelle en biologie moléculaire. Une évolution cytogénétique au suivi

de la LMC signe une maladie en progression, quel que soit le type d'ACA Ph+. En cas d'émergence d'un clone avec ACA Ph- de type monosomie 7/del7q, il est recommandé de suivre la cinétique d'évolution de ces clones ACA Ph- par cytogénétique conventionnelle, même en situation de rémission cytogénétique complète de la LMC.

Un arbre décisionnel au diagnostic de LMC est représenté sur la *figure 1* et la *figure 2* et reprend les situations pour lesquelles un suivi en cytogénétique conventionnelle (*figure 2A*) ou en FISH (*figure 2B*) est recommandé.

Remerciements. Les auteurs remercient les Dr C Bilhou-Nabera, Dr C Barin, Dr A Bernheim, Dr N Dastugue, Dr V Eclache, Dr C Léonard, Dr S Raynaud, Dr C Terre, Dr J Van Den Akker pour leur contribution lors de la parution de la première version de ces recommandations (*Pathol Biol (Paris) 2004 ; 52*)

Liens d'intérêts : Catherine Roche-Lestienne et Marie-Joëlle Mozziconacci : invitations en qualité d'intervenant ou d'auditeur à des conférences pour Novartis, BMS. Elise Boudry-Labis : Conférences : invitation en qualité d'auditeur pour Novartis, BMS.

Références

1. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973 ; 243 : 290-3.

2. Goldman JM, Melo J. Chronic myeloid leukemia-advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med* 2003 ; 349 : 1451-64.
3. Sessarego M, Fugazza G, Bruzzone R, Ballestrero A, Miglino M, Bacigalupo A. Complex chromosome rearrangements may locate the bcr/abl fusion gene sites other than 22q11. *Haematologica* 2000 ; 85 : 35-9.
4. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 1990 ; 247 : 824-30.
5. Melo JV. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* 1996 ; 88 : 2375-84.
6. Luatti S, Castagnetti F, Marzocchi G, Baldazzi C, Gugliotta G, Iacobucci I, et al. Additional chromosomal abnormalities in Philadelphia-positive clone : adverse prognostic influence on frontline imatinib therapy : a GIMEMA Working Party on CML analysis. *Blood* 2012 ; 120 : 761-7.
7. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia : 2013. *Blood* 2013 ; 122 : 872-84.
8. Fabarius A, Leitner A, Hochhaus A, Müller MC, Hanfstein B, Haferlach C, et al. Impact of additional cytogenetic aberrations at diagnosis on prognosis of CML : long-term observation of 1151 patients from the randomized CML Study IV. *Blood* 2011 ; 118 : 6760-8.
9. Verma D, Kantarjian H, Shan J, O'Brien S, Estrov Z, Garcia-Manero G, et al. Survival outcomes for clonal evolution in chronic myeloid leukemia patients on second generation tyrosine kinase inhibitor therapy. *Cancer* 2010 ; 116 : 2673-81.
10. Marzocchi G, Castagnetti F, Luatti S, Baldazzi C, Stacchini M, Gugliotta G, et al. Variant Philadelphia translocations : molecular-cytogenetic characterization and prognostic influence on frontline imatinib therapy, a GIMEMA Working Party on CML analysis. *Blood* 2011 ; 117 : 6793-800.
11. Richebourg S, Eclache V, Perot C, Portnoi MF, Van den Akker J, Terré C, et al. Mechanisms of genesis of variant translocation in chronic myeloid leukemia are not correlated with ABL1 or BCR deletion status or response to imatinib therapy. *Cancer Genet Cytogenet* 2008 ; 182 : 95-102.
12. Aoun P, Wiggins M, Pickering D, Foran J, Rasheed H, Pavletic SZ, et al. Interphase fluorescence in situ hybridization studies for the detection of 9q34 deletions in chronic myelogenous leukemia : a practical approach to clinical diagnosis. *Cancer Genet Cytogenet* 2004 ; 154 : 138-43.
13. Huh J, Jung CW, Kim JW, Kim HJ, Kim SH, Shin MG, et al. Genome-wide high density single-nucleotide polymorphism array-based karyotyping improves detection of clonal aberrations including der(9) deletion, but does not predict treatment outcomes after imatinib therapy in chronic myeloid leukemia. *Ann Hematol* 2011 ; 90 : 1255-64.
14. Anastasi J, Feng J, Le Beau MM, Larson RA, Rowley JD, Vardiman JW. The relationship between secondary chromosomal abnormalities and blast transformation in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 1995 ; 9 : 628-33.
15. Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol* 2002 ; 107 : 76-94.
16. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, et al. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2003 ; 348 : 994-1004.
17. Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, Cortes J, Shah S, Ayala M, et al. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010 ; 362 : 2260-70.
18. Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, le Coutre P, Etienne G, Lobo C. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010 ; 362 : 2251-9.
19. Cortes JE, Kantarjian H, Shah NP, Bixby D, Mauro MJ, Flinn I, et al. Ponatinib in refractory Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 2012 ; 367 : 2075-88.
20. Cortes JE, Kantarjian HM, Brümmendorf TH, Kim DW, Turkina AG, Shen ZX, et al. Safety and efficacy of bosutinib (SKI-606) in chronic phase Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia patients with resistance or intolerance to imatinib. *Blood* 2011 ; 118 : 4567-76.
21. Terre C, Eclache V, Rousselot P, Imbert M, Charrin C, Gervais C, et al. Report of 34 patients with clonal chromosomal abnormalities in Philadelphia-negative cells during imatinib treatment of Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2004 ; 18 : 1340-6.
22. Lee SE, Choi SY, Bang JH, Kim SH, Jang EJ, Byeun JY, et al. The long-term clinical implications of clonal chromosomal abnormalities in newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib mesylate. *Cancer Genet* 2012 ; 205 : 563-71.
23. Deininger MW, Cortes J, Puette R, Park B, Hochhaus A, Baccarani M, et al. The prognosis for patients with chronic myeloid leukemia who have clonal cytogenetic abnormalities in Philadelphia chromosome-negative cells. *Cancer* 2007 ; 110 : 1509-19.
24. De Melo VA, Milojkovic D, Khorashad JS, Marin D, Goldman JM, Apperley JF, et al. Philadelphia-negative clonal hematopoiesis is a significant feature of dasatinib therapy for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2007 ; 110 : 3086-7.
25. Wang H1, Jin J, Wang Y, Huang X, Huang J. Clonal chromosomal abnormalities in Philadelphia-negative cells in chronic myeloid leukemia patients treated with nilotinib used in first-line therapy. *Ann Hematol* 2013 ; 92 : 1625-32.
26. Zeidan A, Kakati S, Anderson B, Barcos M, Wetzler M. Monosomy 7 in t(9;22)-negative cells during nilotinib therapy in an imatinib-resistant chronic myeloid leukemia case. *Cancer Genet Cytogenet* 2007 ; 176 : 169-71.
27. Kovitz C, Kantarjian H, Garcia-Manero G, Abruzzo LV, Cortes J. Myelodysplastic syndromes and acute leukemia developing after imatinib mesylate therapy for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2006 ; 108 : 2811-3.
28. Lauseker M, Hanfstein B, Haferlach C, Schnittger S, Pfirrmann M, Fabarius A, et al. Equivalence of BCR-ABL transcript levels with complete cytogenetic remission in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Cancer Res Clin Oncol* 2014 ; 140 : 1965-9.