

Recommandations

Recommandations pour la prise en charge cytogénétique de la leucémie myéloïde chronique (LMC) établies par le Groupe Français de Cytogénétique Hématologique (GFCH)

GFCH

Groupe Français de Cytogénétique Hématologique (GFCH), Paris, France

Reçu le 15 mars 2004 ; accepté le 8 avril 2004

Disponible sur internet le 03 mai 2004

Participants : Chrystele Bilhou-Nabera, Carole Barin, Alain Bernheim, Nicole Dastugue, Virginie Eclache, Claude Léonard, Sophie Raynaud, Christine Terre, Jacqueline Van Den Akker Coordonnatrice : Virginie Eclache.

1. Introduction

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une maladie hémato-poïétique due à une prolifération clonale de cellules pluripotentes conduisant à une expansion cellulaire principalement myéloïde. Son incidence est estimée à 1,5 cas /100 000 habitants par an. La LMC est caractérisée par un marqueur chromosomique spécifique, le chromosome Philadelphie (Ph) provenant d'une translocation équilibrée $t(9;22)(q34;q11)$, retrouvée dans 95 % de cas de LMC. Cette translocation génère, sur le dérivé 22, le gène hybride *BCR-ABL* issu de la fusion de la partie 5'BCR du gène *BCR* (localisé sur le chromosome 22) avec la partie 3'ABL du gène *ABL* (localisé sur le chromosome 9). Dans 5 % des cas, le gène de fusion *BCR-ABL* résulte soit d'une translocation variante complexe impliquant un 3^e parfois plusieurs chromosomes, soit d'une insertion cryptique de matériel chromosomique indétectable par les techniques cytogénétiques conventionnelles. Dans ce dernier cas, la LMC est dite Ph-négative BCR-positive et seules les techniques de FISH et de biologie moléculaire (RT-PCR) permettront la détection du gène hybride et du transcrite BCR-ABL. Le transcrite BCR-ABL, retrouvé dans tous les cas de LMC, est le transcrite critique de la $t(9;22)$, tandis que le transcrite réciproque ABL-BCR, généré sur le dérivé 9 de la $t(9;22)$ n'est retrouvé que dans 60 % des cas et n'a pas de rôle physiopathologique connu. BCR-ABL code pour une protéine à activité tyrosine kinase P210 (de 210 kD) jouant un rôle majeur dans le développement de la LMC.

La maladie présente plusieurs phases : une phase chronique indolente, suivie d'une phase d'accélération puis de transformation en leucémie aiguë (acutisation) particulièrement résistante aux traitements par chimiothérapie. Les traitements cytoréducteurs classiques (hydroxyurée, busulfan) permettent une réponse hématologique transitoire sans éradication du clone malin. Le traitement par IFN et l'allogreffe de moëlle permettent d'obtenir des réponses cytogénétiques dont le niveau est bien corrélé avec la survie à long-terme des patients. L'introduction de l'imatinib a récemment modifié la prise en charge thérapeutique de la LMC car cette thérapie ciblée sur un effet antityrosine kinase permet aussi d'induire des réponses cytogénétiques, mais le devenir à long terme des patients sous imatinib reste à évaluer. Pour tous ces traitements, la réponse cytogénétique est un des moyens d'évaluation de la réponse thérapeutique. La réponse est dite complète quand le clone Ph+ est éradiqué (0 % de cellules Ph+), majeure quand le clone Ph+ est présent dans < 35 % des métaphases, mineure quand le clone Ph+ est compris entre 36 % et 65 %, et minime (66 à 95 % de Ph+) ou nulle quand le clone Ph+ est retrouvé dans > 96 % des métaphases.

2. Recommandations du GFCH pour la prise en charge cytogénétique au diagnostic

La cytogénétique conventionnelle (CC) est indispensable au diagnostic, elle reste la technique de référence pour mettre en évidence la $t(9;22)$ forme classique ou variante. Elle peut être complétée par des techniques d'hybridation in situ en fluorescence (FISH) à l'aide de sondes spécifiques des gènes *BCR* et *ABL*. La biologie moléculaire permet l'identification

Adresse e-mail : berger@necker.fr (GFCH).

des différents transcrits de fusion : la technique actuellement la plus couramment utilisée repose sur l'amplification de l'ADN complémentaire (RT-PCR).

La cytogénétique conventionnelle permet de détecter d'éventuelles anomalies chromosomiques additionnelles parfois présentes dès le diagnostic.

2.1. Les indications de la FISH

La première indication de la FISH est la discordance entre les données du caryotype (qui n'identifie pas de Ph) et les autres données biologiques, y compris la RT-PCR, qui sont compatibles avec le diagnostic de LMC. La mise en évidence d'un gène hybride *BCR-ABL* par FISH confirmera alors le diagnostic de LMC. Un autre type de discordance, plus rare, correspond aux *t(9;22)* qui génèrent des transcrits variants (e1a2, e6a2, e19a2...) non détectés dans les conditions standards conçues pour la détection des transcrits M-BCR.

Il a été montré que 10 à 15 % des patients présentaient une délétion de taille variable (de quelques dizaines de bases et pouvant atteindre plusieurs mégabases) sur le dérivé 9. Ces délétions intéressent les régions adjacentes au point de cassure (5' ABL et 3' BCR) et ne sont pas détectables par technique cytogénétique conventionnelle. La présence de ces délétions a été associée à un mauvais pronostic avec les traitements antérieurs à l'imatinib et leur impact reste à évaluer sur des patients sous imatinib. Leur recherche contribuera donc à une meilleure connaissance de leur fréquence et de leur impact pronostique sur les séries prospectives. Ces délétions n'étant pas décisionnelles, il s'agit à ce jour d'un acte optionnel.

Elles peuvent actuellement être recherchées par les techniques de FISH à l'aide de sondes spécifiques de 2^e génération. Plusieurs types de sondes commercialement disponibles sont informatives pour détecter ces délétions. Ces sondes couvrent largement les gènes *ABL* et *BCR*, détectent bien les délétions de grande taille mais ne permettent pas d'identifier les délétions de petite taille.

3. Recommandations du GFCH pour l'évaluation de la réponse au traitement

3.1. Caryotype

La réponse cytogénétique est évaluée séquentiellement sur cellules médullaires. Cette réponse étant évaluée en pourcentage de cellules résiduelles Ph+, un nombre suffisant de métaphases (minimum 20 mitoses mais si possible supérieures ou égales à 30) doit être analysé pour augmenter la précision statistique du résultat. La seule situation où le caryotype ne permet pas d'évaluer la réponse thérapeutique est constituée par les LMC Ph-négatives BCR-positives.

Le caryotype permet aussi de détecter les anomalies associées à la *t(9;22)* dans le clone Ph-positif. Leur survenue en cours d'évolution de la LMC est classiquement précurseur ou

associée à l'accélération de la maladie. Les schémas classiques d'évolution clonale incluent l'apparition d'une trisomie 8, trisomie 19, un isochromosome 17q et la duplication du Ph.

Des anomalies clonales peuvent apparaître dans les cellules Ph-négatives des LMC traitées. Ce phénomène occasionnellement rapporté avec les traitements antérieurs à l'imatinib, est en cours d'exploration chez les patients sous imatinib. Un caryotype systématique des cellules Ph-négatives des patients en réponse cytogénétique partielle ou complète permettra de répertorier ces anomalies et d'évaluer leur impact à long terme.

3.2. FISH

Aucun protocole ne recommande la FISH (sur cellules médullaires ou sanguines) pour évaluer la réponse cytogénétique.

La seule situation où la réponse cytogénétique ne peut être évaluée que par FISH sur cellules médullaires est la LMC Ph-négative BCR-positive.

Dans les autres LMC, la FISH peut parfois être un complément utile quand un nombre insuffisant, voire l'absence, de métaphases a été obtenu. Les résultats de la FISH interphasique ne sont pas superposables à ceux de la FISH métaphasique. La FISH métaphasique explore, comme le caryotype, le compartiment des cellules en division alors que la FISH interphasique explore aussi le compartiment des cellules quiescentes. De plus, la sensibilité de la FISH étant dépendante du nombre de cellules analysées, il convient d'analyser au moins 200 (voire 500) noyaux. La sensibilité de la FISH métaphasique est comparable à la sensibilité de la cytogénétique conventionnelle, celle de la FISH interphasique est comprise entre 10^{-2} et 10^{-3} , donc très inférieure au seuil de sensibilité des techniques moléculaires (10^{-5}) requises pour quantifier la maladie résiduelle.

Si une technique FISH doit être utilisée pour évaluer la maladie résiduelle, il convient d'utiliser des sondes de 2^e génération qui ont des taux de faux-positifs inférieurs à 1 %. Ces seuils de positivité ne sont atteints que s'il n'y a pas de délétion sur le dérivé 9 car c'est la présence du signal sur le der(9) qui diminue les faux-positifs sur cellules interphasiques. Dans le cas de délétion sur le der(9), seule la colocalisation des signaux BCR et ABL du gène hybride *BCR-ABL* est observée et le seuil de sensibilité de la technique est celui des sondes de 1^{re} génération (5 % de faux positifs) donc trop élevé pour évaluer la maladie résiduelle.

Dans le cas particulier d'allogreffe donneur-receveur de sexe différent, le chimérisme des chromosomes sexuels (XX/XY) peut être facilement quantifié par FISH sur cellules interphasiques.

Pour en savoir plus

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

- [2] Daley QD, Van Ettern RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the *p210 bcr-abl* gene of the Philadelphia chromosome. *Science* 1990;247:824–30.
- [3] Vardiman JW, Imbert M, Pierre R, et al. Chronic myelogenous leukaemia. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, editors. *Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues World Health Organisation Classification of tumours*. Lyon, France: AIRC Press; 2001. p. 20–6.
- [4] Goldman JM, et al. Management of chronic myeloid leukemia. *Seminars in Hematology* 2003;40(1):1–103.
- [5] Deininger M. Cytogenetic studies in patients on imatinib. *Seminars in Hematology* 2003;40(2 suppl 2):50–5.
- [6] Amiel A, Yarkoni S, FeJgin M, Gaber E, Nagler A, Manor Y, et al. Clinical detection of BCR-ABL fusion by in situ hybridization in Chronic Myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1993;65:32–4.
- [7] Cueno A, Bigoni R, Emmanuel B, Smit E, Roberti MG, Bardi A, et al. Fluorescence in situ hybridization for the detection and monitoring of the Ph-positive clone in chronic myelogenous leukemia: comparison with metaphase banding analysis. *Leukemia* 1998;12:1718–23.
- [8] Kawasaki ES, Clark SS, Coyne MY, Smith SD, Champlin R, Witte ON, et al. Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro. *Proc Natl Acad Sci* 1988;5698–702.
- [9] Sokal JE, Gomez GA, Baccarani M. Prognostic significance of additional cytogenetic abnormalities at diagnosis of Philadelphia chromosome-positive chronic granulocytic leukaemia. *Blood* 1988;72:294–8.
- [10] Dewald GW, Schad CR, Christensen ER, Tiede AL, Zinsmeister AR, Spurbeck JL, et al. The application of fluorescent in situ hybridization to detect *Mbcr/abl* fusion in variant Ph chromosomes in CML and ALL. *Cancer Genet Cytogenet* 1993;71:7–14.
- [11] Dewald GW, Wyatt WA, Juneau AL, Carlson OR, et al. Highly sensitive fluorescence in situ hybridization method to detect double *bcr/abl* fusion and monitor response to therapy in chronic myeloid leukemia. *Blood* 1998;91:3357–65.
- [12] Huntly B, Bench A, Reid A, et al. Deletion of the derivative chromosome 9 occur at the time of the Philadelphia translocation and provide a powerful and independent prognostic factor in chronic myeloid leukemia. *Blood* 2001;98:1732–8.
- [13] Sinclair PB, Nacheva EP, Leversha M. Large deletion at the *t(9;22)* breakpoint are common and may identify a poor-prognosis subgroup of patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* 2000;95:738–43.
- [14] Huntly B, Bench A, Delabesse E, Reid A, Li J, Scott MA, et al. Derivative chromosome 9 deletion in chronic myeloid leukemia: poor prognosis is not associated with loss of ABL-BCR expression, elevated BCR-ABL levels, or karyotypic instability. *Blood* 2002;99:5457–15453.
- [15] Brian JP, Huntly B, Guilhot F, Reid AG, Vassiliou G, Henning E, et al. Imatinib improves but may not fully reverse the poor prognosis of patients with CML with derivative chromosome 9 deletions. *Blood* 2003;102:2205–12.
- [16] Preudhomme C, Revillion F, Merlat A, Hornez L, Roumier C, Duflos-Grardel N, et al. Detection of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia (CML) using a 'real time' quantitative RT-PCR assay. *Leukemia* 1999;13:957–64.