

# Recommandations du groupe FI-LMC pour la prise en charge des patients présentant des mutations du domaine tyrosine kinase de BCR-ABL dans les hémopathies malignes à chromosome Philadelphie

## Management of positive Philadelphia chromosome leukemia with ABL point mutations : recommendations from the FI-LMC group

Claude Preudhomme<sup>1</sup>  
Jean-Michel Cayuela<sup>2</sup>  
Jean-Claude Chomel<sup>3</sup>  
Sélim Corm<sup>4</sup>  
Sandrine Hayette<sup>5</sup>  
François-Xavier Mahon<sup>6</sup>  
Franck Emmanuel Nicolini<sup>7</sup>  
Delphine Réa<sup>8</sup>  
Catherine Roche-Lestienne<sup>9</sup>  
François Guilhot<sup>10</sup>

<sup>1</sup> Université Lille Nord de France et laboratoire d'hématologie, CHU de Lille, et Inserm U837 et North-West cancéropôle, Lille <cpreudhomme@chru-lille.fr>

<sup>2</sup> Hématologie biologique, Université Denis-Diderot-Paris 7, Hôpital Saint-Louis, Paris

<sup>3</sup> Hématologie et oncologie biologique, CHU de Poitiers et EA 3805, Université de Poitiers

<sup>4</sup> Hématologie clinique, Centre hospitalier, Chambéry

<sup>5</sup> Hématologie et biologie moléculaire, Hospices civils de Lyon, Centre Hospitalier Lyon-Sud, et UMR5239 CNRS, Pierre-Bénite

**Tirés à part :**  
C. Preudhomme

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une hémopathie maligne appartenant au groupe des syndromes myéloprolifératifs (ou néoplasies myéloprolifératives selon la classification OMS 2008). Elle est caractérisée par la présence d'une anomalie chromosomique dans les cellules hématopoïétiques, le chromosome Philadelphie (Ph1). Celui-ci est, en fait, le chromosome 22 dérivé de la translocation réciproque équilibrée t(9 22)(q34;q11). La protéine chimérique, codée par le transcrite de fusion *BCR-ABL* issu de ce réarrangement, a une activité tyrosine kinase constitutivement dérégulée et est directement responsable de la transformation leucémique. Cette protéine est devenue la cible d'un inhibiteur de tyrosine kinase (ITK), l'imatinib (inhibiteur compétitif de l'ATP), dont l'efficacité thérapeutique importante a profondément transformé la prise en charge thérapeutique et le pronostic de cette hémopathie [1]. L'imatinib, à la dose quotidienne de 400 mg, est devenu le traitement de première intention de la LMC en phase chronique.

La récente évaluation du protocole multicentrique de phase III « IRIS » (*International Randomized Interferon versus ST1571*) de traitement de la phase initiale chronique comparant l'imatinib en première ligne à l'association interféron - cytarabine, a confirmé l'efficacité de l'imatinib avec, à 7 ans, 83 % de survie sans progression vers les phases avancées de la maladie et 88 % de survie globale [2-5]. La supériorité significative de l'imatinib sur le traitement de référence a pu être démontrée dans un travail de comparaison avec les résultats de l'essai français LMC91 [6].

Cependant, des échecs sont observés, rarement primaires, plus souvent au cours de l'évolution. Dans l'essai IRIS, sur les 553 patients initialement inclus dans le bras imatinib, 221 (40 %) ont arrêté le protocole, dont 82 (15 %) pour manque d'efficacité. Sur les 456 patients qui ont obtenu une réponse cytogénétique complète, 79 (17 %) l'ont perdue. Définir la résistance et donc procéder à une recherche du mécanisme de cette résistance est essentiel. Un panel d'experts de l'European LeukemiaNet (ELN) a proposé en 2006 des définitions d'échec ou de réponses insuffisantes, situations pouvant conduire à une recherche biologique du mécanisme de résistance, plus particulièrement à une recherche de mutations du domaine tyrosine kinase de *BCR-ABL* [7].

<sup>6</sup> Hématopoïèse leucémique et cible thérapeutique, Inserm U876, Université Victor-Ségalen, Laboratoire d'hématologie, CHU de Bordeaux, Bordeaux

<sup>7</sup> Hématologie clinique, Hôpital Edouard-Herriot, Lyon

<sup>8</sup> Service des maladies du sang, Hôpital Saint-Louis, Paris

<sup>9</sup> Unité Inserm 837, Institut de recherche contre le cancer de Lille, et Laboratoire de génétique médicale, CHRU de Lille, Hôpital Jeanne de Flandre, Lille

<sup>10</sup> Oncologie-hématologie et thérapie cellulaire EA 3805, CIC 0802 Inserm, CHU de Poitiers, Poitiers

Ces définitions étaient essentiellement fondées sur les résultats de l'essai IRIS. En 2009, l'ELN propose quelques modifications des définitions de réponses initiales au traitement par imatinib [8]. Ces définitions sont fondamentales car elles guident l'attitude thérapeutique et de suivi qu'il convient d'adopter pour les patients.

## Définition de la réponse optimale et suboptimale et de la résistance : de l'ELN 2006 à l'ELN 2009

Les échecs à l'imatinib regroupent les situations dans lesquelles la survie est compromise et nécessitent un changement thérapeutique. Ils ont été définis en 2006 [7] par une rémission hématologique instable à 3 mois ou l'absence de réponse cytogénétique (RCy) au moins minimale à 6 mois, l'absence de réponse cytogénétique au moins partielle (moins de 35 % de cellules Ph1) à 12 mois, l'absence de rémission cytogénétique complète (RCyC) à 18 mois et à tout moment, la perte de la rémission hématologique complète (RHC), la rechute cytogénétique, ou l'apparition d'une mutation hautement résistante à l'imatinib.

La réponse suboptimale correspond aux situations dans lesquelles poursuivre l'imatinib à 400 mg/j pourrait s'avérer ne pas être la meilleure option. Elle a été initialement définie par l'absence de réponse cytogénétique au moins partielle à 6 mois, l'absence de réponse cytogénétique complète à 12 mois, l'absence de réponse moléculaire majeure (RMM :

baisse du transcrit *BCR-ABL* de 3 log, rapport *BCR-ABL/ABL* ≤ 0,1% sur l'échelle internationale ou IS) à 18 mois ou à tout moment, l'apparition d'anomalies cytogénétiques additionnelles dans les mitoses Ph1+, la perte de la réponse moléculaire majeure ou l'apparition d'une mutation faiblement résistante à l'imatinib.

L'actualisation récente des critères de l'ELN propose quelques modifications des définitions de réponses initiales au traitement par imatinib, synthétisées dans le *tableau 1* [9].

La réponse optimale, celle qui prédit la survie la plus favorable, est désormais définie clairement et non plus par défaut. Ainsi, à 3 mois, les patients doivent être en rémission hématologique complète et avoir un début de réponse cytogénétique ; la présence d'anomalies cytogénétiques additionnelles dans les cellules Ph+ est considérée comme une situation à risque de progression et la délétion du chromosome 9 n'est plus considérée comme une anomalie de mauvais pronostic. Pourtant, l'évaluation cytogénétique à 3 mois n'était pas considérée comme suffisamment discriminante quant au devenir ultérieur des patients dans l'essai IRIS, et n'avait pas été prise en compte dans la classification 2006 des réponses à l'imatinib [9, 10]. Depuis, aucune nouvelle donnée mettant en évidence l'importance de l'évaluation cytogénétique à 3 mois n'a été publiée. Par la suite, les patients doivent respectivement obtenir une réponse cytogénétique au moins partielle à 6 mois, complète à 12 mois et une réponse moléculaire majeure à 18 mois. Ultérieurement, la réponse optimale est définie comme une RMM persistante dans le temps.

**Tableau 1**  
Définition des réponses initiales au traitement par imatinib (d'après [54])

	<b>Optimale</b>	<b>Suboptimale</b>	<b>Échecs</b>	<b>Alarmes</b>
Au diagnostic	NA	NA	NA	Sokal élevé ACA*
À 3 mois	RHC et RCy au moins minime	Absence de RCy	< RHC	NA
À 6 mois	RCy au moins partielle	RCy minime ou mineure	Absence de RCy	NA
À 12 mois	RCy complète	RCy partielle	< RCy partielle	< RMM
À 18 mois	RMM	< RMM	< RCy complète	NA
À tout moment	RMM persistante	Perte de RMM Mutation faiblement résistante	Perte de RHC Perte de RCC Mutation hautement résistante ACA Ph1+	Augmentation des transcrits <i>BCR-ABL</i> EC** Ph1-

\* ACA : anomalie clonale additionnelle.

\*\* EC : évolution clonale.

La réponse suboptimale est définie par l'absence de réponse cytogénétique à 3 mois et non plus par la réponse hématologique sans réponse complète hématologique, une réponse cytogénétique minimale ou mineure à 6 mois, une réponse cytogénétique partielle à 12 mois et une réponse cytogénétique complète sans réponse moléculaire majeure à 18 mois. Sont également considérés en réponse suboptimale, les patients perdant une réponse moléculaire majeure sans perte de réponse cytogénétique complète et l'acquisition d'une mutation de *BCR-ABL* faiblement résistante à l'imatinib *in vitro*. Ce dernier point peut paraître discutable dans la mesure où l'acquisition d'une mutation représente généralement un événement péjoratif dans l'évolution de la maladie et où les ITK de seconde génération (ITK2) sont désormais disponibles et ont montré leur efficacité.

La définition de l'échec a subi peu de modifications ces dernières années étant définie par l'absence de réponse hématologique complète à 3 mois, et par l'apparition d'anomalies cytogénétiques additionnelles dans les mitoses Ph1+ à tout moment. Les autres critères sont demeurés similaires à ceux définis en 2006 : l'absence de toute réponse cytogénétique à 6 mois, une réponse cytogénétique moins que partielle à 6 mois, moins que complète à 18 mois, et à tout moment, la perte de la réponse hématologique complète, de la réponse cytogénétique complète et l'émergence d'une mutation hautement résistante à l'imatinib *in vitro*.

Les situations d'alarme demeurent semblables à celles définies en 2006, hors la délétion 9q au diagnostic dont le pronostic défavorable n'a pas été confirmé. Ces situations impliquent un suivi attentif sans modification thérapeutique.

De ces définitions découlent de nouvelles propositions du panel d'expert de l'ELN de surveillance et de prise en charge des patients (tableau 2).

## Principaux mécanismes de résistances aux inhibiteurs de tyrosine kinase

Les mécanismes de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase sont étroitement liés à leur mode de fonctionnement.

Pour des raisons didactiques, il convient de distinguer ceux dépendants :

- du médicament c'est-à-dire relatifs au domaine de la pharmacocinétique ;
- de la cible oncogénique *BCR-ABL* ;
- de la cellule leucémique, en rapport ou liés aux différentes voies de transduction du signal (figure 1). Il est utile aussi de bien distinguer ceux identifiés *in vitro* à partir de lignées cellulaires, de ceux observés chez les patients.

### Résistances liées à l'inhibiteur, c'est-à-dire au médicament lui-même

Les concentrations plasmatiques chez les patients traités et les données de pharmacocinétiques ont permis d'identifier ce mécanisme assez récemment. En effet, il existe un lien statistique entre les concentrations plasmatiques et la réponse au traitement retrouvé dans plusieurs études suggérant qu'il existe chez certains patients de véritables résistances pharmacologiques [11]. Il est important de rappeler que l'imatinib mais aussi les autres ITK sont métabolisés par le cytochrome P450. Pour atteindre sa cible, l'imatinib est dépendant de transporteurs et surtout de pompe à influx telle que hOct-1 qui autorise l'entrée de l'imatinib dans la cellule [12]. Il semble que cette pompe et son activité modifient la réponse au traitement sans que de véritable résistance n'ait été mise en évidence chez les patients.

Pour les pompes d'efflux c'est-à-dire capables d'expulser les drogues à l'extérieur des cellules, les données *in vitro* avec, par exemple Pgp *MDR1*, ont bien démontré qu'elles participent à la résistance à l'imatinib. Chez les patients, les données sont moins évidentes du fait de la difficulté d'étudier ou d'isoler la cellule-souche leucémique et du fait aussi de la variabilité de l'expression de Pgp au cours de la différenciation hématopoïétique.

Les mécanismes de résistance liés à la cible oncogénique *BCR-ABL* elle-même ont été les plus étudiés. On peut distinguer les modifications quantitatives de la cible dues à une amplification du gène *BCR-ABL*, des modifications qualitatives de la cible dues aux mutations du domaine tyrosine kinase qui font l'objet de cette revue.

**Tableau 2**  
Surveillance et prise en charge des patients (ELN 2009)

Le caryotype médullaire (et non la FISH)	- Au diagnostic - À 3 mois - À 6 mois - Puis tous les 6 mois jusqu'à l'obtention d'une rémission cytogénétique complète confirmée - Ensuite 1 fois par an, si un monitoring moléculaire sanguin n'est pas possible - Toujours en cas d'échec (résistance primaire ou secondaire) Et en cas d'anémie, leucopénie ou thrombopénie inexpliquée
Analyse moléculaire (RT-Q-PCR)	- Tous les 3 mois sur le sang jusqu'à l'obtention d'une réponse moléculaire majeure (RMM, c'est-à-dire rapport <i>BCR-ABL/ABL</i> ≤ 0,1%), confirmée à 3 mois. - Ensuite tous les 6 mois
Recherche moléculaire d'une mutation	- En cas de réponse suboptimale ou d'échec. Cette recherche est nécessaire avant la décision de proposer un traitement par ITK de 2 <sup>nde</sup> génération

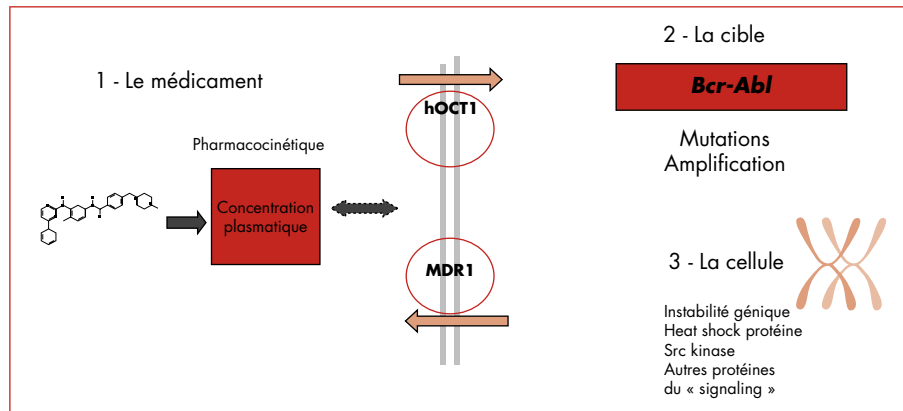


Figure 1. Principaux mécanismes de résistance à l'imatinib : trois partenaires importants.

## Modification de la cible

Il a été montré initialement que la résistance à l'imatinib pouvait être due à des phénomènes d'amplification génique du gène *BCR-ABL* lui-même ou encore du gène *MDR1* (gène de résistance multidrogue) [13]. Par la suite, il a été montré que la résistance à l'imatinib chez les patients pouvait être due à l'apparition de mutations dans le domaine tyrosine kinase de *BCR-ABL* [14]. Enfin, il a été démontré que toutes les mutations n'avaient pas la même signification sur le plan clinique et que la reproduction de ces mutations *in vitro* conduit à des différences qui ne peuvent expliquer la résistance clinique [12].

## Mécanismes de résistance dépendant de la cellule et autres

D'autres tyrosines kinases impliquées dans la transduction du signal peuvent prendre le relais de *BCR-ABL*. Par exemple, les protéines de la famille des Src kinases ont été particulièrement étudiées et montrées comme pouvant participer à la résistance à l'imatinib et au nilotinib [15]. D'autres acteurs moléculaires tels les « *heat shock* » protéines (HSP70) ont aussi été suggérées comme impliquées [16]. Dans la grande majorité des cas, les mécanismes impliqués ne sont pas identifiés mais ils semblent étroitement liés à l'instabilité génique des cellules car leur fréquence d'apparition est corrélée au stade de la maladie.

## Répartition et fréquence des mutations

À l'heure actuelle, plus de 100 mutations ponctuelles dont la répartition est uniforme dans le domaine kinase de *BCR-ABL* ont été décrites *in vitro* et *in vivo*. Cependant, elles sont plus fréquemment retrouvées dans 4 domaines fonctionnels impor-

tants de la kinase (variant d'épissage *ABL1a*, accession number : U07563) :

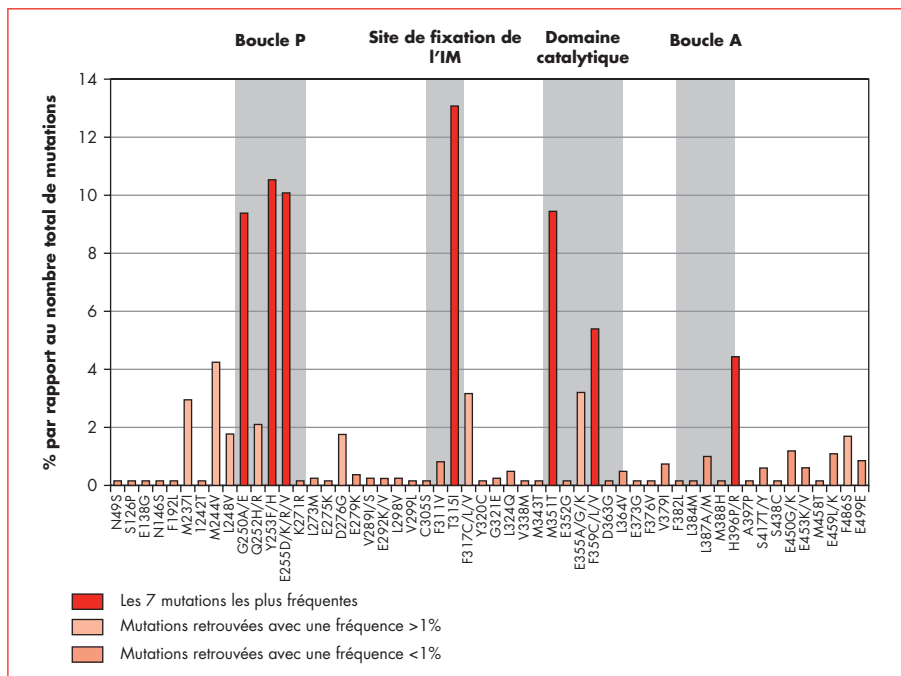
- la boucle P (pour phosphorylation), qui forme une niche dans laquelle va se loger l'adénosine triphosphate (ATP) (acides aminés [aa] 248 à 255) ;
- le site de liaison aux ITK, qui concerne les aa F311, T315 et F317 ;
- le domaine catalytique (aa 351 à 359) ;
- la boucle A (pour activation) (aa 379 à 396), dont la conformation est déterminante pour l'affinité à l'imatinib et au nilotinib. En effet, la protéine *ABL* est physiologiquement en équilibre entre une configuration active et inactive. Or, seule la configuration inactive de la boucle A d'*ABL* permet la fixation de l'imatinib et du nilotinib à leur cible, ce qui n'est pas le cas du dasatinib.

## Fréquence relative des mutations détectées (figure 2)

En pratique clinique, 60 à 70 % des mutations retrouvées en cas de résistance à l'imatinib, toutes phases de LMC confondues, concernent 7 résidus : il s'agit des aa T315, Y253, E255, M351, G250, F359 et H396. On observe une grande disparité dans leur fréquence selon la phase de la maladie, le type de résistance à l'imatinib et l'ITK de seconde génération utilisé. La fréquence relative des mutations détectées est décrite dans la figure 2.

## Fréquence en fonction de la phase de la maladie

D'une manière générale, plus la LMC évolue, plus la fréquence de mutations retrouvées au moment de la résistance à l'imatinib augmente. Soverini *et al.* avaient déjà rapporté, en 2006, des données intéressantes concernant une cohorte de 297 patients résistants à l'imatinib [17]. Dans cette étude, pour les patients en phase chronique (PC) de la LMC, 14 % des patients traités par imatinib



**Figure 2.** Répartition des mutations selon leur localisation dans le domaine TK de c-ABL (d'après [12]).

en première ligne sont porteurs de mutations *BCR-ABL* au moment de la résistance à l'imatinib, et ce pourcentage s'élève à 31 % lorsque l'on considère des patients en PC préalablement en échec thérapeutique sous interféron. Concernant les patients en phases avancées, la fréquence des mutations retrouvées au moment de la résistance à l'imatinib est de 52 % en phase accélérée, 75 % en crise blastique myéloïde et 83 % en crise blastique lymphoïde ou 80 % lors d'une leucémie aiguë lymphoblastique à chromosome Philadelphie (LAL-Ph1) [18]. Cette observation a été confirmée par la suite dans une étude de compilation des différentes données publiées à ce jour [12]. Notamment, la fréquence observée de mutations chez les patients résistants à l'imatinib est de 26 % en phase chronique précoce et de 67 % en phase chronique tardive. Cette étude de synthèse permet également de noter que la fréquence du type de mutation varie selon la phase de la maladie, puisqu'en phase chronique 70 % des mutations concernent les aa M244, L248, F317, H396 et S417. En revanche, en crise blastique de la LMC, plus de la moitié des mutations concernent les résidus Q252, Y253, E255, T315, E459 et F486. Cependant, ces données sont à nuancer car la fréquence de patients mutés issue d'essais plus récents avec l'imatinib en première ligne semble beaucoup plus faible. Dans le cadre du protocole SPIRIT notamment, la fréquence de patients mutés en phase chronique est de 3 % (17 patients sur 636) [19]. Dans le cas des LAL-Ph1, ce sont principalement des mutations dans la boucle P qui sont retrouvées au moment de la résistance [18].

## Fréquence en fonction du type de résistance

Il est également admis maintenant que la fréquence des mutations varie selon le type de résistance à l'imatinib, puisque la proportion de patients présentant une ou des mutations dans *BCR-ABL* est de 30 % dans le cas d'une résistance primaire, et de 57 % dans le cas d'une résistance secondaire. Dans notre récente expérience de l'essai SPIRIT, 32 % des patients mutés présentent une résistance primaire contre 68 % une résistance secondaire.

## Fréquence et répartition des mutations en fonction du type d'ITK

Si une centaine de mutations sont décrites dans le cadre d'une résistance à l'imatinib, la résistance aux ITK2 est restreinte à quelques mutations seulement. La comparaison du type et de la fréquence des mutations retrouvées *in vitro* et *in vivo* est différente, et les dernières données sont reprises dans le *tableau 3*.

D'une manière générale, l'émergence *in vitro* de clones résistants à l'imatinib et au nilotinib s'accompagne de la présence de mutations réparties sur tout le domaine kinase, contrairement à ce que l'on peut observer dans le cadre de la résistance au dasatinib pour laquelle la présence de mutations est restreinte à la région comprise entre les aa L248 et V299 ou au niveau des résidus T315 et F317 [20, 21]. En revanche, la répartition *in vivo* des mutations spécifiquement acquises dans le cas d'une résistance aux ITK2 est sensiblement différente selon l'inhibiteur, et ne concerne pas la boucle A. Les données concernant la répartition et la fré-

**Tableau 3**

Type de mutations retrouvées *in vitro* et *in vivo* (d'après [15, 20], Hocchaus *et al.*, ASH 2008 et Müller *et al.*, ASH 2008)

	Imatinib		Nilotinib		Dasatinib	
	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
<b>Boucle p</b>	M237I		M237I			
	M244V	M244V				M244V
	L248V	L248V	L248V			
	L248R				L248R	
	G250A		G250A			
	G250E	G250E				
	G250V		G250V			
	Q252R	Q252R				
	Q252H	Q252H			Q252H	Q252H
	Y253F			Y253F		
	Y253K	Y253K				
	Y253H	Y253H		Y253H		
	E255D		E255D			
	E255R		E255R			
	E255V	E255V		E255V		E255V
	E255K	E255K	E255K	E255K	E255K	E255K
	E275K	E275K				
	<b>Fixation</b>	D276G		D276G		
E279K						
E281K			E281K			
E285N			E285N			
V299L		V299L			V299L	V299L
T315I		T315I	T315I		T315I	T315I
T315A					T315A	T315A
F317C			F317C		F317C	F317C
F317V			F317V		F317V	F317V
F317L		F317L			F317L	F317L
F317I						F317I
F317S					F317S	F317S
<b>Domaine C</b>	D325N	D325N	D325N			
	S348L	S348L				
	M351T	M351T				M351T
	E355A	E355A	E355A			
	E355G	E355G	E355G			
	F359C	F359C	F359C	F359C		
	F359V	F359V		F359V		F359V
	V379I					
<b>Boucle A</b>	A380S	A380S				
	L384M					
	L387F	L387F	L387F			
	M388L		M388L			
	H396P	H396P				
	H396R	H396R				
	S417T/Y					
	E459L/K					
	F486S	F486S				

quence des mutations chez les patients résistants montrent que le risque de développer de nouvelles mutations (initialement absentes au moment de la résistance à l'imatinib) est sensiblement identique selon l'ITK de seconde génération uti-

lisé (25-30 %) mais que le type de mutation sélectionné par pression de sélection est différent : sous traitement par nilotinib, les mutations T315I, Y253H, E255K/V et F359C/N sont retrouvées le plus fréquemment, alors que les mutations

T315I/A et F317L/I/S/V représentent 80 % des mutations lors d'une résistance au dasatinib [22, 23]. Cependant, le risque de développer des mutations présentant une résistance au nilotinib ou au dasatinib est d'autant plus élevé que ces patients sont déjà porteurs de mutations au moment de la résistance à l'imatinib. En effet, ce risque a été évalué sur une cohorte de 95 patients (différentes phases de LMC et LAL Ph+) par S. Soverini *et al.* [24]. Trente-huit pour cent des patients mutés au moment de leur prise en charge par un ITK de seconde génération ont rechuté avec l'émergence de mutations additionnelles, contre seulement 16 % des patients qui ne présentaient pas de mutation au moment de la résistance à l'imatinib ( $p = 0,02$ ). En ce qui concerne les LAL Ph1, 81 % des patients sont porteurs de mutations au moment de la rechute, dont 46 % au niveau de la boucle P [18]. De même, la détection de la fréquence des mutations semble augmenter chez les patients multirésistants : de 55 % de patients porteurs de mutations au moment de la résistance à l'imatinib, la fréquence de patients mutés serait de 90 % puis de 97 % après la résistance au second puis au troisième ITK [24].

### Cas particulier de la T315I

La mutation T315I reste une des mutations les plus préoccupantes car résistante à tous les ITK. Pour les LMC résistantes à l'imatinib et mutées, une étude de 2006 rapporte 18 patients sur 94 (19 %) porteurs de la T315I, dont la moitié est en phase chronique. Dans une étude épidémiologique internationale visant à analyser le profil des patients, atteints de LMC et de LAL Ph+, porteurs d'une mutation T315I, 41 % (88 patients sur 216) avaient reçu un ITK en 1<sup>re</sup> ligne, 23 % en deuxième ligne (34 patients sur 151), 15 % en troisième ligne (15 patients sur 97), et 38 % (23 patients sur 60) en quatrième ligne [26]. Cependant, ces chiffres sont vraisemblablement surestimés car les cohortes sont hétérogènes et comprennent souvent des patients dont l'histoire de la maladie n'est pas récente et des LAL à Ph. Les dernières données concernant la prise en charge par imatinib en première intention dans l'essai SPIRIT révèlent un seul cas de résistance secondaire avec cette mutation parmi les 16 patients mutés [19].

### Techniques de recherche des mutations du domaine tyrosine kinase d'ABL1

La recherche de mutations acquises au niveau du domaine tyrosine kinase de BCR-ABL est réalisée classiquement sur un prélèvement sanguin et éventuellement médullaire (LAL). La technique de référence reste le séquençage direct bidirectionnel de la région comprenant au minimum les nucléotides codant pour les acides aminés 240 à 500. Afin de n'amplifier que l'allèle réarrangé d'ABL, il est nécessaire de procéder à une première amplification par RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) des transcrits onco-

géniques BCR-ABL, suivie d'une amplification par PCR nichée du domaine d'ABL d'intérêt.

De nombreuses autres techniques ont été décrites allant du criblage exhaustif au ciblage d'une mutation particulière (tableau 4). Parmi ces dernières, certaines sont très sensibles et quantitatives mais posent des problèmes de spécificité (risque de faux positifs).

De ce fait, ce type de méthode n'est pas préconisé pour l'identification des mutations dans le contexte des résistances aux ITK mais doit plutôt être dédié aux suivis de mutations préalablement identifiées.

En dehors du séquençage, les méthodes les plus citées dans la littérature sont, en ce qui concerne le criblage, la D-HPLC et, pour les méthodes ciblées, celles fondées sur l'ASO-RQ-PCR.

### Intérêt des méthodes de détection sensibles

Pour pouvoir raisonnablement associer une mutation à un mécanisme de résistance, il est essentiel de tenir compte du taux d'allèle muté détecté. La mise en œuvre d'une technique de détection très sensible sur les prélèvements diagnostiques permet la mise en évidence de nombreuses mutations qui, pour la plupart, sont potentiellement capables d'induire une résistance clinique aux ITK [27-29]. Pourtant, certains de ces patients (même porteurs de la mutation T315I à un faible taux) répondent très bien au traitement. Inversement, une mutation identifiée en situation de résistance clinique primaire ou secondaire, par une technique moins sensible (séquençage double brin) peut être considérée comme étant sa cause probable [30]. Il semble donc important de ne pas chercher à identifier des mutations par des techniques très sensibles en dehors d'un cadre protocolaire et ce, afin de ne pas spolier un patient de tous les bénéfices potentiels d'un traitement par ITK. Cependant de nombreuses méthodologies permettent la détection (et le plus souvent le dosage) de faible quantité d'ARNm BCR-ABL mutés (sensibilité 10-3/10-5). Parmi celles-ci, les méthodes basées sur les RQ-PCR spécifiques d'allèles paraissent les moins difficiles à mettre en place, mais il faut s'interroger sur leur réel intérêt.

Tout d'abord, il convient de définir les mutations pour lesquelles ces techniques peuvent être utilisées. La mutation T315I, entraînant une résistance globale à tous les ITK ATP-compétitifs, constitue la cible majeure. Les quelques mutations apparaissant sous ITK2 pourraient également être étudiées par ces méthodes. Ensuite, les circonstances pour lesquelles la détection des mutations BCR-ABL par des méthodologies sensibles est utile, doivent être précisées. Il est clair que lors d'une première étude de la résistance à un ITK, ces techniques ne peuvent remplacer les méthodes de référence (séquençage ou méthodes de criblage). De même, au diagnostic d'une LMC et avant tout traitement, il est inutile, voire dangereux, de rechercher, par des méthodes sensibles, une mutation préexistante [27]. En revanche, ces techniques pourraient potentiellement aider la décision thérapeutique dans la prise en charge des LAL Ph1+ [18], cela est en cours de confirmation dans l'étude prospective réalisée dans le cadre de l'essai

**Tableau 4** Caractéristiques techniques des méthodes de détection des mutations du domaine tyrosine kinase d'ABL1

Techniques	Sensibilité	Quantifi- cation	Faisabilité	Recommandations	Références
Non ciblées					
Séquençage	Séquençage double brin	Non	+	Séquençage de 2 produits d'amplification indépendants.	Branford, Blood 2002 2003, Hochhaus, Leukemia 2002
PCR clonage		Oui	-	Confirmation sur 2 produits d'amplification indépendants.	Shah, Cancer cell 2002, Gorre, Science 2001
Pyroséquençage		Non	-	Séquençage de 2 produits d'amplification indépendants.	Khorashad, Leukemia 2006
Criblage					
Chromatographie Liquide Haute Performance en conditions dénaturantes (D-HPLC)	0,1-10 %	Non	+	Caractérisation par séquençage	Deninger, Leukemia 2004 Irving, Clin Chem 2004 Soverini, Clin Chem 2004 Ernst, Hemeatologica 2008
Electrophorèse en Gel de Gradient dénaturant (DGGE)	5 %	Non	+/-	Caractérisation par séquençage	Sorel, Clinical Chemistry 2005
Fusion Haute Résolution (HRM)	5 %	Non	+	Caractérisation par séquençage	Polakova, Leukemia Research 2008
Ciblées					
PCR et analyse des polymorphismes de longueur des fragments de restriction (PCR-RFLP)	2 à 5 %	Semi-quantitatif	+	Confirmer par séquençage	Roche-Lestienne, Blood 2002 Hayette, Leukemia Research 2005
PCR avec amorce spécifique d'allèle ou (ASO- ou ARMS-PCR)					
PCR point final	0,1 %	Non		Faux positifs	Roche-Lestienne, Blood 2002 Willis, Blood 2005
PCR-ligation	0,1-1 %	Oui		Faux positifs	Pelz-Ackerman, Leukemia 2008, Preumer, Leukemia 2008
PCR Quantitative en temps réel (RQ-PCR)	0,1-0,01 %	Oui		Faux positifs	Gruber, Leukemia 2005, Chomel, Leukemia Research 2009
PCR fluorescente et Clamp PNA (Peptide Nucleic Acid)	0,1 %	Oui	+	Faux positifs	Keuzer, Ann Hematol 2003
Autres					
Génotypage à haut débit par spectrométrie de masse (MALDI-TOF)	1,5-3 %	Semi-quantitatif	-	Faux positifs	Vivante, Leukemia 2007
RQ-PCR nanofluidique	0,01-0,001 %	Oui	-	Faux positifs	Oehler, Leukemia 2008
PCR colony-assay (Polony)	0,01 %	Oui	-	Faux positifs	Nardi, Oncogene 2008

EWALL Ph01 mené en France. Concernant la mutation T315I, il n'est pas conseillé de rechercher cette mutation par une technique sensible avant changement pour un ITK2 (ELN) car si elle est responsable de la résistance à l'ITK1, son taux doit être détectable par séquençage. Il pourrait cependant s'avérer intéressant, au sein d'un protocole thérapeutique défini, de vérifier la performance prédictive du test et de déterminer si la détection par technique ultrasensible de mutation T315I ultraminoritaire doit entraîner la non-prescription d'un ITK2.

L'intérêt le moins discuté des techniques sensibles semble être la détermination des cinétiques d'apparition (études rétrospectives après détermination de la mutation par les méthodes conventionnelles) ou de disparition (essais thérapeutiques de nouvelles drogues) des ARNm *BCR-ABL* mutés [31-33].

Concernant donc les techniques sensibles de détection et de dosages des ARNm *BCR-ABL* mutés, il peut être intéressant de les utiliser. Cependant, ces méthodologies doivent être réservées à l'étude de mutations particulières (notamment la mutation T315I), être fondées sur des techniques compatibles avec une analyse clinique fiable (adaptées de la RQ-PCR spécifique d'allèle), et être utilisées dans des circonstances bien déterminées (études cinétiques, protocoles thérapeutiques).

## Détection d'une variation nucléotidique et résistance

### Polymorphismes

Devant toute identification d'une variation nucléotidique non publiée, il convient (après avoir bien entendu éliminé une erreur potentielle de la Taq polymérase par une autre réaction de RT-PCR/séquençage) de vérifier qu'il ne s'agit pas d'un polymorphisme. Pour cela, il est nécessaire de vérifier sa présence sur l'allèle germlinal d'ABL. Même si la définition d'un polymorphisme correspond à une fréquence allélique d'au moins 1 % [34], toute présence confirmée d'une variation nucléotidique au niveau constitutionnel doit être considérée, dans le contexte de la résistance aux ITK, comme un polymorphisme. Les différents polymorphismes décrits à ce jour sont présentés dans le *tableau 5*. Si cette variation nucléotidique n'est pas constitutionnelle, il faut se référer aux analyses fonctionnelles *in vitro* qui permettent d'extrapoler sa capacité à induire une résistance *in vivo* [12, 35].

### Autres anomalies

Bien que la grande majorité des mutations observées chez les patients résistants soient des mutations ponctuelles qui induisent une substitution d'acide aminé, d'autres types de mutations ont été rapportés. La mutation L248V pourrait induire une résistance à l'imatinib par un double mécanisme, d'une part en conférant une résistance par elle-même, d'autre part en favorisant un épissage alternatif conduisant à la délétion des 81 premiers nucléotides de l'exon 4 d'ABL [38]. Un autre variant d'épissage induit par la mutation neutre 864A>C et conduisant à la délétion des 54 premiers nucléotides de

**Tableau 5**  
Principaux polymorphismes nucléotidiques (SNP)  
d'ABL1 (d'après [36, 37])

Acide aminé	Référence SNP	Fréquence allélique (%)
L140P	Rs1064152	
G159S	Rs1064153	
T240T	Rs2229069	0,1
K247R	Rs34549764	1
L248L		
E275E		
L298L	Rs1141212	
F311V		0,2
T315T		0,1
Y320C		0,1
L354L	Rs1141213	
L445R		
L445L		
E459K*	Rs2227985	
E499E	Rs2227985	8
S520T	Rs1064157	

\* Ce polymorphisme a également été retrouvé uniquement sur l'allèle réarrangé de certains patients résistants à l'imatinib.

l'exon 8 d'ABL a été rapporté [39]. Enfin, l'insertion d'une séquence de 35 nucléotides de l'intron 8 d'ABL, conduit à une interruption prématurée du cadre de lecture et donc à une protéine tronquée [40]. L'implication de ces variants d'épissage dans les mécanismes de résistance n'a pour l'instant pas été clairement établie.

## Valeur pronostique des mutations

Historiquement, plusieurs équipes ont démontré l'association de certaines mutations avec la progression de la maladie et la survie [25, 30, 42-44]. Ces données, analysées de manière rétrospective, concernaient principalement des patients traités par imatinib en phase chronique tardive ou en phase avancée. Les fréquences des mutations en fonction de la phase de la maladie sont exposées ci-dessous (*figure 3*).

Pour certains types de mutations touchant les aa Y253 et E255, cette valeur pronostique est en rapport direct avec une augmentation de l'oncogénicité des clones mutés *in vitro* [45]. Il est à noter, toujours *in vitro*, que les mutations touchant les aa M351 et H396 auraient un potentiel transformant plus faible que la protéine *BCR-ABL* native. De plus, les clones Ph1 T315I ne présenteraient pas une oncogénicité supérieure à celles des clones Ph1 non mutés [46]. Peu d'études ont encore évalué l'incidence des mutations dans les LMC en phase chronique précoce, de manière prospective, mais elle semble beaucoup plus faible (< 5 %) [47, 48]. De plus, la répartition relative des types de mutations identifiés semble différente [47], mais la valeur pronostique péjorative des mutations P-Loop et T315I doit toujours être considérée.

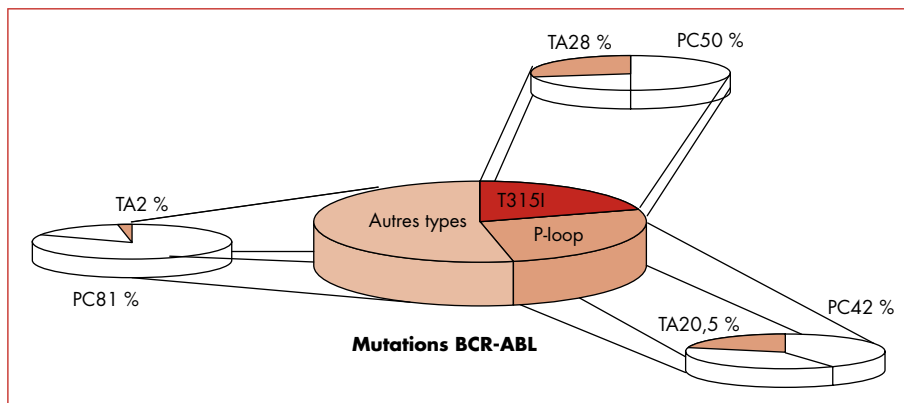


Figure 3. Fréquence des mutations en fonction de la phase de la maladie.

L'identification d'une mutation doit être interprétée en fonction du contexte hématologique et des résultats de cytogénétique (figure 4).

### Sensibilité *in vitro* des mutations aux différents ITK

Toutes les mutations n'ont pas la même signification biologique et la modélisation ou la reproduction de ces mutations *in vitro* conduit à des différences qui ne peuvent pas toujours expliquer la résistance clinique.

Il existe une variabilité de sensibilité *in vitro* des cellules mutées aux différents ITK qui tient compte des modifications structurales de la protéine cible induites par les mutations des acides aminés mais aussi de l'allostérie de l'inhibiteur lui-même.

Pour tester cette variabilité *in vitro*, le modèle le plus utilisé est celui des lignées cellulaires murines Baf/3 transfectées par le gène *BCR-ABL* humain et ses différents mutants [14]. Les concentrations croissantes d'ITK testées en culture permettent de définir des concentrations inhibitrices 50 (IC50) qui représentent la dose d'ITK capable d'inhiber la croissance de 50 % des cellules. Toutefois, il existe une importante variabilité dans la littérature en fonction des études. Ceci tient au fait que le temps exact d'exposition à l'ITK n'est, soit pas précisé, soit très différent d'une étude à l'autre (exposition cellulaire de 2 à 4 jours). Une technique alternative biochimique est parfois utilisée pour confirmer les données de culture cellulaire par analyse directe de l'inhibition enzymatique (test kinase) en présence de doses croissantes d'inhibiteurs [49]. Il convient de souligner qu'il s'agit de systèmes utiles mais qui ne reflètent pas forcément ce qui se passe dans la ou les cellule(s) souche(s) leucémique(s) du patient.

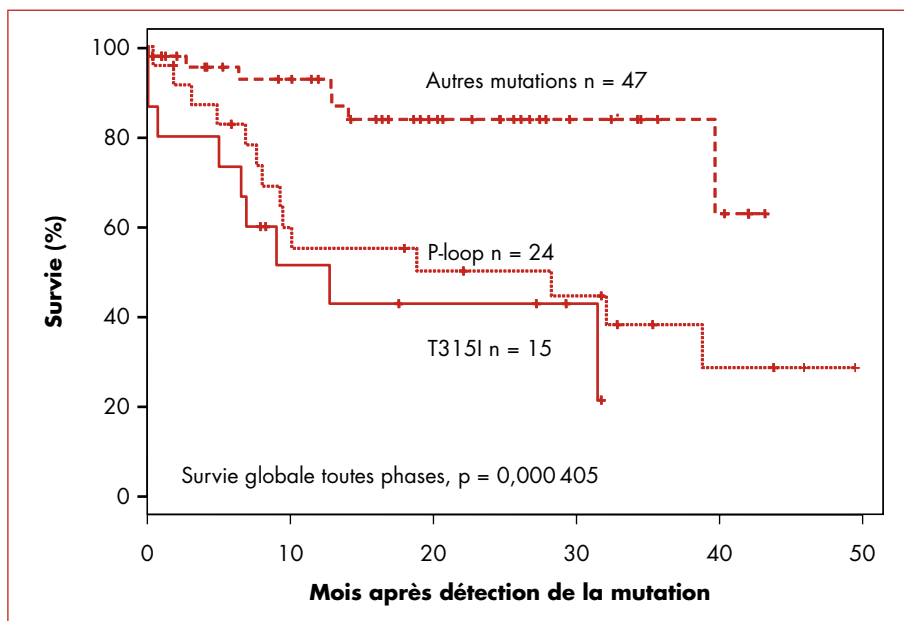


Figure 4. Survie globale en fonction du type de mutations.

Les données sont, cependant, bien corrélées avec les liaisons chimiques étroites qu'entretient l'inhibiteur avec sa cible et la géographie moléculaire des mutations. En effet, pour les mutations situées dans la boucle d'activation, les IC<sub>50</sub> vont de 0,35 à 3,91 (1 étant la référence de *BCR-ABL* wild type) illustrant un certain degré de résistance aux ITK assez homogène (tableau 6). Pour les mutations situées dans la boucle P, les valeurs d'IC<sub>50</sub> sont beaucoup plus variables et plus importantes, reflétant une résistance plus marquée aux différents inhibiteurs (tableau 6).

La mutation T315, appelée par certains Anglo-Saxons « *la mutation du diable* », présente les valeurs d'IC<sub>50</sub> les plus élevées pour les quatre inhibiteurs que sont l'imatinib, le nilotinib, le dasatinib ou le bosutinib (17,5 à 75) rendant compte de l'extrême difficulté à bloquer *in vitro* la prolifération de ce mutant. Cette mutation entraîne ainsi, une résistance complète à tous les ITK compétitifs de l'ATP. Ces données reflètent parfaitement l'expérience clinique accumulée avec ce type de mutant depuis la première description faite pour le groupe de Charles Sawyers [14].

## Critères de recherche de mutation

Les critères de recherche de mutation sous imatinib en première ligne sont applicables avec les ITK2.

## Au diagnostic

Concernant les LMC en phase chronique ou accélérée ou les transformations aiguës myéloblastiques (TAM), il n'est pas recommandé de rechercher une mutation dès le diagnostic, quelle que soit la technique utilisée. Il n'y a pas de corrélation entre les mutations détectées, quelles qu'elles soient, y compris T315I, et la réponse ultérieure à l'imatinib [27, Soverini, ASH 2008].

Pour les LAL ou pour les transformations aiguës lymphoblastiques (TAL) d'emblée, le séquençage bidirectionnel n'est pas recommandé [18]. Les techniques plus sensibles, si elles ne sont pas de règle en routine, peuvent, en revanche, être discutées dans le cadre de protocoles. Contrairement à la LMC, environ 40 % (17/42) des patients souffrant de LAL présentent une mutation au diagnostic, avant la mise sous ITK, à un faible niveau (détectée uniquement par des techniques très sensibles). La présence de ces mutations ne semble pas influencer la probabilité d'obtention de la réponse complète initiale. Néanmoins, elles sont associées à un risque plus important de rechute (en particulier pour la T315I). Dans 80 % des cas (9/11), la mutation initiale est retrouvée à la rechute.

## Résistances primaires

On regroupe ici les patients en échec et les réponses suboptimales. Même si la fréquence de mutations parmi cette popu-

**Tableau 6**  
IC<sub>50</sub> *in vitro* des ITK en fonction des mutants *BCR/ABL* (d'après [50])

		Coefficient de multiplication des IC <sub>50</sub> (non muté = 1)			
		Bosutinib	Imatinib	Dasatinib	Nilotinib
P-Loop	Parental	38,31	10,78	> 50	38,43
	Sauvage	1	1	1	1
	L248V	2,97	3,54	5,11	2,8
	G250E	4,31	6,86	4,45	4,56
	Q252H	0,81	1,39	3,05	2,64
	Y253F	0,96	3,58	1,58	3,23
	E255K	9,47	6,02	5,61	6,69
C-Helix	E255V	5,53	16,99	3,44	10,31
	D276G	0,60	2,18	1,44	2,00
	E279K	0,95	3,55	1,64	2,05
Région de fixation ATP (site de contact avec la drogue)	V299L	26,1	1,54	8,65	1,34
	T315I	45,42	17,50	75,03	39,41
	F317L	2,42	2,60	4,46	2,22
SH2-contact zone de fixation du substrat	M351T	0,70	1,76	0,88	0,44
	F359V	0,93	2,86	1,49	5,16
A-LOOP	L384M	0,47	1,28	2,21	2,33
	H396P	0,43	2,43	1,07	2,41
	H396R	0,81	3,91	1,63	3,10
	G398R	1,16	0,35	0,69	0,49
Lobe C Terminal	F486S	2,31	8,10	3,04	1,85
Sensible		≤ 2			
Résistant modéré		2,01-4			
Résistant		4,01-10			
Très résistant		> 10			

lation (imatinib première ligne) est très faible (< 10 %) [41], la recherche de mutation est préconisée, sauf chez les patients en RCC, sans RMM mais pour lesquels le rapport *BCR-ABL/ABL* reste stable autour de 1 % (IS).

### Résistances secondaires

Dans tous les cas de résistance secondaire (progression vers les phases avancées, perte de RH, de RCC, augmentation du transcrit *BCR-ABL*), il est recommandé d'effectuer une recherche de mutations, l'augmentation du transcrit se définissant par une augmentation de 0,5 log, soit une augmentation de 3,2 fois du rapport *BCR-ABL/ABL*, avec perte de la RMM.

Pour les rechutes moléculaires, si la recherche de mutation s'avère négative, une nouvelle recherche doit être réalisée à 3 mois, si le transcrit poursuit son ascension. Dans tous les cas, une recherche de mutation ne doit pas être recherchée si le rapport *BCR-ABL/ABL* est inférieur à 0,1 %.

### Suivi de la présence d'une mutation

Dans tous ces cas, la question se pose lorsqu'une mutation a été détectée et que le traitement a été modifié, de savoir s'il y a lieu de contrôler la présence de mutation. En cas d'obtention d'une RCC stable avec un rapport *BCR-ABL/ABL* < 1% IS stable, la réponse est négative. En revanche, il convient de contrôler la présence d'une mutation en cas de non RCC ou de résistance secondaire (cf. *infra*). Le contrôle se fera tous les 3 mois, un délai à réévaluer en fonction des événements hématologiques.

### Cas particulier de la mutation T315I

Il convient de rappeler qu'il s'agit d'une mutation qui survient de manière rare dans les phases chroniques traitées par imatinib en première ligne. Lorsqu'elle apparaît, il est possible d'effectuer une surveillance spécifique du transcrit portant cette mutation au sein des transcrits *BCR-ABL* totaux, avec des techniques développées dans quelques laboratoires. Un avis spécialisé pour la prise en charge thérapeutique de ces patients et pour la surveillance moléculaire est recommandé.

### Patients intolérants aux ITK

En l'absence de critères de résistance ou de réponse suboptimale associée, il n'y a pas lieu de rechercher une mutation de *BCR-ABL*.

Les patients, pour lesquels la dose optimale recommandée de l'ITK ne peut être délivrée du fait de l'apparition de cytopénies récurrentes et/ou prolongées, doivent faire l'objet d'une surveillance moléculaire rapprochée incluant la recherche de mutations.

## Recommandations

### Détection de la mutation

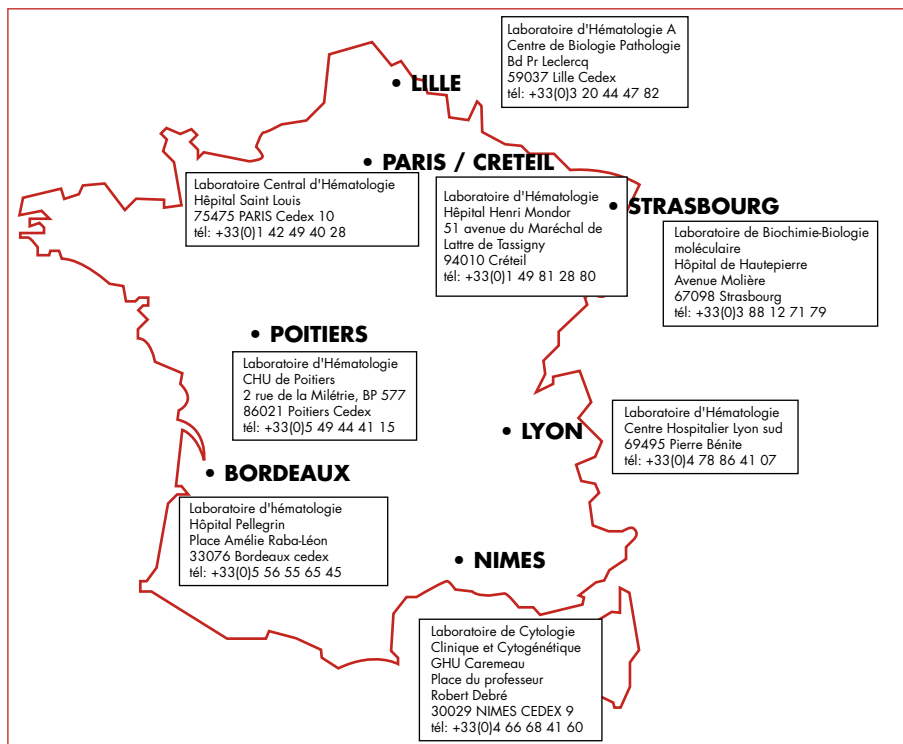
Les premières recommandations tendent à promouvoir une homogénéisation des rendus de résultats quant à la recherche d'une mutation. Les résultats sont à transmettre en données brutes ; à savoir nucléotides et acides aminés. Hors les cinétiques de suivi de la mutation T315I, il n'y a pas lieu d'indiquer une quantification. Il convient également de rappeler que, conformément aux recommandations de l'Afssaps et de l'INCa, toute identification de mutation justifie une réunion de concertation pluridisciplinaire régionale [51].

Durant les deux années du STIC consacré à l'accès aux analyses moléculaires prédictives de réponse aux inhibiteurs de tyrosine kinase en onco-hématologie, 1 796 analyses de séquençage ont été effectuées chez 1 126 patients, avec un pourcentage de 24 % de patients mutés, pourcentage très proche de celui rapporté dans la littérature. Actuellement, les données cliniques de 228 patients ont été récupérées et enregistrées dans une base de données commune. Par ailleurs, l'analyse médico-économique réalisée par le CRESGE (Centre de Recherches Économiques Sociologiques & Gestion) a estimé le coût d'une recherche de mutation *BCR-ABL* à 260 € et a démontré que cette recherche avait peu de répercussions sur le coût global de prise en charge d'une LMC, sans démontrer clairement son impact en terme de survie globale. À noter que l'étude a été réalisée sur l'ensemble de la population et non ciblée spécifiquement sur une population résistante, qui reste minoritaire du fait de l'efficacité remarquable de l'imatinib. Quoiqu'il en soit, et même si la fréquence des mutations doit diminuer dans les années à venir, étant donné le faible impact financier de ces analyses sur le coût global de traitement et l'impact fort en clinique de l'identification de certaines mutations, le groupe d'experts préconise de continuer à rechercher les mutations de *BCR-ABL* en s'appuyant sur les 8 laboratoires organisés en réseau ayant participé au STIC 2005 (figure 5).

### Prise en charge

Fort des éléments préalablement cités et de l'expérience clinique, en termes de stratégie thérapeutique, un premier consensus se dégage autour de la prise en charge des patients présentant une mutation T315I. Dès lors que celle-ci est détectable par la technique de séquençage bidirectionnel, il convient en premier lieu d'arrêter l'ITK, quel qu'il soit.

Dans un second temps, dans la mesure où le patient peut le supporter et s'il existe un donneur HLA compatible, la proposition d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques est raisonnable (ELN 2009). Les données de la littérature indiquent des résultats identiques, que le donneur soit HLA généo-identique ou phéno-identique (10/10). En revanche, les données sur les allogreffes alternatives, type conditionnement atténué, sang de cordon, etc., sont encore parcellaires.



**Figure 5.** Laboratoires participant au STIC 2005.

Ces stratégies thérapeutiques pour des patients encore jeunes doivent, pour l'instant, rester dans le cadre d'un travail SFGM-TC et/ou être évaluées au sein de protocoles.

En l'absence de donneur, des données intéressantes ont été montrées avec l'omacetaxine mepesuccinate (HHT). Quelques cas décrits ont rapporté une efficacité chez des patients mutés T315I, notamment dans le cadre de LMC en PC [52, 53]. Une hypothèse physiopathologique expliquerait la disparition éventuelle du clone muté sous HHT *via* les cellules quiescentes, parfois considérées comme réservoir du clone muté et sur lesquelles l'HHT exercerait une action ciblée [54].

Ces données intéressantes de l'HHT restent, néanmoins, à confirmer.

Toujours concernant les PC, l'interféron alpha doit également être une option à considérer [55].

Dans les autres situations, il convient d'envisager la possibilité de proposer au patient un essai de phase I ou II si une molécule en cours d'expérimentation est susceptible d'avoir un impact sur la T315I.

Aujourd'hui, de nombreuses questions restent en suspens quant à la stratégie thérapeutique liées à la prise en charge des patients présentant une mutation T315I et notamment dans le cadre d'une disparition du clone muté post-traitement. Est-il ainsi pertinent d'envisager la reprise d'un ITK s'il n'y a pas de RCyC ? Si oui, lequel, seul ou en combinaison ? Dans quelles conditions ? Après quel délai post-disparition de la mutation ? L'ensemble de ces questions res-

tant à explorer, la prise en charge des patients présentant un tel profil nécessite de se référer à un centre spécialisé.

Concernant les autres mutations, il semble pertinent de distinguer, en termes de prise en charge, les mutations selon leur sensibilité aux différents ITK.

Pour la mutation F317 (L ou V), le dasatinib n'est pas recommandé. En revanche, des données *in vitro* suggèrent une sensibilité équivalente des 3 autres inhibiteurs. La T315A est une mutation spécifique au dasatinib qui n'est donc pas recommandé. Toutefois, il n'existe que peu de données sur la sensibilité de cette mutation aux autres ITK. Autre mutation spécifique au dasatinib, la V299L (dasatinib non recommandé) pour laquelle des données *in vitro* suggèrent une sensibilité équivalente de l'imatinib et du nilotinib.

Le nilotinib n'est pas recommandé pour les mutations Y253F/H et F359V, sachant qu'*in vitro*, a été montrée une sensibilité équivalente du bosutinib et du dasatinib. Pour l'E255V, les données cliniques sont, pour l'instant, insuffisantes pour permettre des recommandations. Néanmoins, concernant cette mutation, il existe des données *in vitro* suggérant une faible sensibilité du nilotinib.

Pour toutes les autres mutations, dans l'état actuel des choses, les données *in vitro* confrontées aux données *in vivo* ne permettent pas d'orienter de façon suffisamment claire vers tel ou tel ITK. De plus, et ce quelle que soit la mutation, la stratégie thérapeutique doit prendre en compte non seulement le type de mutation, mais aussi le statut de la maladie, l'historique du patient, les comorbidités éventuelles, etc.

## Conclusion

La résistance clinique aux ITK répond à des critères de réponse qui ont fait l'objet d'un consensus international et qui viennent d'être actualisés. Les mécanismes de résistance sont multiples. Parmi ceux-ci, on compte les mutations du domaine TK. Ces mutations restent rares puisque la plupart des patients (60 à 95 % selon le stade de la maladie) répondent remarquablement bien aux ITK et que ce mécanisme ne correspond qu'à 30 % des patients résistants.

Elles ne sont pas toutes équivalentes aussi bien en termes de conséquences fonctionnelles et de profil de sensibilité *in vitro* aux différents ITK, que des phases de la maladie et des risques de progression auxquelles elles sont associées. Leur fréquence est amenée à diminuer du fait de la multiplication des thérapies ciblées pouvant être utilisées seules, voire en combinaison dans le futur.

Toutefois, à l'heure actuelle, leur recherche par séquençage double brin reste indispensable en cas de résistance du patient au traitement puisque certaines d'entre elles (les mutations hautement résistantes) peuvent indéniablement en être la cause de la résistance et qu'en fonction de la mutation identifiée, un certain nombre d'alternatives thérapeutiques sont d'ores et déjà disponibles, ce qui n'est pas sans conséquence sur le devenir clinique du patient.

Enfin, la multiplication des traitements aura certainement pour conséquence une diversification des mécanismes de résistance qu'il faudra s'attacher à décrypter dès leur apparition. Dans ce contexte, la cryopréservation des échantillons biologiques des patients, au diagnostic et pendant le traitement, est fondamentale. ■

**Remerciements.** Le groupe de travail remercie l'INCA pour son soutien au projet STIC2005 : cible moléculaire sensible aux inhibiteurs de tyrosine kinase en onco-hématologie, qui a permis d'obtenir des résultats importants justifiant la publication de ces recommandations.

## RÉFÉRENCES

1. Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M; on behalf of the European Leukemia Net. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet* 2007 ; 370 : 342-50.
2. O'Brien S, Guilhot F, Larson RA, *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.
3. Druker B, Guilhot F, O'Brien SG, *et al.* Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukaemia. *N Engl J Med* 2006 ; 355 : 2408-17.
4. Hochhaus A, O'Brien SG, Guilhot F, *et al.* Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2009 ; 23 : 1054-61.
5. Guilhot F, Druker B, Larson RA, *et al.* High rates of durable response are achieved with imatinib after treatment with interferon alfa plus cytarabine: results from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS) trial. *Hematologica* 2009, accepté pour publication.

6. Roy L, Guilhot J, Krahnke T, *et al.* Survival advantage from imatinib compared to the combination interferon- $\alpha$  plus cytarabine in chronic phase CML: historical comparison between two phase III trials. *Blood* 2006 ; 108 : 1478-84.
7. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, *et al.* Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2006 ; 108 : 1809-20.
8. Baccarani M. *CML educational session*. Berlin : EHA, 2009.
9. Druker B, Gathmann I, Botton AE, *et al.* Probability and impact of obtaining a cytogenetic response to Imatinib as initial therapy for chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Blood* 2003 ; 102 : 182a (Abstract n° 634).
10. Guilhot F. Sustained Durability of responses plus high rates of cytogenetic responses result in long-term benefit for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia (CML-CP) treated with imatinib (im) therapy: update from the IRIS study. *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts) 2004 ; 104 : (Abstract 21).
11. Larson RA, Druker BJ, Guilhot F, *et al.* Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia: a subanalysis of the IRIS study. *Blood* 2008 ; 111 : 4022-8.
12. Apperley JF. Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol* 2007 ; 8 : 1018-29.
13. Mahon FX, Deininger MW, Schulteis B, *et al.* Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood* 2000 ; 96 : 1070-9.
14. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, *et al.* Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 2001 ; 293 : 876-80.
15. Mahon FX, Hayette S, Lagarde V, *et al.* Evidence that resistance to nilotinib may be due to BCR-ABL, Pgp or Src kinase over expression. *Cancer Research* 2008 ; 68 : 9809-16.
16. Pocaly M, Lagarde V, Etienne G, *et al.* Overexpression of the heat-shock protein 70 is associated to imatinib resistance in chronic myeloid leukaemia. *Leukemia* 2007 ; 21 : 93-101.
17. Soverini S, Colarossi S, Gnani A, *et al.* Contribution of ABL kinase domain mutations to imatinib resistance in different subsets of Philadelphia-positive patients: by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res* 2006 ; 12 : 7374-9.
18. Pfeifer H, Wassmann B, Pavlova A, *et al.* Kinase domain mutations of BCR-ABL frequently precede imatinib-based therapy and give rise to relapse in patients with *de novo* Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ ALL). *Blood* 2007 ; 110 : 727-34.
19. Guilhot F, Mahon FX, Guilhot J, *et al.* Randomized comparison of imatinib versus imatinib combination therapies in newly diagnosed chronic myeloid leukaemia (CML) patients in chronic phase (CP): first results of the phase III (SPIRIT) trial from the French CML group (FI LMC). *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts) 2008 ; 112 : (Abstract 183).
20. Burgess MR, Skaggs BJ, Shah NP, Lee FY, Sawyers CL. Comparative analysis of two clinically active BCR-ABL kinase inhibitors reveals the role of conformation-specific binding in resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 ; 102 : 3395-400.
21. von Bubnoff N, Manley PW, Mestan J, Sanger J, Peschel C, Duyster J. BCR-ABL resistance screening predicts a limited spectrum of point mutations to be associated with clinical resistance to the Abl kinase inhibitor nilotinib (AMN107). *Blood* 2006 ; 108 : 1328-33.

22. Müller M, Cortes J, Kim DW, *et al.*, Dasatinib efficacy in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) and pre-existing BCR-ABL mutations. *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts) 2008 ; 112 : (Abstract 449).
23. Hochhaus A, Kim DW, Martinelli G, *et al.* Nilotinib efficacy according to baseline BCR-ABL mutations in patients with imatinib-resistant chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts) 2008 ; 112 : (Abstract 3216).
24. Soverini S. *CML educational session*. Berlin : EHA, 2009.
25. Nicolini FE, Corm S, Lê QH, *et al.* Mutation status and clinical outcome of 89 imatinib mesylate-resistant chronic myelogenous leukemia patients: a retrospective analysis from the French intergroup of CML (Fi(phi)-IMC GROUP). *Leukemia* 2006 ; 20 : 1061-6.
26. Nicolini FE, Mauro MJ, Martinelli G, *et al.* Epidemiology study on survival of chronic myeloid leukemia (CML) and Ph+ acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients with BCR-ABL T315I mutation. *Blood* 2009 (sous presse).
27. Lange T, Park B, Willis SG, Deininger MW. BCR-ABL kinase domain mutations in chronic myeloid leukemia: not quite enough to cause resistance to imatinib therapy? *Cell Cycle* 2005 ; 4 : 1761-6.
28. Khorashad JS, Anand M, Marin D, *et al.* The presence of a BCR-ABL mutant allele in CML does not always explain clinical resistance to imatinib. *Leukemia* 2006 ; 20 : 658-63.
29. Sherbenou DW, Wong MJ, Humayun A, *et al.* Mutations of the BCR-ABL kinase domain occur in a minority of patients with stable complete cytogenetic response to imatinib. *Leukemia* 2007 ; 21 : 489-93.
30. Branford S, Rudzki Z, Walsh S, *et al.* Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood* 2003 ; 102 : 276-83.
31. Gruber FX, Lamark T, Anonli A, *et al.* Selecting and deselecting imatinib-resistant clones: observations made by longitudinal, quantitative monitoring of mutated BCR-ABL. *Leukemia* 2005 ; 19 : 2159-65.
32. Khorashad JS, Milojkovic D, Mehta P, *et al.* *In vivo* kinetics of kinase domain mutations in CML patients treated with dasatinib after failing imatinib. *Blood* 2008 ; 111 : 2378-81.
33. Chomel JC, Sorel N, Bonnet ML, *et al.* Quantitative monitoring of the T315I mutation in patients with chronic myeloid leukemia (CML). *Leuk Res* 2009 ; 33 : 551-5.
34. Botstein D, Risch N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease. *Nat Genet* 2003 ; 33 (Suppl) : 228-37.
35. O'Hare T, Eide CA, Deininger MW. BCR-ABL kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2007 ; 110 : 2242-9.
36. Ernst T, Hoffmann J, Erben P, *et al.* ABL single nucleotide polymorphisms may masquerade as BCR-ABL mutations associated with resistance to tyrosine kinase inhibitors in patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2008 ; 93 : 1389-93.
37. Guidelines for mutation analysis for BCR-ABL kinase Domain. Julian Borrow, West Midlands regional genetics laboratory, December 2007.
38. Gruber FX, Hjorth-Hansen H, Mikkola I, Stenke L, Johansen T. A novel BCR-ABL splice isoform is associated with the L248V mutation in CML patients with acquired resistance to imatinib. *Leukemia* 2006 ; 20 : 2057-60.
39. Chen R, Potts S, Ma W, *et al.* Point mutation and alternative splicing in the ABL kinase domain as a mechanism for imatinib resistance. *Blood* (ASH Annual Meeting Abstracts) 2006 ; 108 : (Abstract 4814).
40. Chu SC, Tang JL, Li CC. Dasatinib in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 2006 ; 355 : 1062-3.
41. Étude STIC, données non publiées.
42. Shah NP, Nicoll JM, Nagar B, *et al.* Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2002 ; 2 : 117-25.
43. Soverini S, Martinelli G, Rosti G, *et al.* ABL mutations in late chronic phase chronic myeloid leukemia patients with up-front cytogenetic resistance to imatinib are associated with a greater likelihood of progression to blast crisis and shorter survival: a study by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : 4100-9.
44. Labussiere H, Hayette S, Nicolini FE. Analysis of the molecular determinants of the response of chronic myelogenous leukaemia to tyrosine kinase inhibitors. *Curr Pharmacogenomics* 2007 ; 5 : 201-13.
45. Skaggs BJ, Gorre ME, Ryvkin A, *et al.* Phosphorylation of the ATP-binding loop directs oncogenicity of drug-resistant BCR-ABL mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 ; 103 : 19466-71.
46. Griswold IJ, McPartlin M, Bumm T, *et al.* Kinase domain mutants of BCR-ABL exhibit altered transformation potency, kinase activity, and substrate utilization, irrespective of sensitivity to imatinib. *Mol Cell Biol* 2006 ; 26 : 6082-93.
47. de Lavallade H, Apperley JF, Khorashad JS, *et al.* Imatinib for newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia: incidence of sustained responses in an intention-to-treat analysis. *J Clin Oncol* 2008 ; 26 : 3358-63.
48. Étude Spirit 2009, données non publiées.
49. Corbin AS, Buchdunger E, Pascal F, Druker BJ. Analysis of the structural basis of specificity of inhibition of the ABL kinase by STI571. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 32214-9.
50. Redaelli S, Piazza R, Rostagno R, *et al.* Activity of bosutinib, dasatinib, and nilotinib against 18 imatinib-resistant BCR-ABL mutants. *J Clin Oncol* 2009 ; 27 : 469-71.
51. JO, juin 2007.
52. Legros L, Hayette S, Nicolini FE, *et al.* BCR-ABL(T315I) transcript disappearance in an imatinib-resistant CML patient treated with homoharringtonine: a new therapeutic challenge? *Leukemia* 2007 ; 21 : 2204-6.
53. Cortes J, Khoury HJ, Nicolini FE, *et al.* Subcutaneous omacetaxine mepesuccinate in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia (cml) patients (pts) with the t315i mutation – data from an ongoing phase 2/3 trial. *EHA* 2009 (Abstract 0476).
54. Allan E, Jorgensen HG, Michaels S, *et al.* Omacetaxine cytotoxic activity in chronic myeloid leukaemia stem cells, *EHA* 2009 (Abstract 1052)
55. de Lavallade H, Khorashad JS, Davis HP, *et al.* Interferon-alpha or homoharringtonine as salvage treatment for chronic myeloid leukemia patients who acquire the T315I BCR-ABL mutation. *Blood* 2007 ; 110 : 2779-80.