

Université de Poitiers
Faculté de Médecine et Pharmacie

ANNEE 2013

Thèse n°

MEMOIRE
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE
(décret du 23 janvier 2003)

et

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE
(décret du 16 janvier 2004)

présentée et soutenue publiquement
le 22 Octobre 2013 à Poitiers
par Monsieur Victor BAUNIN

La leucémie myéloïde chronique de l'enfant et de
l'adolescent :
réarrangements moléculaires *BCR-ABL1* au diagnostic

Composition du Jury

Président : Monsieur le Professeur François Guilhot-Gaudeffroy

Membres : Monsieur le Professeur Jean-Marc Gombert
Monsieur le Professeur Denis Sarrouilhe
Monsieur le Professeur Frédéric Millot
Monsieur le Docteur Jean-Claude Chomel

Directeur de thèse: Madame le Docteur Sabrina Bouyer



UNIVERSITE DE POITIERS

Faculté de Médecine et de Pharmacie



Le Doyen,

Année universitaire 2013 - 2014

LISTE DES ENSEIGNANTS DE MEDECINE

Professeurs des Universités-Praticiens Hospitaliers

1. AGIUS Gérard, bactériologie-virologie
2. ALLAL Joseph, thérapeutique
3. BATAILLE Benoît, neurochirurgie
4. BENSADOUN René-Jean, cancérologie - radiothérapie
5. BRIDOUX Frank, néphrologie
6. BURUCOA Christophe, bactériologie - virologie
7. CARRETIER Michel, chirurgie générale
8. CHEZE-LE REST Catherine, biophysique et médecine nucléaire
9. CHRISTIAENS Luc, cardiologie
10. CORBI Pierre, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
11. DAGREGORIO Guy, chirurgie plastique et reconstructrice
12. DEBAENE Bertrand, anesthésiologie réanimation
13. DEBIAIS Françoise, rhumatologie
14. DORE Bertrand, urologie (**surnombre**)
15. DROUOT Xavier, physiologie
16. DUFOUR Xavier, Oto-Rhino-Laryngologie
17. EUGENE Michel, physiologie (**surnombre**)
18. FAURE Jean-Pierre, anatomie
19. FRITEL Xavier, gynécologie-obstétrique
20. GAYET Louis-Etienne, chirurgie orthopédique et traumatologique
21. GICQUEL Ludovic, pédopsychiatrie
22. GILBERT Brigitte, génétique
23. GOMBERT Jean-Marc, immunologie
24. GOUJON Jean-Michel, anatomie et cytologie pathologiques
25. GUILHOT-GAUDEFFROY François, hématologie et transfusion
26. GUILLET Gérard, dermatologie
27. GUILLEVIN Rémy, radiologie et imagerie médicale
28. HADJADJ Samy, endocrinologie et maladies métaboliques
29. HAUET Thierry, biochimie et biologie moléculaire
30. HERPIN Daniel, cardiologie
31. HOUETO Jean-Luc, neurologie
32. INGRAND Pierre, biostatistiques, informatique médicale
33. IRANI Jacques, urologie
34. JABER Mohamed, cytologie et histologie
35. JAYLE Christophe, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
36. KARAYAN-TAPON Lucie, cancérologie
37. KEMOUN Gilles, médecine physique et réadaptation (**de septembre à décembre**)
38. KITZIS Alain, biologie cellulaire
39. KLOSSEK Jean-Michel, Oto-Rhino-Laryngologie
40. KRAIMPS Jean-Louis, chirurgie générale
41. LECRON Jean-Claude, biochimie et biologie moléculaire
42. LEVARD Guillaume, chirurgie infantile
43. LEVEZIEL Nicolas, ophtalmologie
44. LEVILLAIN Pierre, anatomie et cytologie pathologiques
45. MACCHI Laurent, hématologie
46. MARCELLI Daniel, pédopsychiatrie (**surnombre**)
47. MARECHAUD Richard, médecine interne
48. MAUCO Gérard, biochimie et biologie moléculaire
49. MENU Paul, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
50. MEURICE Jean-Claude, pneumologie
51. MIMOZ Olivier, anesthésiologie - réanimation
52. MORICHAU-BEAUCHANT Michel, hépato-gastro-entérologie
53. NEAU Jean-Philippe, neurologie
54. ORIOU Denis, pédiatrie
55. PACCALIN Marc, gériatrie
56. PAQUEREAU Joël, physiologie
57. PERAULT Marie-Christine, pharmacologie clinique
58. PERDRISOT Rémy, biophysique et médecine nucléaire
59. PIERRE Fabrice, gynécologie et obstétrique
60. POURRAT Olivier, médecine interne
61. PRIES Pierre, chirurgie orthopédique et traumatologique
62. RICCO Jean-Baptiste, chirurgie vasculaire
63. RICHER Jean-Pierre, anatomie
64. ROBERT René, réanimation
65. ROBLOT France, maladies infectieuses, maladies tropicales
66. ROBLOT Pascal, médecine interne
67. RODIER Marie-Hélène, parasitologie et mycologie
68. SENON Jean-Louis, psychiatrie d'adultes
69. SILVAIN Christine, hépato-gastro-entérologie
70. SOLAU-GERVAIS Elisabeth, rhumatologie
71. TASU Jean-Pierre, radiologie et imagerie médicale
72. TOUCHARD Guy, néphrologie
73. TOURANI Jean-Marc, cancérologie
74. WAGER Michel, neurochirurgie

Maîtres de Conférences des Universités-Praticiens Hospitaliers

1. ARIES Jacques, anesthésiologie - réanimation
2. BEBY-DEFAUX Agnès, bactériologie - virologie
3. BEN-BRIK Eric, médecine du travail
4. BOURMEYSTER Nicolas, biologie cellulaire
5. CASTEL Olivier, bactériologie - virologie - hygiène
6. CATEAU Estelle, parasitologie et mycologie
7. CREMNITER Julie, bactériologie - virologie
8. DAHYOT-FIZELIER Claire, anesthésiologie - réanimation
9. DIAZ Véronique, physiologie
10. FAVREAU Frédéric, biochimie et biologie moléculaire
11. FRASCA Denis, anesthésiologie - réanimation
12. HURET Jean-Loup, génétique
13. JAAFARI Nematollah, psychiatrie d'adultes
14. LAFAY Claire, pharmacologie clinique
15. MIGEOT Virginie, santé publique
16. ROY Lydia, hématologie
17. SAPANET Michel, médecine légale
18. SCHNEIDER Fabrice, chirurgie vasculaire
19. THILLE Arnaud, réanimation
20. TOUGERON David, hépato-gastro-entérologie

Professeur des universités de médecine générale

GOMES DA CUNHA José

Professeur associé des disciplines médicales

MILLOT Frédéric, pédiatrie, oncologie pédiatrique

Professeur associé de médecine générale

VALETTE Thierry

Maîtres de Conférences associés de médecine générale

BINDER Philippe
BIRAULT François
FRECHE Bernard
GIRARDEAU Stéphane
GRANDCOLIN Stéphanie
PARTHENAY Pascal
VICTOR-CHAPLET Valérie

Enseignants d'Anglais

DEBAIL Didier, professeur certifié
LILWALL Amy, maître de langues étrangères

Maître de conférences des disciplines pharmaceutiques enseignant en médecine

MAGNET Sophie, microbiologie, bactériologie

Professeurs émérites

1. DABAN Alain, oncologie radiothérapie
2. FAUCHERE Jean-Louis, bactériologie - virologie
3. GIL Roger, neurologie
4. MAGNIN Guillaume, gynécologie-obstétrique

Professeurs et Maîtres de Conférences honoraires

1. ALCALAY Michel, rhumatologie
2. BABIN Michèle, anatomie et cytologie pathologiques
3. BABIN Philippe, anatomie et cytologie pathologiques
4. BARBIER Jacques, chirurgie générale (ex émérite)
5. BARRIERE Michel, biochimie et biologie moléculaire
6. BECQ-GIRAUDON Bertrand, maladies infectieuses, maladies tropicales (ex émérite)
7. BEGON François, biophysique, Médecine nucléaire
8. BOINOT Catherine, hématologie - transfusion
9. BONToux Daniel, rhumatologie (ex émérite)
10. BURIN Pierre, histologie
11. CASTETS Monique, bactériologie - virologie - hygiène
12. CAVELLIER Jean-François, biophysique et médecine nucléaire
13. CHANSIGAUD Jean-Pierre, biologie du développement et de la reproduction
14. CLARAC Jean-Pierre, chirurgie orthopédique
15. DESMAREST Marie-Cécile, hématologie
16. DEMANGE Jean, cardiologie et maladies vasculaires
17. FONTANEL Jean-Pierre, Oto-Rhino Laryngologie (ex émérite)
18. GOMBERT Jacques, biochimie
19. GRIGNON Bernadette, bactériologie
20. JACQUEMIN Jean-Louis, parasitologie et mycologie médicale
21. KAMINA Pierre, anatomie (ex émérite)
22. LAPIERRE Françoise, neurochirurgie (ex émérite)
23. LARSEN Christian-Jacques, biochimie et biologie moléculaire
24. MAIN de BOISSIERE Alain, pédiatrie
25. MARILLAUD Albert, physiologie
26. MORIN Michel, radiologie, imagerie médicale
27. POINTREAU Philippe, biochimie
28. REISS Daniel, biochimie
29. RIDEAU Yves, anatomie
30. SULTAN Yvette, hématologie et transfusion
31. TALLINEAU Claude, biochimie et biologie moléculaire
32. TANZER Joseph, hématologie et transfusion (ex émérite)
33. VANDERMARCO Guy, radiologie et imagerie médicale



UNIVERSITE DE POITIERS

Faculté de Médecine et de Pharmacie



Année universitaire 2013-2014

PHARMACIE

Professeurs

- COUET William, pharmacie clinique PU-PH
- MARCHAND Sandrine, pharmacocinétique PU-PH
- FAUCONNEAU Bernard, toxicologie PR
- GUILLARD Jérôme, pharmacochimie PR
- IMBERT Christine, parasitologie PR
- JOUANNETAUD Marie-Paule, chimie thérapeutique PR
- LEVESQUE Joël, pharmacognosie PR
- OLIVIER Jean Christophe, galénique PR
- PAGE Guylène, biologie cellulaire PR
- RABOUAN Sylvie, chimie physique, chimie analytique PR
- SARROUILHE Denis, physiologie PR
- SEGUIN François, biophysique, biomathématiques PR

Maîtres de Conférences

- BARRA Anne, immunologie-hématologie MCU-PH
- DUPUIS Antoine, pharmacie clinique MCU-PH
- RAGOT Stéphanie, santé publique MCU-PH
- THEVENOT Sarah, hygiène et santé publique MCU-PH
- BARRIER Laurence, biochimie MCF
- BODET Charles, bactériologie MCF
- BON Delphine, biophysique MCF
- BRILLAULT Julien, pharmacocinétique, biopharmacie MCF
- CHARVET Caroline, physiologie MCF
- DEBORDE-DELAGE Marie, sciences physico-chimiques MCF
- DEJEAN Catherine, pharmacologie MCF
- DELAGE Jacques, biomathématiques, biophysique MCF
- FAVOT-LAFORGE Laure, biologie cellulaire et moléculaire MCF
- GIRARDOT Marion, biologie végétale et pharmacognosie, MCF

- GREGOIRE Nicolas, pharmacologie MCF
- HUSSAIN Didja, pharmacie galénique MCF
- INGRAND Sabrina, toxicologie MCF
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile pharmacochimie MCF
- PAIN Stéphanie, toxicologie MCF
- RIOUX BILAN Agnès, biochimie MCF
- TEWES Frédéric, chimie et pharmacochimie MCF
- THOREAU Vincent, biologie cellulaire MCF
- WAHL Anne, chimie analytique MCF

Maîtres de Conférences Associés - officine

- DELOFFRE Clément, pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, pharmacien

Professeur 2nd degré - anglais

- DEBAIL Didier

Maître de Langue - anglais

- LILWALL Amy

Remerciements

Monsieur le Professeur François GUILHOT-GAUDEFFROY,

C'est pour moi un grand honneur de vous avoir comme président de ce jury.

Veillez trouver ici le témoignage de mon profond respect.

Monsieur le Professeur Jean-Marc GOMBERT,

Vous me faites l'honneur d'accepter de juger cette thèse.

Soyez assuré de ma profonde estime.

Monsieur le Professeur Denis SARROUILHE,

Je suis très honoré de vous compter parmi les membres de ce jury.

Recevez l'expression de toute ma considération.

Monsieur le Docteur Frédéric MILLOT,

Je vous remercie de m'avoir confié et fait confiance pour ce travail.

Soyez assuré de mon profond respect.

Monsieur le Docteur Jean-Claude CHOMEL,

Je vous remercie de m'avoir guidé dans la réalisation de ce travail par vos compétences, votre rigueur mais surtout vos précieux conseils.

Veillez trouver ici le témoignage de ma sincère gratitude et de mon profond respect.

Madame le Docteur Sabrina BOUYER,

Je vous remercie de m'avoir fait confiance, de votre disponibilité, votre enthousiasme, le partage de vos connaissances et conseils avisés que ce soit pour ce travail comme pour les différents semestres que j'ai réalisé au laboratoire.

Veillez trouver ici le témoignage de ma sincère gratitude et de ma profonde estime.

A ceux qui ont contribué à ce travail,

A Madame Joëlle GUILHOT-GAUDEFFROY,

Je vous remercie pour votre aide précieuse dans la réalisation de ce travail, votre patience et vos explications dans ce domaine tant compliqué des statistiques.

A Madame Sophie ZIN-KA-IEU,

Je vous remercie d'avoir pu consacrer de votre temps pour me permettre de récupérer les données nécessaires à la réalisation de ce travail.

A ceux qui ont contribué à ma formation,

A Frédéric DOS SANTOS,

Pour m'avoir beaucoup appris en cytologie et en qualité. Merci pour ta gentillesse, ta disponibilité, le partage de tes connaissances et tes conseils.

A Catherine BOINOT, Jérôme DUCHEMIN et Maryse GUICHETEAU

Pour m'avoir formé en hémostase et pour votre sympathie.

Aux technicien(ne)s du laboratoire d'hématologie de Poitiers,

Pour votre expérience et votre motivation dans vos activités de tous les jours, ce fut agréable de travailler avec vous.

A l'ensemble du laboratoire de La Rochelle,

Merci de m'avoir fait confiance pour la suite de ma vie professionnelle, pour votre gentillesse, votre bonne humeur et votre professionnalisme.

A mes parents et mon frère,

Merci d'avoir toujours été présents pour moi, pour m'avoir donné le bon exemple et m'avoir toujours guidé dans les décisions que j'ai eu à prendre au cours de ma vie, je n'en serais certainement pas là sans vous. J'espère que vous serez toujours fiers de moi.

Au reste de ma famille, à mes grands-parents, oncles et tantes, cousins et cousines,

A Marion,

Pour m'avoir supporté durant cette période difficile et pour tout ce qu'il nous attend dans notre future vie rochelaise.

A mes co-internes de Poitiers et La Rochelle,

Nathan, Thom, Guillaume et Gouliche, AnneSo, Sam, Clément, Vincent, Manu, Astrid, Anthony, pour tous ces bons moments passés aux labos et en dehors (Poitiers « by night »). De véritables belles rencontres...
Julien pour 6 derniers mois en tête à tête à LR, bon vent à Angers.

A mes amis toulousains, pictaviens, rochelais et autres,

Baptiston et Laura, Simon et Mélanie, Thib et Popo, Le Pat, Riflon, Paillasse, Yannick, FX, Paul, Quentin, Drals, La Mike, Ben P, Antoine, Christophe, Amandine et Jérémy, Juju, Bruno, Marie...pour toutes ces merveilleuses années fac, il y aurait tellement de choses à raconter... Fabien, les Mikas, Emilie, Mathilde, Jeannot et Claire... vous me faites tous trop délirer.
Caro, tu auras toujours une place spéciale.
La Ranguel All Stars, Julien, Flo, Samy, Mat, Romain, Fouad, Alex, Yo Po, Yo Garres, Clem, Guillaume, Nabil, Tom, Vincent, Jaco, Brice, Coach, Road to Medigames...

A tous ceux que j'ai oublié, la liste est sûrement longue, mais qui ont à un moment donné partagé ma vie.

Liste des abréviations

ABL : Abelson
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ATP : Adénosine triphosphate
BCR : *Breakpoint cluster region*
CHU : Centre hospitalo-universitaire
CML : Chronic myeloid leukemia
CSH : Cellules souches hématopoïétiques
Ct : *Cycle threshold*
DS : Déviation standard
EAC : *European against cancer*
ELN : *European leukemia net*
FISH : Fluorescence *in situ* hybridation
GH : *Growth hormone*
GVH : *Graft versus host*
GVL : *Graft versus leukemia*
HSP : *Heat shock protein*
IFN : Interféron
IGF : *Insulin-like growth factor*
ITK : Inhibiteurs de tyrosine kinase
JAK : *Janus kinase*
Kb : kilobase
kDa : kiloDalton
LAL : Leucémie aigue lymphoblastique
LAM : Leucémie aigue myéloblastique
LMC : Leucémie myéloïde chronique
LMMC : Leucémie myélo-monocytaire chronique
MDR : *Multi-drug resistance*
NES : Séquence d'exportation nucléaire
NLS : Séquence de localisation nucléaire
PCR : *Polymerase chain reaction*

PDGFR : *Platelet-derived growth factor receptor*
PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase
RC : Réponse cytogénétique
RCC : Réponse cytogénétique complète
RCM : Réponse cytogénétique majeure
RHC : Réponse hématologique complète
RMC : Réponse moléculaire complète
RMM : Réponse moléculaire majeure
RQ-PCR : *Real time quantification polymerase chain reaction*
RT-PCR : *Real time polymerase chain reaction*
SH : *Src homology*
SMP : Syndrome myélo-prolifératif
SNP : *Small nucleotide polymorphism*
SnRNP : *Small nuclear ribonucleoproteins*
STAT : *Signal transducer and activator of transcription*
Taq : *Thermus aquaticus*
WHO : *World Health Organization*

Table des matières

Introduction	12
La Leucémie myéloïde chronique de l'enfant et de l'adolescent : étude bibliographique.....	15
I. Généralités sur la LMC.....	16
1. Historique	16
2. Physiopathologie de la LMC	17
2.1. Le chromosome Philadelphie.....	17
2.2. Les réarrangements moléculaires <i>BCR-ABL1</i>	18
2.2.1. Le gène ABL.....	18
2.2.2. Le gène BCR.....	19
2.2.3. Le gène chimérique BCR-ABL1.....	20
2.3. Mécanismes d'expression des ARN messagers <i>BCR-ABL1</i>	22
2.3.1. Epissage des ARN pré-messagers.....	22
2.3.2. Epissage alternatif des ARN pré-messagers	24
2.3.3. Epissage normal de l'ARN pré-messager BCR	25
2.3.4. Co-expression de b2a2 et b3a2	27
2.4. La protéine de fusion p210 ^{<i>BCR-ABL1</i>}	29
2.4.1. Structure.....	29
2.4.2. Pouvoir oncogène de BCR-ABL.....	30
2.4.2.1. Altération de l'adhésion cellulaire	31
2.4.2.2. Activation de voies de signalisation cellulaire et inhibition de l'apoptose	31
2.4.2.3. Dégradation des protéines inhibitrices	33
2.4.2.4. Instabilité génétique	33
3. Techniques de biologie moléculaire dans la LMC	34
3.1. Technique qualitative de détection des réarrangements <i>BCR-ABL1</i>	34
3.1.1. Généralités	34
3.1.2. La RT-PCR multiplex	35
3.1.2.1. Description	35
3.1.2.2. Choix des amorces	35
3.1.2.3. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	36
3.2. Technique quantitative de diagnostic et de suivi moléculaire : la PCR en temps réel	36
3.2.1. Description	37
3.2.2. Interprétation des résultats	37
4. Traitement de la LMC	40
4.1. ITK de première génération : l'Imatinib mésylate (Glivec®)	41
4.1.1. Mécanisme d'action	41
4.1.2. Effets indésirables de l'Imatinib	42
4.1.3. Echecs thérapeutiques sous Imatinib	42
4.1.3.1. Résistances liées au médicament lui-même	43
4.1.3.2. Résistances liées à une modification de la cible	43
4.1.3.3. Résistances liées à la cellule leucémique	45
4.2. Les ITK de deuxième génération.....	45
4.2.1. Le Dasatinib	45
4.2.2. Le Nilotinib.....	45
4.3. Les ITK de troisième génération	45
4.4. Définition des réponses au traitement.....	46
4.5. Critères de suivi et de réponse au traitement	47

II. La LMC de l'enfant et de l'adolescent.....	49
1. Généralités	49
2. Epidémiologie.....	50
3. Présentation de la maladie	50
4. Caryotype.....	53
5. Biologie moléculaire.....	53
5.1. Epidémiologie des principaux réarrangements moléculaires de <i>BCR-ABL1</i> chez l'enfant.....	53
5.2. Autres types de réarrangements moléculaires détectés chez l'enfant.....	54
5.3. Corrélation entre le type de réarrangement moléculaire et les signes présents au diagnostic	55
5.3.1. Le sexe	55
5.3.2 Les signes cliniques	56
5.3.3 Les signes biologiques	56
5.3.3.1. Paramètres pour lesquels une corrélation a été mise en évidence.....	56
5.3.3.2. Paramètres pour lesquels aucune corrélation n'a été mise en évidence	57
5.3.4. La réponse moléculaire au traitement	57
6. Pronostic	59
6.1. Evolution naturelle.....	59
6.2. Facteurs pronostiques	60
7. Traitement.....	61
7.1. L'interféron alpha (IFN α).....	61
7.2. Allogreffe de CSH	62
7.3. Les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK)	63
7.3.1. Evaluation de l'efficacité de l'Imatinib chez l'enfant et l'adolescent	63
7.3.2. Effets indésirables spécifiques à l'enfant.....	64
7.3.3. Evaluation de l'efficacité du Dasatinib chez l'enfant et l'adolescent.....	64
7.3.4. Evaluation de l'efficacité du Nilotinib chez l'enfant et l'adolescent.....	65
 Réarrangements moléculaires <i>BCR-ABL1</i> au diagnostic dans une cohorte pédiatrique française : étude personnelle.....	66
I. Objectifs.....	67
II. Méthodologie	69
1. Description de l'étude.....	69
2. Recueil des données.....	69
3. Analyses statistiques.....	71
3.1. Analyse descriptive : présentation initiale	71
3.2. Analyses comparatives : comparaisons des paramètres étudiés à l'inclusion selon le type de réarrangement	71
III. Résultats	72
1. Les centres participant à l'étude et le type de technique utilisé	72
1.1. Méthodes utilisées par les différents laboratoires.....	72
1.2. Les méthodes de RT-PCR multiplex de référence.....	74
1.3. Détection d'un « double transcrit » b2a2 + b3a2.....	75
2. Présentation initiale de la population.....	77
2.1. Population générale (113 patients)	77
2.2. Patients en phase chronique (109 patients).....	79
2.2.1. Caractéristiques de tous les patients.....	79
2.2.2. Caractéristiques des patients selon le réarrangement <i>BCR-ABL1</i>	83
3. Comparaisons des paramètres étudiés à l'inclusion selon le type de réarrangement	84
3.1. Analyses comparatives qualitatives	85
3.2. Analyses comparatives quantitatives	85
III. Discussion	87
 Conclusion.....	94

Introduction

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une hémopathie maligne du groupe des néoplasies myéloprolifératives ou syndromes myéloprolifératifs. Il s'agit d'une prolifération monoclonale affectant la cellule souche pluripotente hématopoïétique, prédominant sur la lignée granuleuse. La découverte du chromosome Philadelphie issu de la translocation réciproque entre le chromosome 9 et le chromosome 22 (Nowell et Hungerford, 1960) ainsi que de son corollaire moléculaire, le gène chimérique *BCR-ABL1* (Rowley, 1973), a été le point de départ d'une compréhension globale de la LMC. Depuis, grâce aux techniques de biologie moléculaire, de nombreux réarrangements moléculaires *BCR-ABL1* ont été décrits. Les plus fréquemment décrits sont les ARN messagers de type b2a2 (e13a2) et b3a2 (e14a2), certains patients pouvant co-exprimer les deux à la fois. Ces réarrangements aboutissent à une protéine de fusion, nommée p210^{*BCR-ABL1*}, directement à l'origine de la maladie.

De nombreuses recherches ont été et sont toujours effectuées sur cette pathologie car elle représente environ 7 à 20 % des leucémies et constitue un modèle simple de leucémogénèse. Elle touche entre 1 à 2 personnes pour 100000 dans le monde. Il s'agit principalement d'une pathologie du sujet adulte, avec un pic diagnostique entre 40 et 60 ans, son incidence augmentant ensuite avec l'âge. Toutefois, la LMC peut également survenir, de manière plus rare, chez l'enfant.

Des disparités de répartition des principaux réarrangements moléculaires *BCR-ABL1* ont été rapportées dans les différentes séries publiées tant sur le sujet adulte que sur l'enfant et l'adolescent. En effet, dans la LMC, la prédominance de l'expression de l'un des deux réarrangements principaux (b2a2 ou b3a2), ainsi que la proportion de patients qui expriment ces deux réarrangements simultanément sont très variables selon les études. A l'heure actuelle, ces différences de répartition sont toujours soumises à de nombreuses interrogations. De nombreux facteurs ont été incriminés pour tenter de les expliquer.

Dans notre étude, nous analyserons la répartition des différents réarrangements moléculaires au diagnostic, au sein d'une cohorte française de 134 enfants et adolescents atteints de LMC. La fréquence des réarrangements *BCR-ABL1* b2a2, b3a2 et b2a2 + b3a2 sera ainsi déterminée. Les technologies de détection des ARNm chimériques *BCR-ABL* utilisées par les différents laboratoires seront discutées. Nous discuterons également des mécanismes moléculaires susceptibles d'aboutir à une co-expression de b2a2 et b3a2. Enfin, nous essaierons de déterminer les relations potentielles entre le type de réarrangement moléculaire

et les caractéristiques cliniques et biologiques observées au diagnostic de patients de la cohorte.

La Leucémie myéloïde
chronique de l'enfant et de
l'adolescent : étude
bibliographique

I. Généralités sur la LMC

1. Historique

Les premières descriptions de cas de leucémie myéloïde chronique (LMC), par A. Donné tout d'abord puis J.H. Benett et R. Virchow, remontent aux années 1840. En étudiant des patients décédés, ils constatent un lien entre les signes cliniques, la splénomégalie et l'hépatomégalie, et le sang qu'ils qualifient de « suppurant » ou même de « sang blanc » (Piller 2001). Le premier cas de diagnostic chez un patient vivant sera décrit en 1846 par Fuller et le terme de « *leucocythaemia* » proposé en 1848. En 1870, Neumann affirme que les cellules responsables de cette pathologie sont issues de la moelle osseuse (Tefferi 2008).

La première classification des leucémies myéloïdes et lymphoïdes voit le jour en 1851 grâce à P. Erlich (Geary 2000). Ce n'est qu'en 1951 que le concept de syndrome myéloprolifératif (SMP) est développé pour la première fois par W. Dameshek incluant la LMC, la polyglobulie de Vaquez, la thrombocytémie essentielle et la myélofibrose primitive (Dameshek 1970).

En 1960, le premier marqueur chromosomique corrélé à une pathologie néoplasique est découvert par Nowell et Hungerford dans des cultures cellulaires de patients atteints de LMC (Nowell 1960). Ce chromosome minute acrocentrique sera baptisé « chromosome Philadelphie » en référence au lieu de sa découverte. En 1973, J. Rowley découvre la translocation réciproque et équilibrée entre le bras long du chromosome 9 et le bras long du chromosome 22, la $t(9;22)(q34;q11)$ grâce à une technique de fluorescence à la quinacrine et la mise en évidence de bandes sur les chromosomes via la coloration au Giemsa. Le chromosome 22 raccourci obtenu à l'issue de cette translocation correspond au chromosome Philadelphie (Rowley 1973).

Avec l'avènement des techniques moléculaires, le proto-oncogène *ABL1* présent au niveau de la cassure sur le chromosome 9 est identifié en 1982 (De Klein 1982). La zone de cassure sur le chromosome 22 est, quant à elle, identifiée en 1984 comme faisant partie du gène *BCR* (Groffen 1984). L'ARN messager chimérique, appelé *BCR-ABL1*, issu du chromosome Philadelphie est mis en évidence peu de temps après (Shtivelman 1985). Il est

traduit en une protéine de fusion de 210 kDa baptisée p210^{BCR-ABL1} ou protéine de fusion BCR-ABL. Cette protéine est directement impliquée dans la physiopathologie de la LMC.

Les premiers essais cliniques utilisant un inhibiteur de tyrosine kinase ou ITK, (Imatinib Mésylate ou Glivec®) dans le traitement de la LMC en phase chronique ont été réalisés dès 1996, par l'équipe de Druker (Druker 1996). Les résultats obtenus ont dès lors révolutionnés le pronostic dans cette pathologie. Le pronostic et surtout la survie globale ont été améliorés de manière spectaculaire (survie globale voisine de 90% à 5 ans), par rapport aux traitements de référence (interféron-alpha plus aracytine). Cependant, des phénomènes d'intolérance ou de résistance à l'Imatinib ont été observés chez un pourcentage significatif de patients (10-20%). La résistance à l'Imatinib est due à de nombreuses causes, l'apparition de mutations affectant le domaine tyrosine kinase de la protéine BCR-ABL étant la plus étudiée. Des ITK de deuxième (Dasatinib, Nilotinib, Bosutinib) et de troisième génération (Ponatinib) ont par la suite été développés, permettant de traiter les patients résistants ou intolérants à l'Imatinib.

2. Physiopathologie de la LMC

2.1. Le chromosome Philadelphie

Le chromosome Philadelphie est retrouvé dans plus de 95% des cas de LMC. Il est issu de la translocation réciproque entre le bras long du chromosome 9 en position q34 et le bras long du chromosome 22 en position q11 (Figure 1). Le gène chimérique *BCR-ABL1* qui en résulte (chromosome 22q-) correspond donc à l'addition de la partie 5' du gène *BCR* à un segment 3' du gène *ABL1* (Faderl 1999). Du fait que la translocation est réciproque, le chromosome 9q+ est porteur du gène réciproque *ABL-BCR*. A noter que tous ces événements se déroulent au sein de la cellule souche hématopoïétique (Wong 2004).

On met en évidence le chromosome Philadelphie également chez 5% des enfants et 15 à 30% des adultes atteints de leucémie aiguë lymphoïde (LAL) et chez 2% des patients atteints de leucémie aiguë myéloïde (LAM) nouvellement diagnostiqués (Quintás-Cardama 2009). Cependant, les points de cassure sur les gènes impliqués ne sont pas identiques à ceux décrits classiquement dans la LMC.

Il est possible de retrouver des anomalies chromosomiques supplémentaires dans le caryotype des patients en fonction du stade d'avancement de la maladie. Les plus fréquentes sont la trisomie 8 (33%), un chromosome Philadelphie additionnel (30%), un isochromosome 17 (20%), une trisomie 19 (12%), la perte du chromosome Y (8% des patients masculins), une trisomie 21 (7%) et une monosomie 7 (5%) (Johansson 2002).

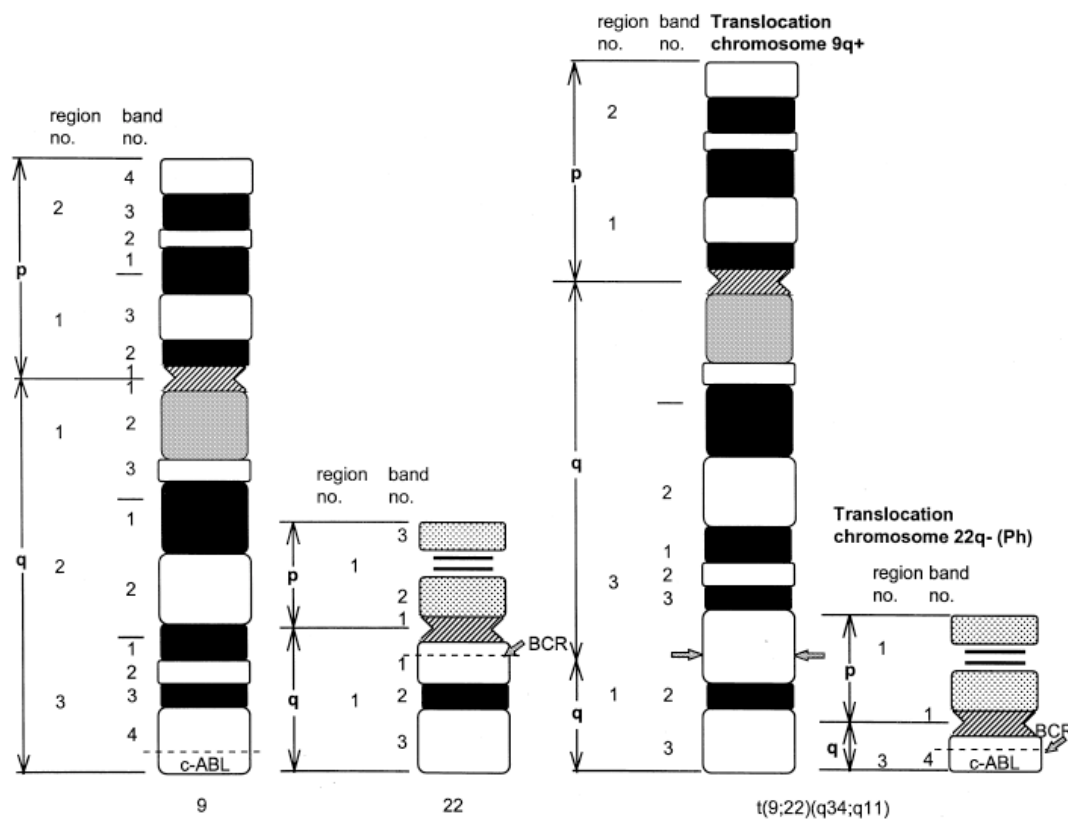


Figure 1 : Le chromosome Philadelphie (Pasternak 1998).

2.2. Les réarrangements moléculaires *BCR-ABL1*

2.2.1. Le gène *ABL*

Le gène *ABL1* est un oncogène, homologue humain du gène *v-abl* identifié chez le virus leucémogène murin d'Abelson (Heisterkamp 1983). Il s'étend sur 230 kb, est composé de 11 exons (Figure 2) et comprend un site alternatif d'initiation de la transcription entre les exons 1a et 1b, séparés de 175 kb (Shtivelman 1986). Le gène *ABL1* peut ainsi être transcrit en deux ARN messagers différents et la protéine ABL est donc présente sous deux isoformes qui ne diffèrent que par leur extrémité N-terminale. La forme 1b peut être myristoylée sur un

résidu glycine et se fixer à la membrane cellulaire, contrairement à la forme 1a (Ben-Neriah 1986).

Les cassures du gène *ABL1* (au sein du réarrangement *BCR-ABL*) surviennent au niveau d'une région variable de 300 kb :

- en amont de l'exon 1b,
- en aval de l'exon 1a,
- ou entre ces deux exons alternatifs, cas le plus fréquent.

Il peut exister une variabilité de participation des exons 1a et 1b dans la formation du gène hybride *BCR-ABL1*. Cependant, lors de la transcription, l'exon 1 d'*ABL1* est excisé et l'ARN messager chimérique sera le même, l'exon a2 du gène *ABL1* s'accolant au segment 5' du gène *BCR* (Lichty 2000).

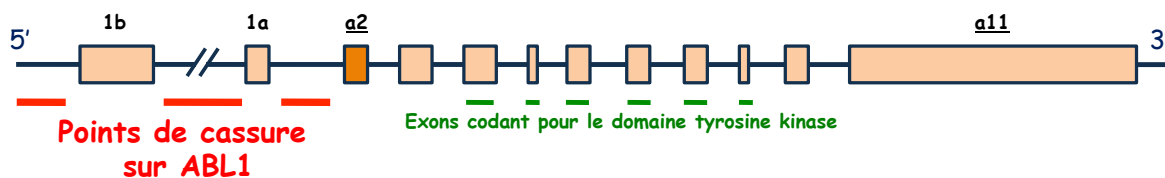


Figure 2 : Le gène *ABL*.

2.2.2. Le gène *BCR*

Le gène *BCR* est localisé sur le bras long du chromosome 22 au niveau de la bande q11. Il s'étend sur une région de 134 kb et possède 25 exons dont deux exons alternatifs, e1' et e2' (Melo 1996). Les zones de cassures sont bien définies et sont au nombre de quatre (Figure 3).

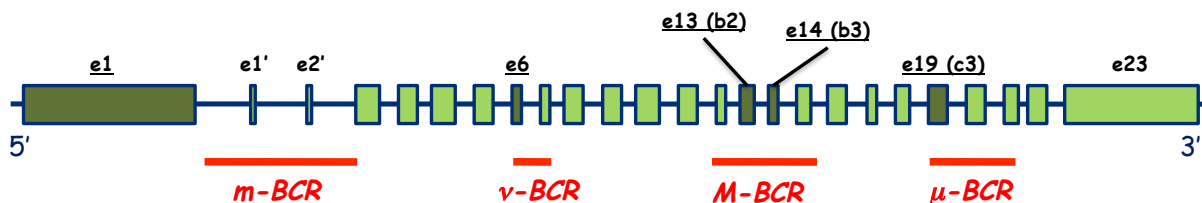


Figure 3 : Le gène *BCR*.

La région M-*BCR* (Major-Breakpoint Cluster Region) qui s'étend des exons e12 à e16 (aussi appelé b1 à b5) représente une région de 5,8 kb. Il s'agit du site de cassure privilégié dans la LMC typique (95% des patients), il est aussi impliqué chez environ un tiers des patients atteints de LAL B à chromosome Philadelphie.

La région m-*BCR*, de 54 kb, est située entre les exons e1' et e2'. Cette cassure est retrouvée chez les 2/3 restants des patients atteints de LAL B à chromosome Philadelphie, elle n'est que très rarement impliquée dans la LMC.

La région μ -*BCR* est située dans l'intron 19. Ce point de cassure est essentiellement retrouvé dans un type rare de syndrome myéloprolifératif, la leucémie myéloïde chronique à neutrophiles.

La région v-*BCR* est située dans l'exon 6. Cette zone de cassure ne semble être impliquée que dans des cas exceptionnels de LMC avec réarrangement moléculaire atypique.

2.2.3. Le gène chimérique *BCR-ABL1*

Le gène *BCR-ABL* est issu de l'addition du segment 5' du gène *BCR* et du segment 3' du gène *ABL1* (en réalité la plus grande partie d'*ABL* à l'exception de l'exon 1). Il est transcrit en ARN messager chimérique *BCR-ABL1*. En fonction du point de cassure sur le gène *BCR* notamment, différents ARN messagers chimériques et donc différentes protéines de fusion *BCR-ABL* vont être traduites (Figure 4).

Ainsi, classiquement dans la LMC, le point de cassure se situe dans la région M-*BCR* et on peut observer deux types d'ARN messagers *BCR-ABL1* de type e13a2 (ou b2a2) et e14a2 (ou b3a2) en fonction du point de cassure de l'extrémité 3' de *BCR* qui vient s'accoler avec l'exon 2 de *ABL*. Ces deux ARN messagers sont traduits en une protéine de fusion identique de 210 kDa, la p210^{*BCR-ABL1*}.

Lorsque le point de cassure se situe dans la zone m-*BCR*, l'ARN messager *BCR-ABL1* (e1a2) code pour une protéine de fusion de poids moléculaire différent, 190 kDa (dans 2/3 des LAL à chromosome Philadelphie).

Dans la leucémie myéloïde chronique à neutrophiles, la zone de cassure a lieu dans l'intron 19 de *BCR*, l'ARN messager obtenu (e19a2) sera traduit en une protéine de fusion de 230 kDa (Deininger 2000).

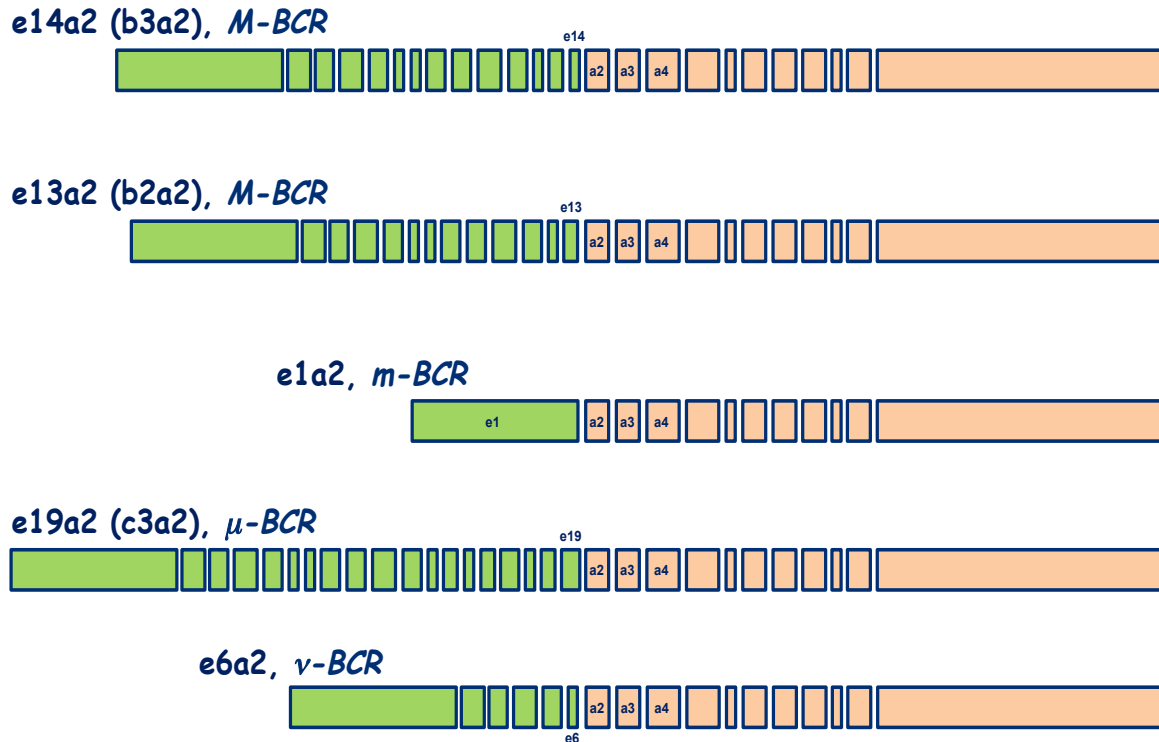


Figure 4 : Les différents gènes chimériques *BCR-ABL1*.

D'autres ARN messagers ont également été décrits, comme e13a3 (ou b2a3) (Liu 2003), e14a3 (ou b3a3) (Jinawath 2009), e1a3 (Al-Ali 2002), e15a2 (Del Pilar Moreno 2001), e8a2 (Park 2008), e6a2 (Hochhaus 1996) ou e2a2 (Leibundgut 1999). Mais il s'agit principalement de cas isolés chez des patients atteints de LAL ou de LMC, ces réarrangements moléculaires étant qualifiés d' « atypiques ».

Dans la LMC, on retrouve parfois une co-expression de deux réarrangements moléculaires. Cette notion de co-expression de deux ARN messagers chimériques a été retrouvée aussi bien chez le sujet adulte que chez le sujet enfant ou adolescent. Elle concerne notamment l'expression simultanée des réarrangements b2a2 et b3a2, mais il a été décrit de rares cas de co-expression e1a2 et b3a2.

2.3. Mécanismes d'expression des ARN messagers *BCR-ABL1*

2.3.1. Epissage des ARN pré-messagers

L'épissage des ARN pré-messagers constitue une étape obligatoire pour la très grande majorité des transcrits primaires chez les eucaryotes. Il concerne au moins 95% des transcrits et constitue un préalable à l'exportation des messagers matures dans le cytoplasme, siège de la synthèse protéique. Il s'effectue de manière coordonnée avec la transcription et se déroule en deux étapes successives impliquant deux réactions de trans-estérification. L'objectif de ce mécanisme est l'élimination des introns pour fabriquer des ARN messagers matures qui pourront être traduits en protéines.

Quatre déterminants de séquence sont requis (Figure 5) :

- le site d'épissage 5' (site donneur), constitué de la séquence GU et qui correspond à la jonction exon/intron
- le site de branchement, riche en bases pyrimidiques, contient un A invariant généralement situé à une distance comprise entre 18 et 40 nucléotides en amont du site accepteur
- une suite de bases pyrimidiques (pyrimidine track) entre le site de branchement et le site accepteur
- et le site d'épissage 3' (site accepteur), constitué de la séquence AG souvent précédée d'un C qui correspond à la charnière intron/exon.

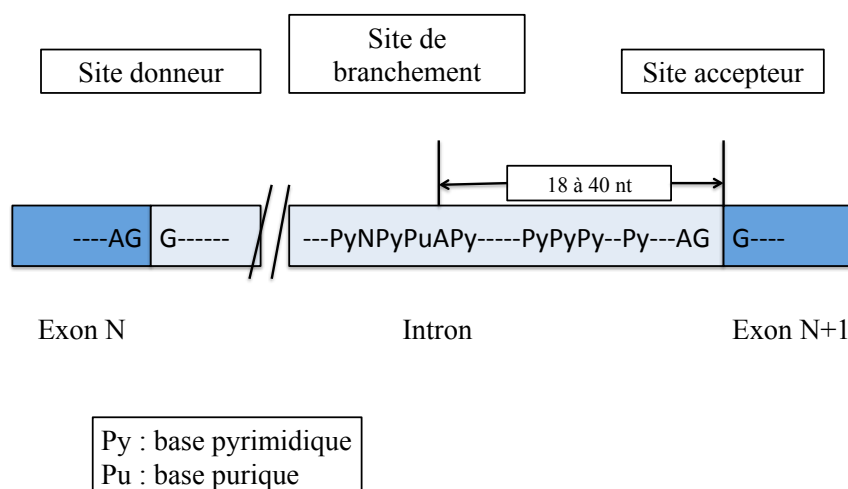


Figure 5 : Séquences de l'ARN messenger impliquées dans l'épissage.

L'épissage a lieu au sein du spliceosome, un complexe dont l'assemblage et le fonctionnement requiert plus de 150 polypeptides et 5 ribonucléoprotéines, les snRNP (small nuclear ribonucleoproteins) (Nilsen 2003). Le spliceosome a deux fonctions : la reconnaissance des sites d'épissage et les étapes couplées d'élimination des introns, qui s'opère par l'entremise d'une formation dite « en lasso » et de liaison des exons (Figure 6).

Ce mécanisme est toutefois sujet à de nombreuses variantes, appelées épissages alternatifs, qui permettent l'assemblage de transcrits codant pour des protéines requises de manière transitoire ou traduisant une adaptation pathologique. Cette diversification du réservoir de transcrits augmente sensiblement la variabilité protéique.

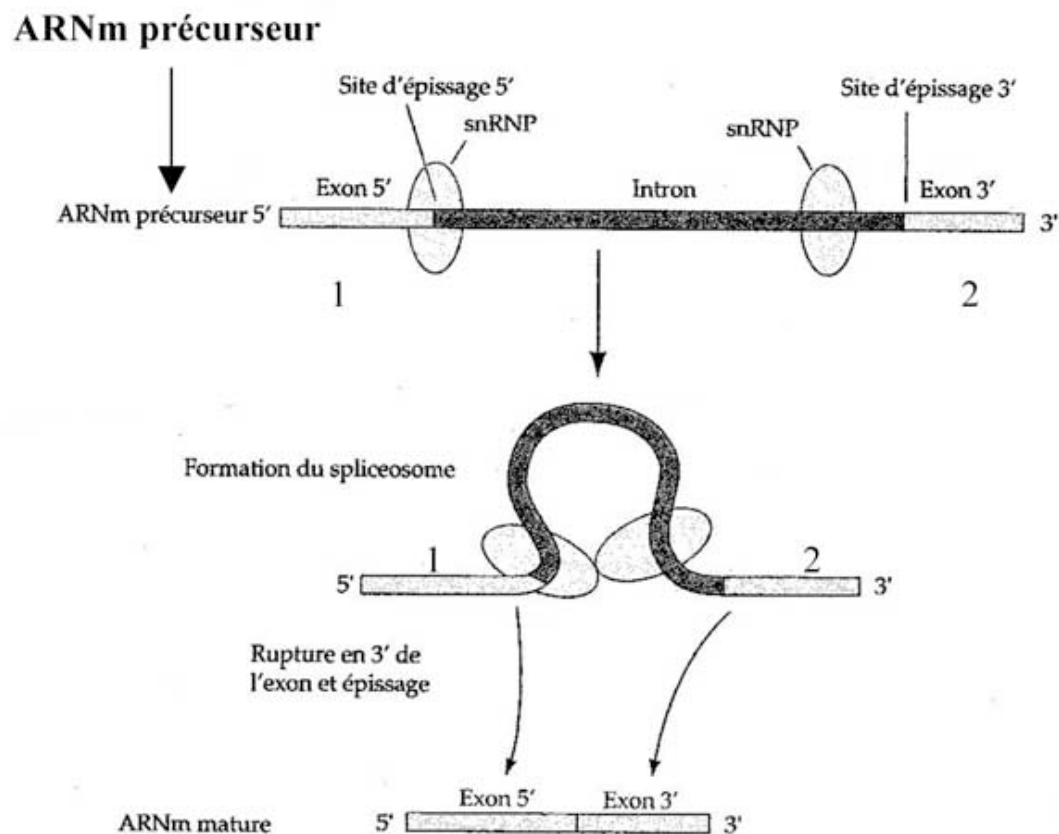


Figure 6 : Mécanisme d'épissage des ARN pré-messagers.

2.3.2. Epissage alternatif des ARN pré-messagers

L'étape d'épissage des ARN pré-messagers peut être spécifiquement dérégulée dans certaines affections. Ainsi, des introns, normalement éliminés, peuvent subsister et des exons, normalement conservés, peuvent disparaître des ARN messagers matures. Pour un même ARN pré-messenger, on peut donc avoir différents ARN messagers matures. Par conséquent, pour un même ARN pré-messenger, on peut avoir la synthèse de différentes protéines avec des structures et des propriétés fonctionnelles différentes. Des données récentes indiquent que l'épissage alternatif est un élément important de la diversité du génome humain (Modrek 2002).

A l'heure actuelle, différents types d'épissage alternatif ont été décrits (Figure 7) :

- le saut d'exon
- la rétention d'intron
- l'utilisation de sites d'épissage donneur et/ou accepteur alternatifs
- l'utilisation de promoteurs transcriptionnels multiples
- l'utilisation de signaux de sites de polyadénylation distincts.

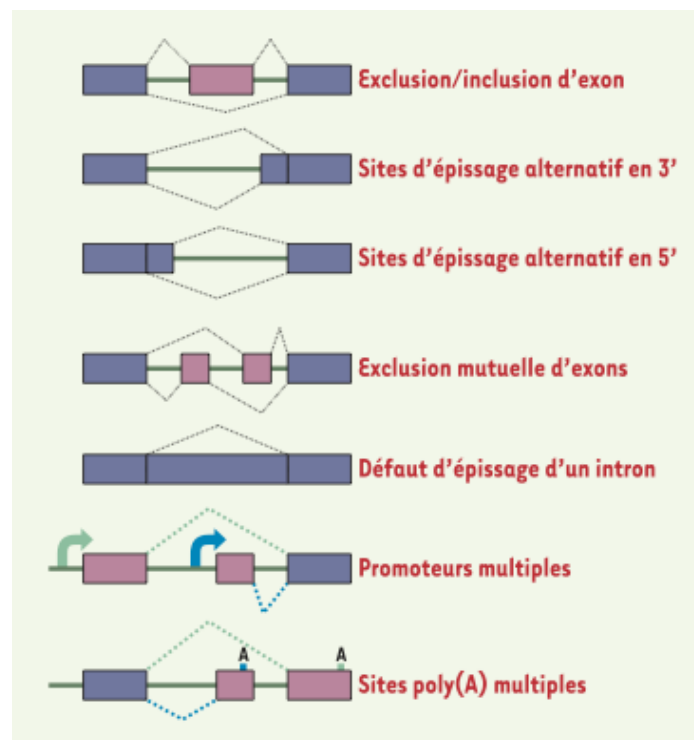


Figure 7 : Représentation des différents types d'épissage alternatif.

2.3.3. Epissage normal de l'ARN pré-messager BCR

Dans des conditions normales, l'ARN pré-messager *BCR* subit les mêmes lois d'épissage que le reste du génome. Les introns sont ainsi excisés, tandis que les exons sont conservés pour donner lieu à un ARN messager mature.

Concernant l'épissage exon 13 (b2) - exon 14 (b3) de *BCR*, dans les conditions normales, l'exon 13 (105 bases, d'après Genbank numéro U07000) est relié à l'intron 13 par le site d'épissage donneur 5' (séquence GU). A l'intérieur de l'intron 13 (715 bases, d'après Genbank numéro U07000) on retrouve le site de branchement, composé d'une séquence de type YNYTRAY dans laquelle Y représente une base pyrimidique soit T soit C, N est un nucléotide quelconque et R est une base purique soit G soit A. Le nucléotide A (adénosine), situé en position 6 de cette séquence est le nucléotide clé du site de branchement. Il est situé à une distance de 13 bases en amont du site d'épissage 3' accepteur. Le site accepteur correspond à la jonction entre l'intron 13 et l'exon 14 (75 bases, d'après Genbank numéro U07000) et possède la séquence classique AG (Figure 8). Branford *et coll.* ont montré que le nucléotide clé du site de branchement pouvait être polymorphe (polymorphisme A/G). De plus, ces auteurs ont également démontré que ce SNP (*small nucleotide polymorphism*) était lié à un autre SNP localisé 8 bases en amont du site donneur (polymorphisme T/C) et possédant le génotype T, (Branford 2002).

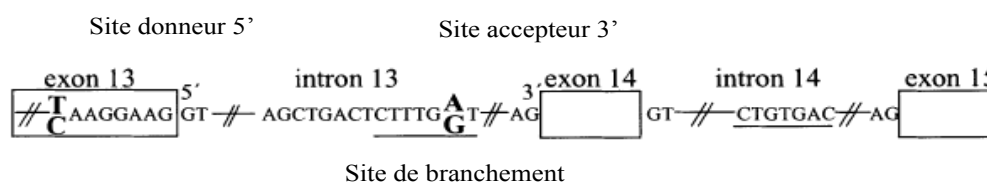


Figure 8 : Séquences de l'ARN messager *BCR* impliquées dans l'épissage (Branford 2002).

Ainsi lors de l'épissage normal exon 13 (b2) - exon 14 (b3) de *BCR*, les petites ribonucléoprotéines nucléaires composant le spliceosome sont à l'origine de la structure en lasso entre le site d'épissage 5' et le site de branchement (liaison notamment avec le nucléotide A). Les sites d'épissage 5' puis 3' sont successivement coupés et l'intron est libéré (Figure 9).

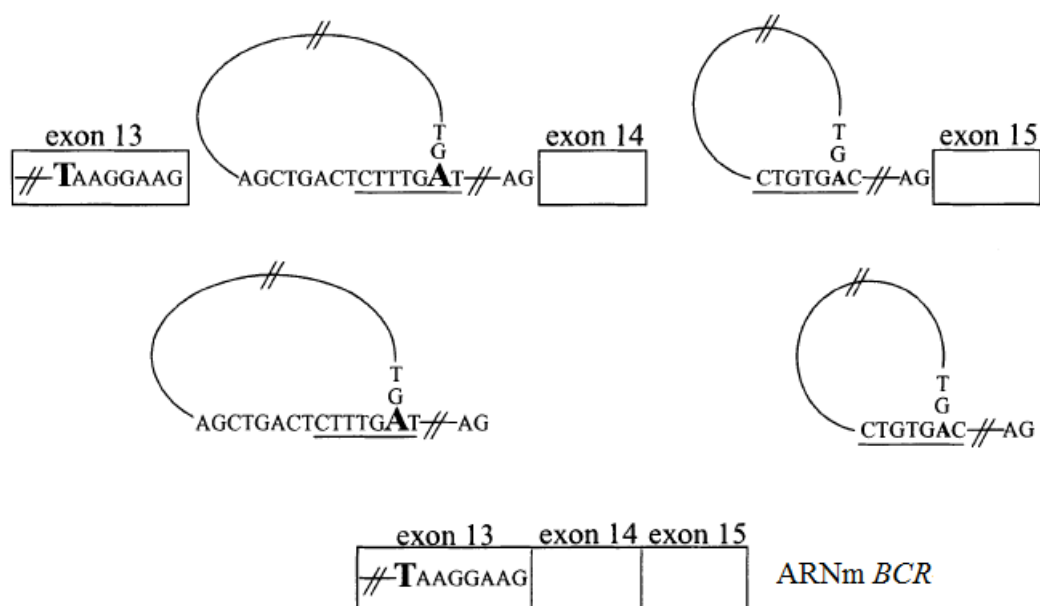


Figure 9 : Epissage classique de l'ARN pré-messager *BCR* (Branford 2002).

Le polymorphisme T/C à l'intérieur de l'exon 13 n'entraîne pas de changement d'acide aminé au niveau de la protéine (De Van Meissner 1998). Il est présent chez 28,8% de la population sur le gène *BCR* (Saußele 2000).

De manière intéressante, tous les patients exprimant simultanément les deux types de réarrangement b2a2 et b3a2 ont l'allèle C alors qu'il n'est présent que dans 1/3 des cas de réarrangement b2a2 et est absent des réarrangements b3a2 (Branford 2002). Cet allèle est exprimé soit de manière homozygote (C/C) soit de manière hétérozygote (T/C). Une association significative a été démontrée entre l'expression de l'allèle C et le polymorphisme dans l'intron 13 du gène *BCR*, où l'adénine (nucléotide clé de la séquence YNYTRAY du site de branchement de l'épissage) est remplacée par une guanine. Cet allèle, appelé G, avait été découvert par l'équipe de Chissoe *et coll.* lors du séquençage de différents gènes *BCR* (Chissoe 1995). Les deux polymorphismes T/C dans l'exon 13 et A/G dans l'intron 13 sont en complète liaison. Les génotypes exoniques TT, TC et CC correspondent donc, invariablement, aux génotypes introniques AA, AG et GG respectivement (Branford 2002).

2.3.4. Co-expression de b2a2 et b3a2

L'identification des évènements d'épissage alternatif permettant d'expliquer l'expression conjointe des deux réarrangements moléculaires b2a2 et b3a3 dans la LMC a été proposée par l'équipe de Branford *et coll.* (Branford 2002).

Lorsque le remplacement de l'adénine par la guanine (polymorphisme intronique A/G) a lieu, le site de branchement classique de l'épissage exon 13 (b2) - exon 14 (b3) de *BCR* est modifié et n'est plus reconnu par le spliceosome. A l'intérieur de l'intron 13, cela a pour conséquence l'activation d'un site de branchement cryptique.

Ce nouveau site de branchement peut être reconnu par le spliceosome car il possède une certaine homologie de séquence avec un site de branchement classique RNYTRAY (Figure 9). La structure en lasso sera alors différente mais sera toujours située au niveau de l'intron 13. Par conséquent, l'épissage de l'ARN pré-messager n'est pas modifié et on retrouvera un ARN messager *BCR* de type e13-e14-e15 (b2-b3-b4) (Figure 10).

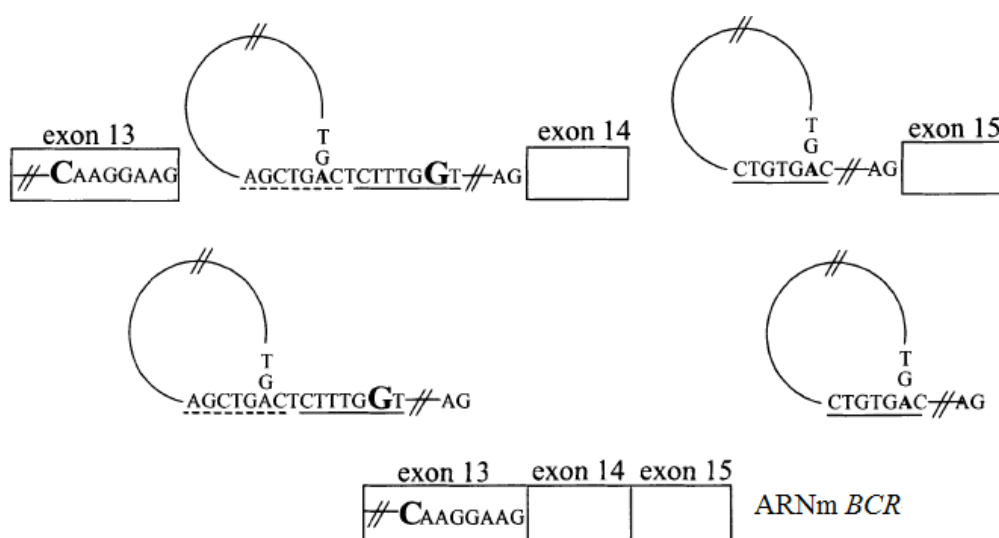


Figure 10 : Epissage de l'ARN pré-messager *BCR* utilisant le site cryptique de branchement (Branford 2002).

Cependant, selon Ruskin, le site cryptique est utilisé de manière bien moins efficace que le site de branchement normal (Ruskin 1985). Il peut donc arriver que le spliceosome ne le reconnaisse pas mais reconnaisse directement le site de branchement normal de l'intron suivant, l'intron 14 du gène *BCR*, qui possède un site de branchement classique de type YNYTRAY (Figure 11). Dans ces conditions, l'exon 14 (b3) est alors excisé dans la boucle d'épissage (structure en lasso) de l'ARN pré-messager et ce sont les exons 13 et 15 qui seront accolés entre eux pour donner un ARNm de type e13-e15 (b2-b4) (Figure 11).

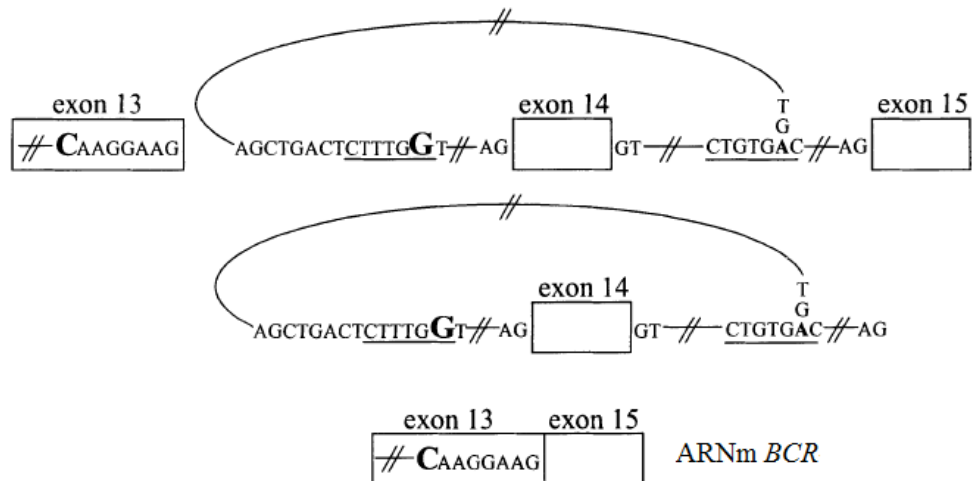


Figure 11 : Epissage alternatif de l'ARN messenger *BCR* (Branford 2002).

Ainsi, à partir d'un même ARN pré-messager *BCR* contenant deux polymorphismes associés, la co-expression de deux ARNm différents (b2-b3-b4 et b2-b4) serait possible par un mécanisme d'épissage alternatif lié à la modification du site de branchement. Ce modèle pourrait expliquer, du moins en partie, la co-expression des réarrangements moléculaires b3a2 et b2a2.

Points de cassure	b2	Intron b2	b3	Intron b3	b4	Réarrangement
			SNP Site de branchement			
Intron b2			A			b2a2
Intron b2			G			b2a2
Intron b3			A			b3a2
Intron b3			G			b2a2
						b3a2

Figure 12 : Différents types de réarrangements *BCR-ABL1* en fonction du polymorphisme de l'intron 13 du gène *BCR*.

Ainsi, en suivant l'hypothèse de Branford *et coll.*, la détection conjointe des ARNm b2a2 et b3a2 n'est possible que lorsque le point de cassure se situe dans l'intron b3 de *BCR* et lorsque le site de branchement de l'intron b2 possède l'allèle G (ce qui semble être le cas de 100% des patients possédant le double transcrit). Ainsi, seuls les réarrangements génomiques de type b3a2 peuvent donner naissance à des ARNm b2a2 et b3a2. Ce modèle, bien que séduisant, n'explique cependant pas la proportion relative de ces deux ARNm au diagnostic.

2.4. La protéine de fusion p210^{BCR-ABL1}

2.4.1. Structure

La protéine de fusion p210^{BCR-ABL1} est composée des acides aminés de BCR du côté N-terminal et des acides aminés d'ABL du côté C-terminal (Figure 13). Elle comporte des domaines homologues avec les protéines de la famille Src.

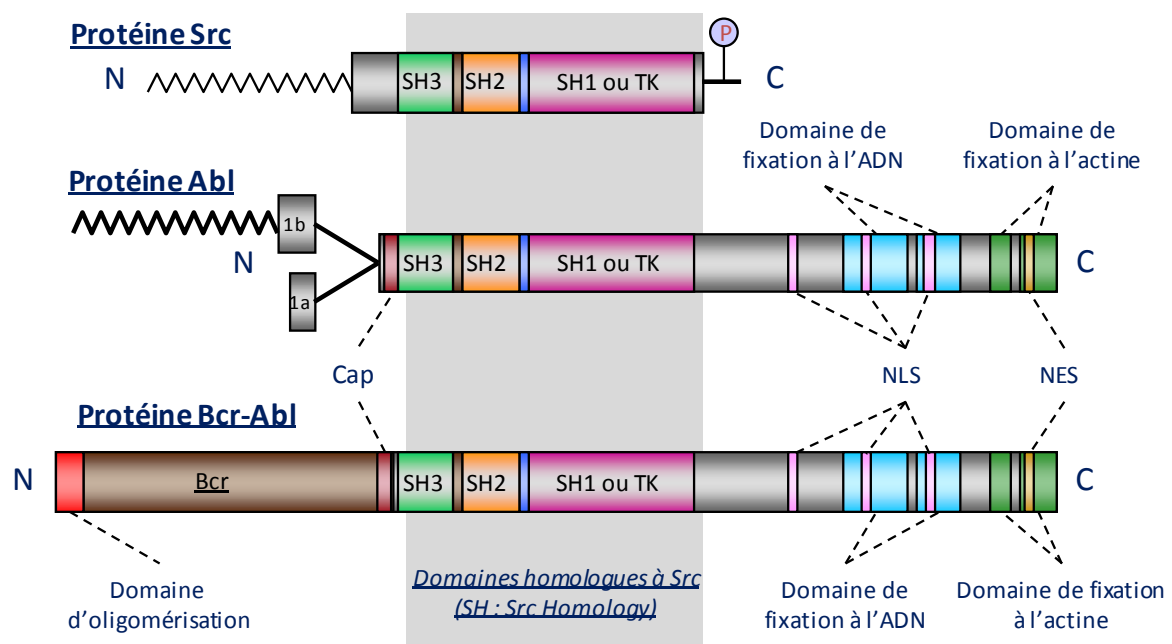


Figure 13 : Structure de la protéine BCR-ABL.

Dans la partie BCR, on retrouve :

- un domaine d'oligomérisation
- une tyrosine en position 177 qui engage BCR-ABL dans la voie de signalisation RAS-MAPK grâce à la protéine Grb2 (Zhang 2001).
- le domaine sérine-thréonine kinase qui sert de site de liaison aux motifs SH2 d'ABL.

Les séquences de BCR vont ainsi permettre d'activer les deux fonctions principales de la protéine ABL : l'activité tyrosine kinase et sa propriété de liaison à l'actine (McWhirter 1993).

Dans la partie ABL, qui comporte un domaine d'homologie avec les protéines Src (SH), on retrouve :

- les domaines régulateurs SH2 et SH3
- le domaine tyrosine kinase ou SH1, particulièrement impliqué dans le pouvoir transformant de BCR-ABL (Pendergast 1993).
- les séquences de localisation nucléaire (NLS)
- des sites de liaison à l'ADN et à l'actine
- des séquences d'exportation nucléaire (NES)

2.4.2. Pouvoir oncogène de BCR-ABL

Les fonctions de la protéine BCR-ABL ont été largement étudiées et il existe plusieurs mécanismes pouvant expliquer son pouvoir oncogène (Figure 14).

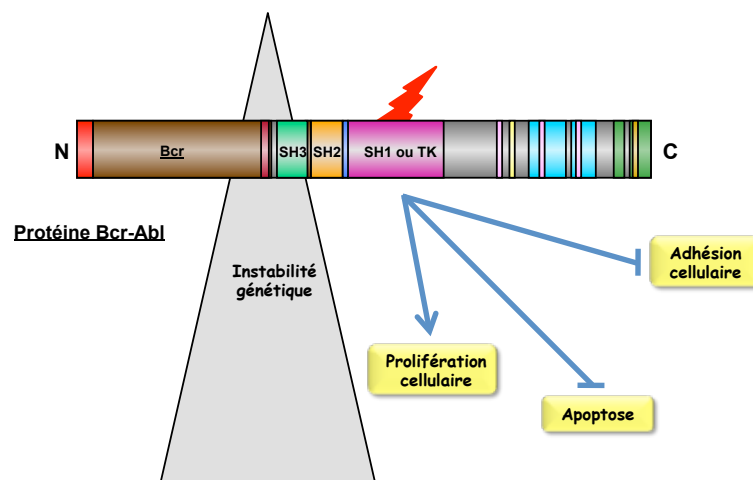


Figure 14 : Leucémogénèse de la protéine BCR-ABL.

2.4.2.1. Altération de l'adhésion cellulaire

La protéine de fusion induit une diminution de l'adhésion des cellules au stroma et à la matrice extracellulaire médullaire par l'intermédiaire d'un variant de $\beta 1$ -intégrine, non retrouvé dans les progéniteurs normaux (Verfaillie 1997). Le transfert des signaux d'inhibition de la prolifération cellulaire via l'interaction progéniteurs hématopoïétiques/stroma médullaire fait donc défaut.

Un des principaux substrats de la protéine BCR-ABL, la protéine CRKL, est aussi impliquée dans l'adhésion médiée par les intégrines ainsi que dans la régulation de la motilité cellulaire en association avec d'autres protéines d'adhésion focale, comme la paxilline, la kinase focale d'adhésion FAK, la p130 Cas et Hef1 (Deininger 2000).

2.4.2.2. Activation de voies de signalisation cellulaire et inhibition de l'apoptose

Plusieurs voies de signalisation cellulaire, plus ou moins liées entre elles, sont activées en présence de la protéine BCR-ABL et ont un impact dans la leucémogénèse.

La voie Ras et des MAP kinase est ainsi activée, après phosphorylation du résidu thyrosine en position 177, par l'intermédiaire de l'interaction entre la protéine Grb2 et la protéine Sos. La protéine CRKL peut également activer la voie Ras. Une fois active, la protéine Ras peut se lier et activer la sérine-thréonine kinase Raf, qui va phosphoryler en cascade des sérine-thréonine kinases MEK1, MEK2 puis ERK (Figure 15). Cela aboutit à la phosphorylation de facteurs de transcription et à l'activation de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose (Deininger 2000).

La stimulation de la voie JAK/STAT a également des effets sur l'inhibition de l'apoptose et sur la prolifération cellulaire (Steelman 2004). La protéine BCR-ABL a la capacité de stimuler JAK (*Janus Kinases*) ou de phosphoryler directement STAT 1, 3 et 5 (*Signal transducers and activators of transcription*). Ainsi, dans les cellules exprimant la protéine BCR-ABL, STAT est phosphorylée de manière constitutive et sa liaison à l'ADN est optimale. Les différentes protéines STAT stimulent la transcription de gènes anti-apoptotiques, comme Bcl-2, et de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire, comme la cycline D1 et c-Myc.

La voie PI3K/AKT est également activée par la présence de la protéine BCR-ABL. Les PI3K (Phosphatidyl inositol-3 kinase) sont essentielles à la survie des cellules exprimant la protéine BCR-ABL (Skorski 1995). Ce sont des protéines possédant une activité lipide kinase qui vont permettre la synthèse de phospholipides phosphatés qui vont activer en cascade des protéines sérine-thréonine kinases, PDK puis AKT. AKT a un effet anti-apoptotique en activant la protéine Bad, les capases 9 et les facteurs de transcription FOXO (Steelman 2004).

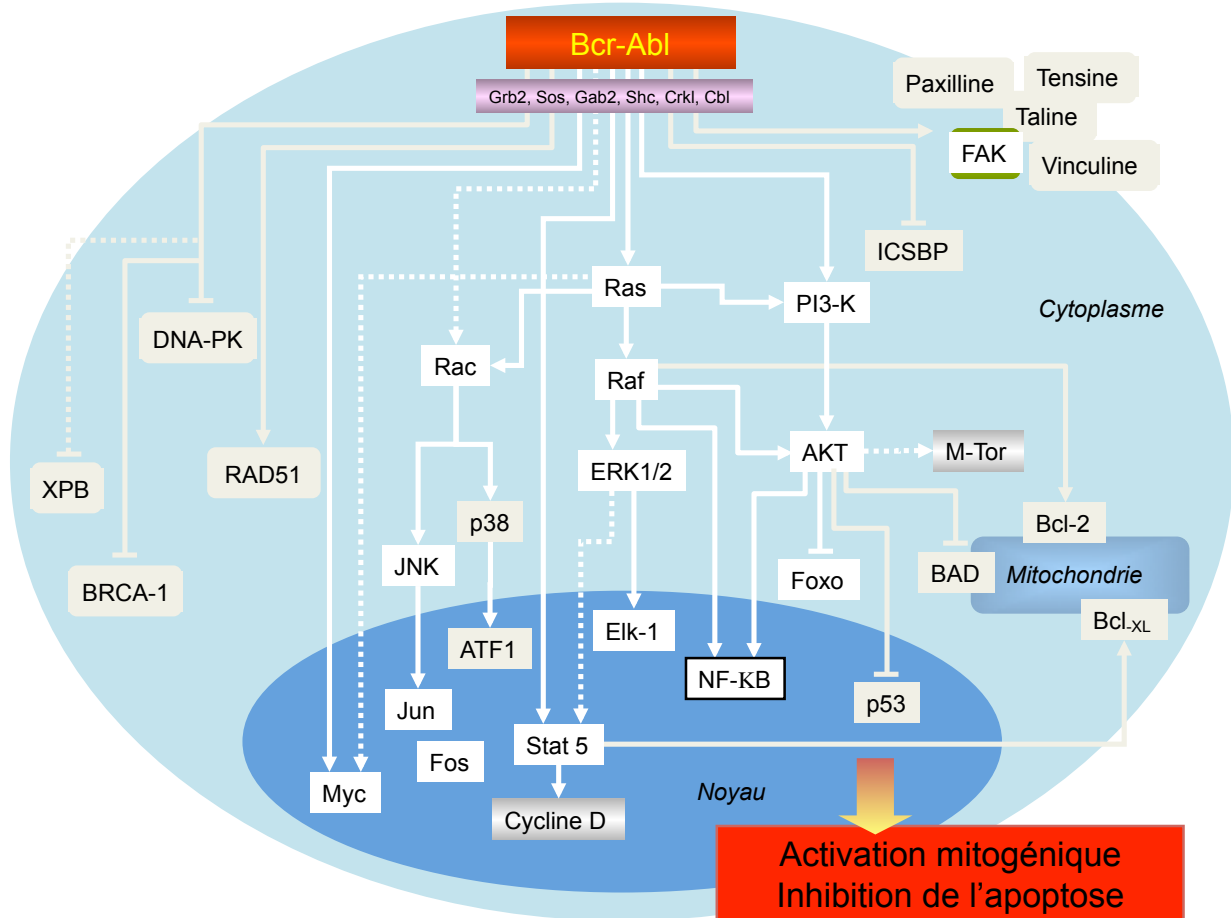


Figure 15 : Voies de signalisation cellulaire activées par la protéine BCR-ABL.

2.4.2.3. Dégradation des protéines inhibitrices

Normalement, des protéines Abi-1 et Abi-2 (Abl-interactor proteins) sont capables d'inhiber l'action induite par la protéine BCR-ABL. Cependant, ces protéines sont aussi la cible de la protéine BCR-ABL, qui va stimuler leur dégradation dans un complexe enzymatique, le protéosome (Dai 1998).

2.4.2.4. Instabilité génétique

L'instabilité génétique est une des caractéristiques majeures des cellules contenant la protéine de fusion BCR-ABL. Elle intervient dans le cadre du passage à la phase blastique lors de la progression de la maladie mais également dans le développement des résistances au traitement. Les mécanismes moléculaires intervenant dans ce phénomène sont multiples et complexes.

D'après Turhan A., ces mécanismes de progression du clone leucémique sont : la méthylation du promoteur d'ABL, la mutation du gène suppresseur de tumeur p53, l'augmentation de l'expression de BCR-ABL (par stimulation de la transcription ou duplication du chromosome Philadelphie), le raccourcissement des télomères dans les cellules leucémiques (induisant une activité télomérase plus importante mais moins efficace) et des anomalies des gènes de réparation de l'ADN (XPB, DNA-PK) (Turhan 2002).

Plus récemment, la production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS pour *reactive oxygen species*), liée à l'activité tyrosine kinase de BCR-ABL, a été mise en cause dans les lésions survenant sur l'ADN (Penserga 2007).

3. Techniques de biologie moléculaire dans la LMC

3.1. Technique qualitative de détection des réarrangements *BCR-ABL1*

3.1.1. Généralités

L'identification précise du réarrangement moléculaire *BCR-ABL1* n'est pas nécessaire au diagnostic, en revanche elle est fondamentale pour adopter la bonne stratégie lors du suivi de la maladie résiduelle.

Le gène *BCR-ABL1* peut être détecté par plusieurs méthodes moléculaires qualitatives, comme le Southern Blot, l'hybridation *in situ* en fluorescence ou des techniques de PCR (*polymerase reaction chain*). Les premières techniques de PCR étaient basées sur l'amplification de l'ADN génomique. Dans la LMC, ces techniques sont difficilement utilisables à cause de la longueur des séquences d'ADN étudiées (incluant les longues séquences introniques variables selon le point de cassure et donc suivant les patients).

Ce sont donc les techniques de biologie moléculaire intéressant l'ARN total extrait des cellules à étudier qui sont utilisées dans la LMC au moment du diagnostic. La technique la plus utilisée pour sa simplicité, sa rapidité et sa sensibilité est la RT-PCR pour *reverse-transcription polymerase chain reaction*.

Comme nous l'avons vu précédemment, dans la LMC, il existe des réarrangements moléculaires principaux, les plus fréquents (b2a2, b3a2 et e1a2), et des réarrangements dits « atypiques », qui sont décrits mais ne sont retrouvés que dans de très rares cas. De nombreuses méthodes de RT-PCR pour la détection des réarrangements *BCR-ABL1* sont optimisées pour détecter uniquement les principaux réarrangements moléculaires. Le problème est donc que certains cas de LMC, exprimant un réarrangement moléculaire « atypique », peuvent ne pas être détectés par ces techniques. Par conséquent, la technique de RT-PCR multiplex s'est développée, pour étudier aussi bien le sujet adulte que l'enfant (Ariffin 2003).

3.1.2. La RT-PCR multiplex

La RT-PCR multiplex est la méthode de choix pour la détection des différents réarrangements *BCR-ABL1*. Grâce à l'utilisation de plusieurs amorces de manière simultanée, elle permet de détecter tous les réarrangements connus et non connus (Cross 1994), (Van Dongen 1999).

3.1.2.1. Description

Le matériel utilisé étant l'ARN messager, la première étape est l'extraction de l'ARN total des cellules à étudier. Elle est suivie d'une étape de synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) grâce à une ADN polymérase ARN dépendante, la reverse transcriptase (RT). Ensuite, l'amplification va pouvoir se dérouler en présence du milieu réactionnel (bases d'ADN, solution tampon) et surtout des amorces spécifiques choisies. Les produits d'amplification seront ensuite soumis à une électrophorèse en gel d'agarose pour pouvoir identifier les produits d'amplification marqués au bromure d'éthidium en fonction de leur taille. La taille des réarrangements moléculaires *BCR-ABL1* est connue (identifiée par technique de séquençage) et pourra être comparée aux produits d'amplification de RT-PCR obtenus (Burmeister 2008).

3.1.2.2. Choix des amorces

Leur principal objectif est d'être spécifique de la région à amplifier. Le choix des amorces pour la RT-PCR est donc primordial pour détecter tous les types de réarrangements *BCR-ABL1* possibles. Les différents réarrangements sont liés aux différents points de cassure sur les gènes *BCR* et *ABL1*.

En raison du faible nombre de points de cassure sur le gène *ABL1*, une seule amorce est le plus souvent utilisée, en position a3 (exon 3 d'*ABL1*), permettant ainsi de détecter à la fois les réarrangements exprimant a2 et/ou a3.

En revanche, sur le gène *BCR*, les points de cassure sont plus nombreux et plusieurs amorces vont donc être utilisées pour encadrer les régions de cassure :

- dans la région m-*BCR* : détection des réarrangements de type e1

- dans la région M-BCR : détection des réarrangements de type b2 et b3
- dans la région μ -BCR : détection des réarrangements de type e13
- dans la région v-BCR, de manière plus ou moins standardisée.

Dans tous les cas, il ne faut pas utiliser d'amorces intéressant des exons connus pour participer à des mécanismes d'épissage alternatif, comme e14, e16 ou e5 (Burmeister 2008).

3.1.2.3. Electrophorèse sur gel d'agarose

La dernière étape des techniques de détection fait souvent appel à une électrophorèse des produits d'amplification en gel d'agarose (Figure 16), ce qui permet d'apprécier l'absence (patient1) ou la présence (patient2) d'amplification et de déterminer la taille du produit amplifié (donc de caractériser le réarrangement). La présence de fragments de taille inconnue conduit à un séquençage direct du produit de PCR afin de caractériser le réarrangement correspondant.

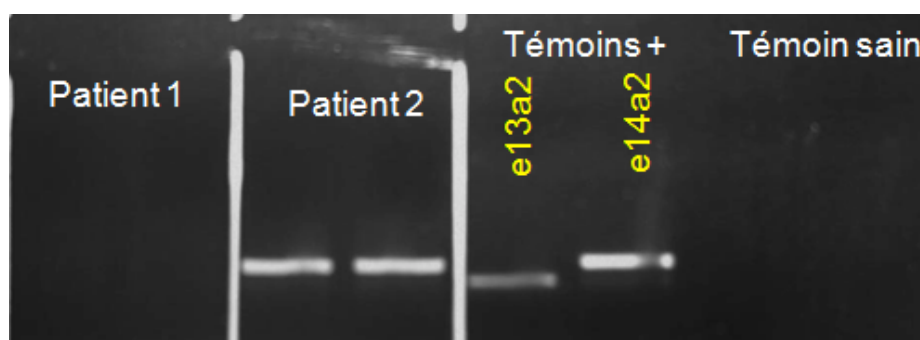


Figure 16 : Exemple d'électrophorèse des produits d'amplification après RT-PCR (patient 1 = négatif, patient 2 = réarrangement e14a2 ou b3a2).

3.2. Technique quantitative de diagnostic et de suivi moléculaire : la PCR en temps réel

La PCR en temps réel ou RQ-PCR (Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction) est à l'heure actuelle la technique quantitative de choix pour la quantification et le suivi moléculaire des patients atteints de LMC. Elle permet en effet de quantifier les ARN messagers *BCR-ABL1* avec une sensibilité et une spécificité remarquables (Hughes 2006).

Cette technique est aujourd'hui tout à fait standardisée (réseau Europe Against Cancer, EAC) et des recommandations concernant l'harmonisation de sa méthodologie sont établies (Branford 2006).

3.2.1. Description

Il s'agit d'une technique de RT-PCR avec l'utilisation de sondes sens et anti-sens oligonucléotidiques fluorescentes spécifiques. La sonde sens est marquée aux deux extrémités : en 5' par un émetteur de fluorescence et en 3' par un suppresseur qui absorbe la fluorescence. Tant que la sonde n'est pas hydrolysée par l'enzyme à activité exonucléasique 5'→3' (Taq polymérase le plus souvent), la sonde n'émet pas de fluorescence. Une fois la sonde hydrolysée, la fluorescence est émise (Figure 17). D'autres techniques de RQ-PCR existe en fonction du mode de révélation (Van der Velden 2003).

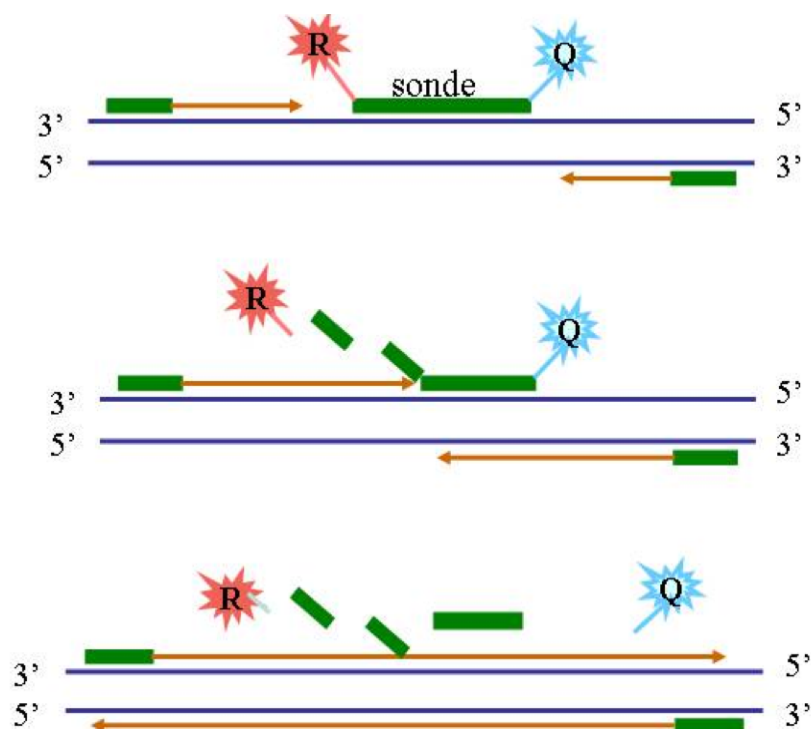


Figure 17 : RQ-PCR.

3.2.2. Interprétation des résultats

En fonction du rapport de fluorescence émetteur-supprimeur, une représentation graphique de l'intensité de fluorescence en fonction des cycles de PCR est obtenue.

A partir de la fluorescence de base (au cours des premiers cycles d'amplification), un seuil de détection va être défini. C'est à partir de ce seuil que l'on va déterminer quand la PCR est positive. Le nombre de cycles nécessaires pour que l'intensité de la fluorescence émise dépasse le seuil de détection est appelé Ct (*cycle threshold*). Une gamme de plasmide permet de définir une droite de calibration et ainsi de transformer les Ct en nombre de copies (Figure 18)

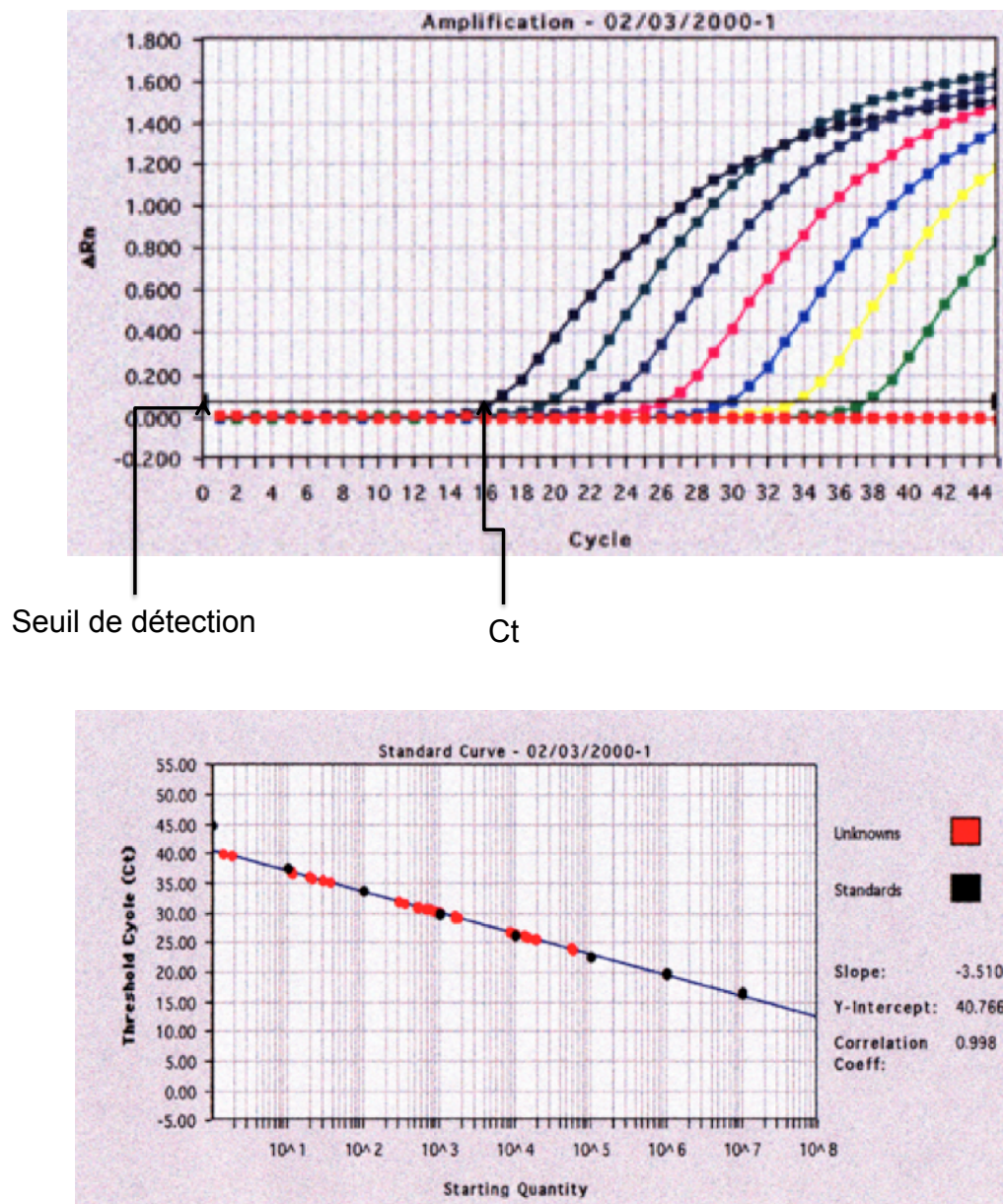


Figure 18 : Cycles d'amplification et courbe de calibration *BCR-ABL1*.

Pour standardiser la RQ-PCR, un gène de référence est amplifié en parallèle du gène étudié. L'EAC a réalisé une étude en 2003 afin de choisir un gène contrôle adapté au suivi de la maladie résiduelle des patients présentant une LMC ; il semblerait qu'il n'y ait pas de gène idéal entre *ABL1*, *B2M* (beta-2 microglobuline) et *GUS* (beta-glucuronidase) (Beillard and Hokland 2003). La plupart des laboratoires européens utilisent le gène *ABL1* car il semble plus stable que les autres et historiquement avait été étudié dans les premières RT-PCR compétitives. Cependant, il présente aussi des inconvénients :

- les amorces *ABL* (amplification a2-a3) permettent l'amplification des 2 formes *ABL 1a* ou *ABL 1b*.
- elles permettent également d'amplifier *BCR-ABL1*.

Pour des niveaux d'ARN messagers *BCR-ABL1* élevés, le rapport *BCR-ABL1/ABL1* est donc sous-estimé puisqu'il est en fait $BCR-ABL1/ABL1 + BCR-ABL1$. En revanche, lorsque les niveaux sont faibles, cette distorsion devient très faible puisque le taux de *BCR-ABL1* est négligeable par rapport à celui d'*ABL1*.

Ainsi, l'expression des résultats se fait par rapport au gène de référence. On parlera de ratio *BCR-ABL1/gène contrôle*, exprimé en pourcentage. A partir du niveau de base au moment du diagnostic, le 100%, la notion de rémission moléculaire majeure (RMM) est définie comme la réduction de 3-log à partir de ce niveau de base (soit 0,1%). La RMM est l'objectif du suivi moléculaire des patients traités pour une LMC. Cependant, en fonction de la sensibilité des différentes techniques, une réduction allant jusqu'à 4 ou 5-log pourra être détectée et on parlera de réponse moléculaire complète (RMC). Suivant le taux d'ARNm *BCR-ABL1* résiduel ou la sensibilité de la technique, des réponses moléculaires appelées MR⁴, MR^{4,5} et MR⁵ sont définies.

En revanche, même si les réarrangements ne sont plus détectables par les techniques de biologie moléculaire, cela ne veut pas dire qu'il ne persiste plus de réarrangement *BCR-ABL1* dans l'organisme. En effet, il existe une corrélation entre la quantité du ratio *BCR-ABL1* et le nombre de cellules leucémiques, selon laquelle la limite de détection de 0,0001% correspondrait à 10⁶ cellules leucémiques (Figure 19) (Baccarani 2006).

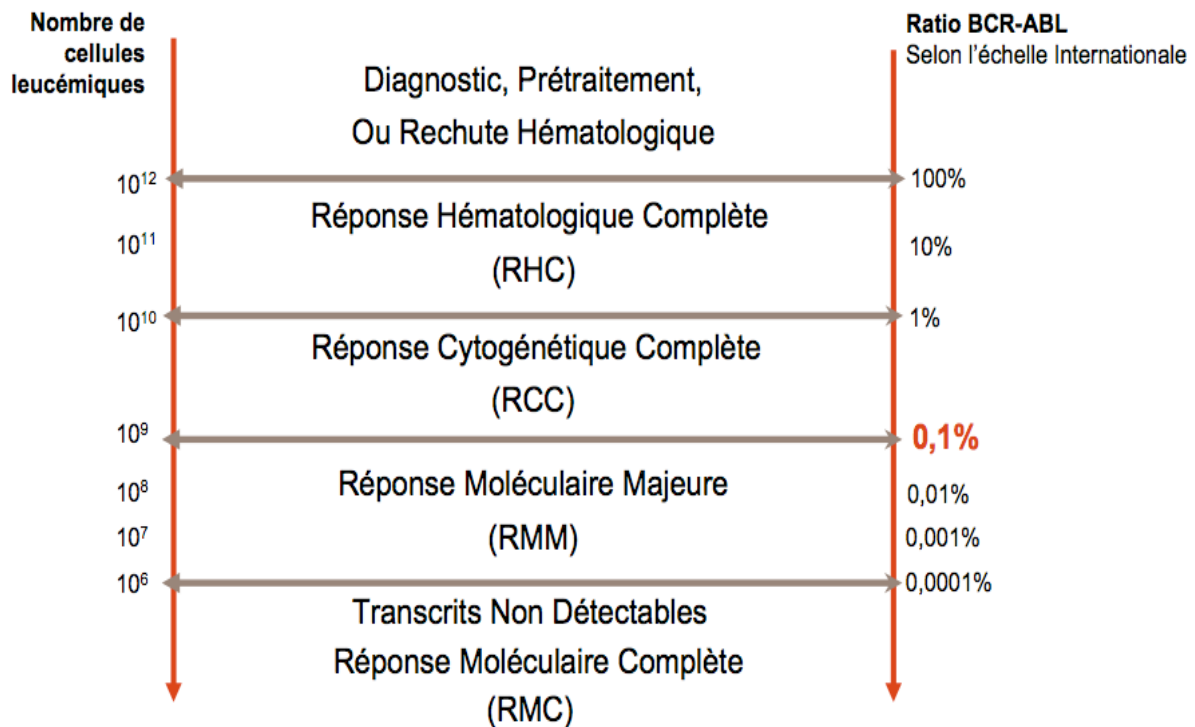


Figure 19 : Corrélation entre le nombre de cellules leucémiques et l'expression de *BCR-ABL1* (Baccarani 2006).

Pour permettre la comparaison entre les différents laboratoires réalisant cette technique et donc pour que la RMM soit définie de manière identique, une échelle internationale a été créée. Un facteur de conversion est établi pour chaque centre. Les résultats de chaque centre seront donc multipliés par ce facteur de conversion pour être rendus dans l'échelle internationale ou IS (*internationale scale*).

4. Traitement de la LMC

Le traitement de référence de la maladie jusqu'au début des années 2000 était l'association interféron-alpha/aracytine (Guilhot 1997). Par rapport à ce traitement, les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) ont révolutionné le pronostic de la LMC (Druker 2006). Ce sont ces molécules qui sont désormais à la base du traitement de la LMC, avec à leur tête l'Imatinib Mesylate ou Glivec®.

4.1. ITK de première génération : l'Imatinib mésylate (Glivec®)

4.1.1. Mécanisme d'action

Le domaine SH1 de la protéine de fusion BCR-ABL, responsable de l'activité tyrosine kinase, est la cible moléculaire des ITK. Ce domaine peut se présenter sous deux formes : une inactive (auto-inhibée) et une active permettant la liaison avec l'ATP, composées d'enchaînements d'hélices α et de feuillets β . Cela permet la constitution de plusieurs boucles conformationnelles. Ainsi, la boucle P permet la fixation du groupe phosphate de l'ATP tandis que la boucle A joue un rôle dans l'activation de la protéine en démasquant le site catalytique de la protéine. Ce site catalytique permet la phosphorylation des substrats de la protéine BCR-ABL et donc le déclenchement de la cascade de signaux moléculaires dans la cellule.

L'Imatinib a été le premier ITK mis au point. Il agit comme un inhibiteur compétiteur sur le site de liaison de l'ATP, au niveau de la boucle P, uniquement dans la forme inactivée de la protéine de fusion BCR-ABL (Figure 20). Son action n'est pas totalement spécifique puisqu'il a également une affinité pour les PDGFR A et B (*platelet-derived growth factor receptor*) et pour le récepteur c-Kit.

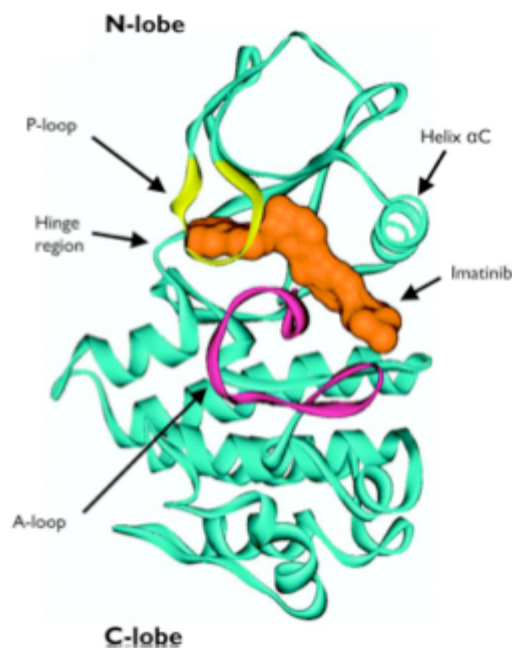


Figure 20 : Relation Imatinib/domaine tyrosine kinase de BCR-ABL (Quintás-Cardama 2009)

4.1.2. Effets indésirables de l'Imatinib

L'Imatinib est généralement bien toléré et très peu de patients arrêtent le traitement pour cause d'effets secondaires graves (grade 3 ou 4). Ces principaux effets secondaires graves liés à l'Imatinib sont hématologiques. Ils peuvent concerner n'importe quelle lignée, allant de la simple monocytopénie à une pancytopénie sévère. Par ordre de fréquence, on observe la neutropénie, la thrombopénie et l'anémie.

Les autres effets indésirables décrits sont :

- des signes digestifs : diarrhées, nausées, douleurs abdominales, cytolys
hépatique
- des signes neuro-musculaires : crampes, douleurs, céphalées, asthénie
- des signes cutanés : rash, œdèmes péri-orbitaires
- de rares cas d'insuffisance cardiaque congestive et d'allongement du QT.

4.1.3. Echecs thérapeutiques sous Imatinib

Les échecs thérapeutiques sous Imatinib peuvent être liés à une résistance à la molécule, à une intolérance au médicament, à une interaction médicamenteuse (métabolisme via le cytochrome P450) ou à une inobservance de la part du patient (intérêt du dosage plasmatique de l'ITK). Après avoir éliminé les causes « évidentes » d'échec thérapeutique, un mécanisme de résistance doit donc être évoqué.

Les mécanismes de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase sont étroitement liés à leur mode de fonctionnement (Figure 21). 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.

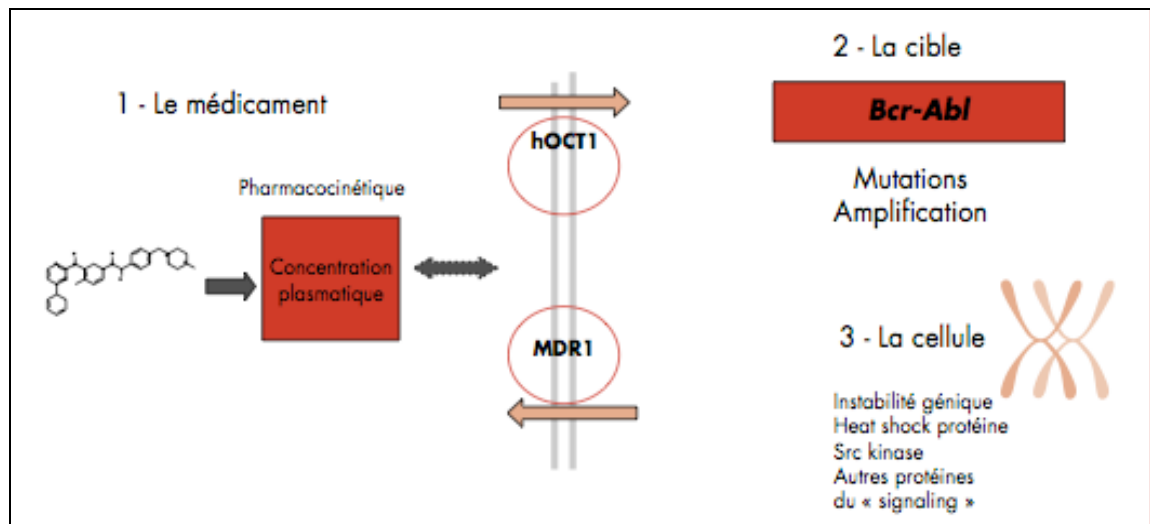


Figure 21 : Principaux mécanismes de résistance à l'Imatinib (Preudhomme 2010).

4.1.3.1. Résistances liées au médicament lui-même

Il existe un lien statistique entre les concentrations plasmatiques et la réponse au traitement suggérant qu'il existe chez certains patients de véritables résistances pharmacologiques (Larson 2008). Pour atteindre sa cible, l'Imatinib est dépendant de transporteurs et surtout de pompes à influx telle que hOCT-1 qui autorise l'entrée de l'Imatinib dans la cellule (Apperley 2007). Cette pompe et son activité semblent modifier la réponse au traitement sans qu'aucune véritable résistance n'ait été mise en évidence chez les patients.

4.1.3.2. Résistances liées à une modification de la cible

La résistance à l'Imatinib peut être due à des phénomènes d'amplification génique du gène *BCR-ABL1* lui-même (responsable d'une instabilité génétique) ou encore du gène *MDR1* (gène de résistance multidrogue) (Mahon 2000).

De nombreuses mutations dans le domaine tyrosine kinase de BCR-ABL ont été mises en évidence (plus de 100). Elles sont plus fréquemment retrouvées dans 4 domaines fonctionnels importants de la kinase :

- la boucle P ;
- la zone charnière, qui concerne les acides aminés F311, T315 et F317 ;
- le domaine catalytique ;

- la boucle A, dont la conformation est déterminante pour l'affinité à

l'Imatinib.

On observe une grande disparité dans leur fréquence selon la phase de la maladie et le type de résistance à l'Imatinib, mais 60 à 70 % des mutations retrouvées concernent 7 résidus (Figure 22).

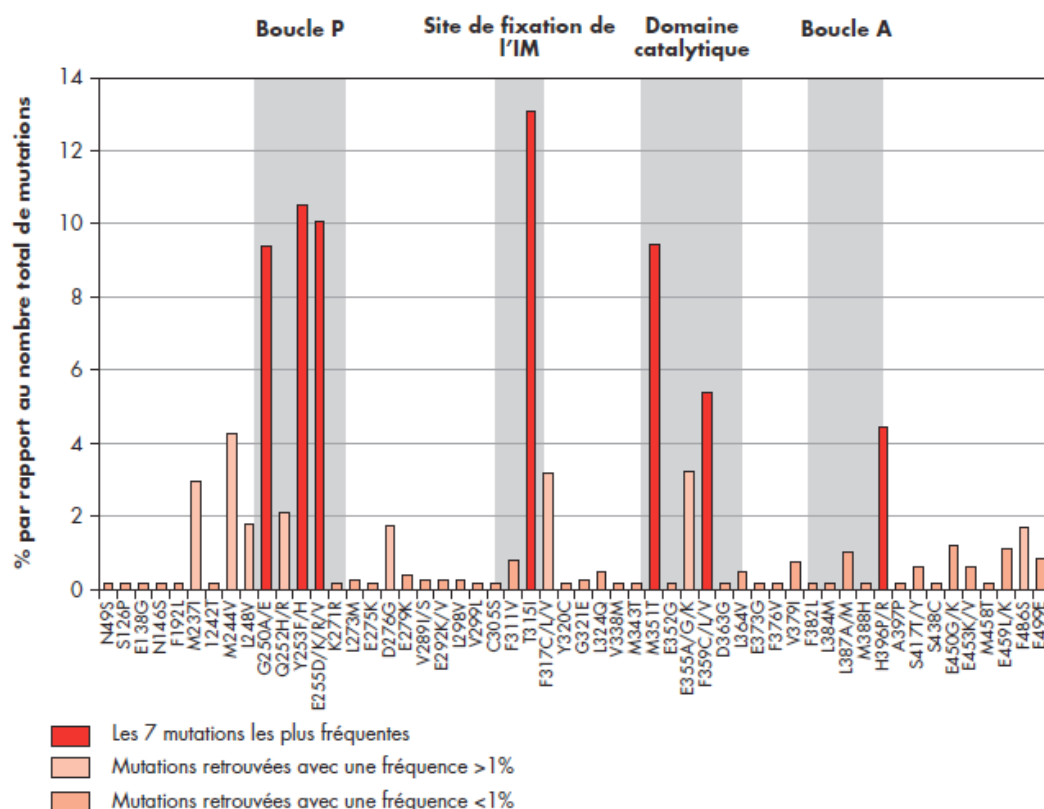


Figure 22 : Répartition des mutations en fonction de leur localisation (Preudhomme 2010).

L'apparition de ces résistances a mené au développement de nouveaux ITK dits de deuxième génération permettant l'obtention de réponses chez les patients intolérants ou résistants à l'Imatinib. Néanmoins, un cas particulier est celui de la mutation T315I car elle confère une résistance aux ITK de première et deuxième génération. Pour pallier à cette mutation, un ITK de troisième génération a été développé, le Ponatinib, efficace sur les mutants en 315 (Cortes 2012).

4.1.3.3. Résistances liées à la cellule leucémique

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 (Mahon 2008). L'implication d'autres acteurs moléculaires tels les « *heat shock proteins* » (HSP70) a aussi été suggérée (Pocaly 2007). 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.

4.2. Les ITK de deuxième génération

Ils sont donc efficaces sur la majorité des mutations du domaine kinase d'ABL à l'exception de rares mutations localisées sur la boucle P et surtout de la mutation T315I. Ce sont, eux aussi, des inhibiteurs compétitifs de l'ATP.

4.2.1. *Le Dasatinib*

Il a la capacité de se fixer à la fois sur la forme inactivée (comme l'Imatinib) mais aussi sur la forme active de l'oncoprotéine et possède une affinité pour de nombreuses autres kinases.

4.2.2. *Le Nilotinib*

Comme l'Imatinib, il ne se fixe que sur la forme inactivée de la protéine BCR-ABL.

4.3. Les ITK de troisième génération

Le seul ITK de troisième génération qui a été développé pour le moment est le Ponatinib. Il n'a été étudié que chez le sujet adulte et semble être efficace chez les patients porteurs de la mutation T315I (Cortes 2012).

4.4. Définition des réponses au traitement

Les différents types de réponse au traitement par ITK, issus des résultats chez le sujet adulte, font l'objet de recommandations par l'ELN (*European Leukemia Net*) (Baccarani 2010), (Baccarani 2013).

La réponse hématologique complète (RHC) au traitement est définie par :

- un taux de globules blancs $< 10 \times 10^3/L$
- un taux de plaquettes $< 450 \times 10^9/L$
- une absence de myélémie
- un taux de basophiles $< 5\%$
- une rate non palpable

La réponse cytogénétique (RC) au traitement est définie comme : (en fonction du pourcentage de cellules dans lesquelles on retrouve le chromosome Philadelphie sur au moins 20 mitoses)

- complète : 0%
- partielle : 1-35%
- mineure : 36-65%
- minimale : 66-95%

La réponse moléculaire au traitement est définie par rapport au ratio *BCR-ABL1/gène contrôle* :

- complète (RMC) : réarrangement non détectable sur 2 échantillons sanguins consécutifs ou réduction de plus de 3-log par rapport au ratio présent au diagnostic. Les réponses moléculaires profondes peuvent également être définies par les qualificatifs MR⁴, MR^{4,5} et MR⁵.

- majeure (RMM) : ratio $< 0,1\%$

4.5. Critères de suivi et de réponse au traitement

Les critères de surveillance et de suivi des patients atteints de LMC et traités par ITK sont également soumis à des recommandations de l'ELN (Baccarani 2010). En effet, la démarche des examens biologiques à réaliser lors de la surveillance de ces patients en fonction du temps de traitement est bien établie (Figure 23).

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 $BCR-ABL/ABL \leq 0,1\%$), 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 ^{nde} génération

Figure 23 : Examens biologiques de surveillance des patients traités par ITK (Preudhomme 2010).

En fonction du temps de traitement et du résultat de ces examens biologiques, la réponse au traitement par ITK pourra être définie (Baccarani 2013). En fonction du type de réponse, la prise en charge du patient pourra ainsi être adaptée (Figure 24).

La réponse optimale au traitement est définie (Baccarani 2013) :

- à 3 mois par un taux de $BCR-ABL1/ABL1 \leq 10\%$ et/ou une RC partielle
- à 6 mois par un taux de $BCR-ABL1/ABL1 \leq 1\%$ et une RC complète
- à 9 mois puis au cours du suivi par une RMM.

L'échec de traitement est défini :

- à 3 mois par l'absence de RHC et un pourcentage supérieur à 95% de cellules dans lesquelles le chromosome Philadelphie est présent
- à 6 mois par un taux de $BCR-ABL1/ABL1 > 10\%$ et /ou une RC mineure au mieux
- à 9 mois par un taux de $BCR-ABL1/ABL1 > 1\%$ et/ou une RC non complète

- lors du suivi par la perte de la RHC, la RC complète ou la confirmation de la perte de la RMM ou la présence de mutations.

Si les critères de réponse optimale au traitement ne sont pas atteints mais que les résultats ne permettent pas non plus de classer le patient en zone d'échec thérapeutique, les recommandations imposent de surveiller très attentivement le patient.

	Optimal	Warning	Failure
Baseline	NA	High risk Or CCA/Ph+, major route	NA
3 mo	BCR-ABL1 $\leq 10\%$ and/or Ph+ $\leq 35\%$	BCR-ABL1 $> 10\%$ and/or Ph+ 36-95%	Non-CHR and/or Ph+ $> 95\%$
6 mo	BCR-ABL1 $< 1\%$ and/or Ph+ 0	BCR-ABL1 1-10% and/or Ph+ 1-35%	BCR-ABL1 $> 10\%$ and/or Ph+ $> 35\%$
12 mo	BCR-ABL1 $\leq 0.1\%$	BCR-ABL1 $> 0.1-1\%$	BCR-ABL1 $> 1\%$ and/or Ph+ > 0
Then, and at any time	BCR-ABL1 $\leq 0.1\%$	CCA/Ph- (-7, or 7q-)	Loss of CHR Loss of CCyR Confirmed loss of MMR* Mutations CCA/Ph+

Figure 24 : Définition des réponses au traitement par ITK (Baccarani 2013).

II. La LMC de l'enfant et de l'adolescent

1. Généralités

La faible incidence de cette pathologie permet d'expliquer que peu d'études concernent aujourd'hui la LMC de l'enfant et de l'adolescent spécifiquement. De plus, les quelques études présentées jusque-là, n'incluaient que peu de patients et n'avaient donc que très peu de puissance en terme de statistiques.

Le peu de données dans cette population concerne les aspects cliniques, biologiques et moléculaires de la maladie. Au point de vue thérapeutique, il n'existe que peu de recul sur l'utilisation des inhibiteurs de tyrosine kinase et notamment de l'Imatinib Mésylate (Glivec®) chez ces enfants. Le traitement de référence était la greffe de cellules souches hématopoïétiques avant l'introduction de ces nouvelles molécules.

Cependant, certaines différences ont été mises en évidence, en comparaison avec la LMC de l'adulte, tant sur la présentation clinique que biologique.

Source	n	Age, y*	Gender, Male/Female	Palpable Spleen†	Leukocyte Count (×10 ⁹ /L)‡	Platelet Count (×10 ⁹ /L)‡
Bernard et al ¹³	20	11 (3–15)	12/8	100	NA	NA
Hardisty et al ¹⁷	4	11 (7–11)	2/2	100	NA (150–480)	NA (212–350)
Smith et al ²¹	7	14 (9–16)	6/1	100	250 (62–43)	950 (510–2100)
Hays et al ¹⁸	6	14 (9–19)	NA	NA	339 (25–750)	270 (120–425)
Castro-Malaspina et al ¹⁴	39	11 (2–16)	15/24	95	260 ± 25§	565 ± 59§
Rowe and Lichtman ¹⁹	10	13 (2–19)	6/4	NA	314 (40–786)	393 (24–1500)
Auer et al ¹²	17	7 (4–16)	10/7	NA	128 (33–644)	NA
Down et al ¹⁵	15	10 (2–20)	10/5	80	222 (49–526)	513 (136–970)
Fioretos et al ¹⁶	5	10 (6–12)	5/0	80	115 (78–406)	645 (325–965)

NA indicates not available.

* Median (range).

† Percentage of patients with palpable spleen.

‡ Median (range).

§ Mean ± SD.

Tableau I : Rapport de différentes études sur la LMC de l'enfant et de l'adolescent (Millot 2005).

2. Epidémiologie

D'un point de vue épidémiologique, cette pathologie représente moins de 3 % des leucémies de l'enfant et moins de 10 % des patients atteints de LMC avec chromosome Philadelphie sont des enfants ou des adolescents, (Suttorp 2010).

L'âge médian au diagnostic était de 11 ans dans une étude allemande (Suttorp 2008). Cette tendance a également été confirmée par une étude française sur 40 patients dans laquelle l'âge médian au diagnostic était de 12 ans et demi et 67% des patients avaient plus de 10 ans (Milot 2005). D'autres études ont aussi inclus des patients préférentiellement âgés de 15 à 19 ans en Europe (Birch 2003) et au Japon (Horibe 2001), suggérant qu'il s'agit d'une maladie de l'adolescence plus que de l'enfance.

A l'heure actuelle, aucun facteur de risque prédisposant n'est clairement reconnu. Il n'y a pas de prédisposition génétique puisque le risque chez des frères jumeaux est discordant. Il n'existe pas non plus d'augmentation du risque de développer une LMC chez des enfants atteints d'anomalies chromosomiques pré-leucémiques, telles que l'anémie de Fanconi ou le syndrome de Down (Apperley 2009). Dans des cas exceptionnels, une association avec une exposition aux radiations ionisantes aurait été retrouvée chez des enfants au Japon dans les années 1940, au décours des explosions nucléaires (Preston 1994).

Chez l'enfant, une prépondérance de patients de sexe masculin a été évoquée mais n'a jamais été réellement démontrée, du fait du faible nombre de cas dans ces études.

3. Présentation de la maladie

Comme chez l'adulte, la découverte de la maladie se fait dans une très grande majorité des cas (> 90% des cas) au moment de la phase chronique de la maladie. Cependant dans quelques cas, la maladie sera diagnostiquée en phase accélérée voire blastique. Les manifestations cliniques et biologiques de la pathologie seront alors plus bruyantes et le délai de prise en charge devra alors être extrêmement rapide.

A la phase chronique, le diagnostic peut être porté de manière tout à fait fortuite (examen de routine) ou plus volontiers devant l'apparition d'un certain nombre de symptômes et/ou de signes cliniques. Chez ces patients, les principaux symptômes seront des signes fonctionnels généraux, avec, par ordre de fréquence :

- une asthénie, présente dans une majorité des cas,
- une perte de poids, un inconfort splénique et une fièvre, qui pourront se manifester dans quelques cas,
- des saignements spontanés pourront également être un motif de consultation du patient,
- des douleurs osseuses et/ou abdominales de manière beaucoup plus occasionnelle.

En revanche, tout comme chez le patient adulte, la recherche d'une splénomégalie et la mesure du débord costal splénique seront des temps essentiels de l'examen clinique devant tout patient pour lequel une LMC est suspectée. Plus de 70% des enfants examinés présentent une splénomégalie détectable à l'examen clinique (Milot 2005), tandis que certaines études établissent que la splénomégalie serait retrouvée chez la totalité des sujets (Tableau I). Par contre, les autres organes lymphoïdes ne sont que peu atteints et la recherche d'adénopathies et/ou d'une hépatomégalie ne sera fructueuse que chez environ 10% des patients.

L'importance de la splénomégalie est fondamentale car elle est liée à l'apparition de certains des symptômes cliniques (notamment l'asthénie et l'inconfort splénique) mais également à des manifestations biologiques. Sur l'hémogramme, au moment du diagnostic, les trois grandes lignées cellulaires (globules blancs, plaquettes et globules rouges) vont être atteintes.

La numération et la formule des globules blancs, qui est un élément capital du diagnostic de LMC, sont très perturbées. Le taux de globules blancs est supérieur à 20 G/L dans 95% des cas. Par ailleurs, 80% des enfants ont un taux de globules blancs supérieur à 100 G/L (taux médian de 242 G/L). Cette hyperleucocytose est constituée d'une importante myélémie (33,5% de précurseurs granuleux) et d'une très grande majorité d'éléments appartenant à la lignée granuleuse, notamment des polynucléaires neutrophiles (Milot 2005). Une hyper éosinophilie, une basophilie et de rares blastes sont retrouvés à la présentation classique de la maladie, en phase chronique.

Ces hyperleucocytoses majeures avaient déjà été remarquées dans une série de 10 patients, avec un taux médian de globules blanc de 311 G/L (Rowe 1984). Plus récemment, cette tendance a été confirmée avec un taux de globules blancs médian de 191 G/L chez 146 enfants et adolescents (Adler 2008).

Ainsi, au moment du diagnostic, on constate qu'il semble exister une différence entre la présentation de la maladie chez le sujet adulte et l'enfant. En effet, les hyperleucocytoses retrouvées chez l'enfant sont supérieures à celles que l'on pourra rencontrer chez le patient adulte. Parmi la multitude d'études réalisées chez l'adulte atteint de LMC, les taux de blancs médians ne dépassent que très rarement 150 G/L, avec une fourchette s'étalant de 12 à 174 G/L en moyenne.

Au niveau de la lignée érythroblastique, il semblerait que la majorité des enfants et adolescents présentent une anémie au moment du diagnostic. Une diminution du taux de l'hémoglobine est ainsi observée chez plus de 70% de ces patients. L'anémie est relativement modérée avec des taux d'hémoglobine ne chutant que très rarement en dessous de 8g/dl. En revanche, le syndrome anémique semble jouer une part importante dans la fatigue et l'asthénie ressenties par les patients (Millot 2005). La splénomégalie engendrée par le syndrome tumoral pourrait avoir un rôle dans l'anémie, notamment par un mécanisme de séquestration des globules rouges.

Au niveau de la lignée plaquettaire, une thrombocytose est volontiers associée à ce tableau biologique, 60% des enfants et adolescents, au moment du diagnostic, se présentant avec cette manifestation. La thrombocytose reste relativement modérée, avec un taux moyen de $651\,400/\text{mm}^3$. En revanche, la splénomégalie tendrait plus vers une diminution du nombre de plaquettes, on peut donc se demander si ces chiffres ne sont pas sous-estimés (Millot 2005). Toutefois, comme chez l'adulte, des hyperplaquettooses majeures peuvent être notées, allant jusqu'à $5\,500\,000/\text{mm}^3$ (Adler 2008).

Un myélogramme sera réalisé de manière systématique lorsque la pathologie sera suspectée. Tout comme dans la forme classique de la LMC chez l'adulte, une hyperplasie importante de la lignée granuleuse à tous les stades de maturation, sans anomalies morphologiques, sera observée. Le nombre de blastes sera, quant à lui, variable en fonction de la phase de la maladie.

4. Caryotype

Un caryotype conventionnel sera réalisé de manière systématique à la recherche du chromosome Philadelphie et d'éventuelles anomalies additionnelles chez les enfants et adolescents suspects d'être atteints de LMC. Tout comme chez l'adulte, la très grande majorité des patients sera porteuse de l'anomalie chromosomique, bien qu'il existe de très rares cas de LMC sans chromosome Philadelphie.

5. Biologie moléculaire

La physiopathologie de la LMC de l'enfant est la même que celle de l'adulte. De ce fait, les réarrangements moléculaires de type *BCR-ABL1* recherchés seront les mêmes. Les techniques qualitatives de RT-PCR multiplex utilisées chez le sujet adulte permettront également de détecter les réarrangements moléculaires les plus fréquents chez l'enfant. En effet, comme chez l'adulte, les principaux ARN messagers chimériques concernent l'exon 2 du gène *ABL1* sur le chromosome 9 et les exons 13 (ou b2) et 14 (ou b3) de la région M-*BCR* du gène *BCR* sur le chromosome 22. Dans de très rares cas, d'autres réarrangements moléculaires de type *BCR-ABL1* ont été mis en évidence au cours des différentes études.

5.1. Épidémiologie des principaux réarrangements moléculaires de *BCR-ABL1* chez l'enfant

Dès le début des années 90, une étude menée par Aurer *et coll.*, utilisant une technique classique de RT-PCR, retrouvait déjà, chez la totalité des patients, ces deux principaux réarrangements (Aurer 1991). Sur les 12 enfants étudiés, 10 présentaient un réarrangement moléculaire de type b2a2, tandis qu'un patient avait un réarrangement moléculaire de type b3a2 et le dernier exprimait simultanément les deux réarrangements. Les résultats observés à cette époque avaient mis en avant la plus grande fréquence du réarrangement type b2a2 par rapport au type b3a2 dans cette catégorie de population. La co-expression des deux ARN messagers chimériques avait également fait évoquer un mécanisme d'épissage alternatif de l'ARN.

Une étude menée en Inde, par l'équipe de Hasan *et coll.*, semblait confirmer chez l'enfant, une fréquence plus élevée de réarrangements moléculaires de type b2a2 que de type b3a2, et ce de manière significative (Hasan 2006). 32 patients sur 47, soit 68% de la cohorte, étaient détectés avec l'ARN messager chimérique de type b2a2. Par contre, aucun de ces patients ne présentait de co-expression des deux réarrangements, ni de réarrangements particuliers.

En revanche, pour Millot *et coll.* (Millot 2005), les résultats étaient contradictoires avec les conclusions précédemment citées. Sur les 16 patients testés en biologie moléculaire dans cette étude, on retrouvait le réarrangement de type b3a2 chez 10 d'entre eux, soit 63%. Aucun réarrangement particulier, ni aucune co-expression d'ARN messager chimérique n'avaient été retrouvés dans cette étude.

La dernière étude qui s'est intéressée à ce sujet a été réalisée par Adler *et coll.*, et regroupait une cohorte beaucoup plus importante de patients permettant d'apporter plus de puissance aux résultats trouvés. Aucune différence significative n'a été retrouvée quant à l'expression de ces deux ARN messagers chimériques, sur 146 patients, 55 (soit 38%) présentaient le réarrangement de type b2a2, tandis que 53 (soit 36%) présentaient le réarrangement de type b3a2 (Adler 2008). Par contre sur les 146 patients testés par RT-PCR, la co-expression des deux types de réarrangements (b2a2 et b3a2) a été retrouvée chez 38 patients (soit 26%). En Allemagne, une proportion similaire de double réarrangement a été observée chez l'adulte.

En ce qui concerne la répartition des deux principaux réarrangements moléculaires dans la LMC de l'enfant, les résultats retrouvés sont donc discordants et aucune conclusion n'est possible à ce niveau alors que chez le sujet adulte une plus grande prévalence de sujet exprimant le réarrangement moléculaire de type b3a2 a été démontrée.

5.2. Autres types de réarrangements moléculaires détectés chez

l'enfant

Le cas d'une jeune fille de 16 ans a été rapporté par Van der Velden *et coll.* (Van der Velden 2007) en 2007. Admise à l'hôpital pour asthénie et céphalées, le diagnostic de LMC a

rapidement été porté (hépato-splénomégalie, 399 G/L de globules blancs avec 86% de cellules myéloïdes à tous les stades, éosinophilie, basophilie) et confirmé par le caryotype qui retrouvait la translocation t(9;22)(q34;q11) et la présence du gène de fusion *BCR-ABL1* en FISH. En revanche, il a fallu séquencer le produit obtenu en PCR temps réel pour s'apercevoir qu'il s'agissait d'un réarrangement moléculaire incluant l'exon 2 sur le gène *ABL1* et l'exon 18 sur le gène *BCR*, le réarrangement e18a2.

5.3. Corrélation entre le type de réarrangement moléculaire et les signes présents au diagnostic

5.3.1. Le sexe

Dans l'étude de Adler *et coll.* (Adler 2008), le deuxième résultat surprenant est la corrélation significative statistiquement mise en évidence par les auteurs entre l'expression du type de réarrangement et le sexe du patient.

En effet, ils ont montré que les filles exprimaient préférentiellement le réarrangement moléculaire de type b3a2 (17 garçons (25%) pour 36 filles (45%)), alors que les garçons exprimaient préférentiellement le réarrangement moléculaire de type b2a2 (34 garçons (51%) pour 21 filles (27%)). En revanche, il n'y avait pas de corrélation significative quant à la co-expression de ces deux ARN messagers chimériques par rapport au sexe du patient.

(Tableau II).

Cette observation n'a pas été retrouvée dans d'autres études sur la LMC.

Transcript	Gender		Total
	Female	Male	
b2a2	21 (27%)	34 (51%)	55
b3a2	36 (45%)	17 (25%)	53
b2a2 + b3a2	22 (28%)	16 (24%)	38
Total	79 (100%)	67 (100%)	146

Tableau II : Répartition des différents réarrangements moléculaires en fonction du sexe. (Adler 2008).

Bien que la compréhension de ce mécanisme soit ouverte à la spéculation, des études neuro-endocrinologiques suggèrent une relation entre les hormones sexuelles et des mécanismes d'épissage alternatif sur les ARN messagers (Mahmoud 2004), (Zhu 2005).

Chez le sujet adulte, une publication qui aborde la corrélation entre le sexe et le réarrangement moléculaire, réalisée chez 250 patients mexicains, retrouve des résultats totalement inverses. Dans cette étude, les sujets masculins expriment plus fréquemment le réarrangement b3a2 (44% d'hommes et 34% de femmes) (Arana-Trejo 2002).

5.3.2 Les signes cliniques

Aucune corrélation significative n'a encore été mise en évidence entre le type de réarrangement moléculaire et la splénomégalie, ni l'hépatomégalie.

Aucune corrélation significative n'a été mise en évidence entre l'âge du patient et le type de réarrangement moléculaire.

5.3.3 Les signes biologiques

5.3.3.1. Paramètres pour lesquels une corrélation a été mise en évidence

Dans la cohorte allemande, chez les enfants et adolescents exprimant le réarrangement de type b3a2, les taux de plaquettes sont significativement plus élevés. En effet, dans ce groupe, le taux médian de plaquettes est de 624 G/L, tandis que chez les patients exprimant le réarrangement de type b2a2, les taux de plaquettes sont normaux, avec un taux médian de plaquettes de 280 G/L (Adler 2008). De plus, dans le sous-groupe des patients exprimant b3a2, il y a une corrélation entre des taux élevés de plaquettes (supérieurs à 800 G/L) et des taux élevés de globules blancs (supérieurs à 100 G/L).

En revanche, les patients exprimant le réarrangement de type b2a2 ont des taux d'hémoglobine significativement plus importants (taux médian d'hémoglobine 11.1 g/dl) que ceux exprimant b3a2 (taux médian d'hémoglobine 10.2 g/dl) ou les deux types de réarrangements moléculaires (taux médian d'hémoglobine 10.2 g/dl). Toutefois, tous ces patients présentent une anémie au moment du diagnostic.

Dans la moelle osseuse, un plus faible pourcentage de blastes est significativement corrélé à la co-expression des deux ARN messagers chimériques (Adler 2008).

5.3.3.2. Paramètres pour lesquels aucune corrélation n'a été mise en évidence

Dans cette même étude (Adler 2008), aucune corrélation n'a été mise en évidence entre le type de réarrangement moléculaire et le pourcentage de blastes dans le sang circulant, la proportion de promyélocytes dans la moelle osseuse, la proportion de polynucléaires éosinophiles et basophiles que ce soit dans le sang circulant ou dans la moelle osseuse, ni le taux de globules blancs dans le sang périphérique.

5.3.4. La réponse moléculaire au traitement

Dans une étude menée par Suttorp *et coll.* (Suttorp 2010), la réponse moléculaire de 30 patients atteints de LMC âgés de 1 à 17 ans est analysée. 12 patients expriment le réarrangement b2a2, le reste exprime le réarrangement b3a2. Ces enfants sont traités par dose fixe d'Imatinib (250 mg/m²). Le ratio *BCR-ABL1/ABL1* est dosé par technique de RT-PCR quantitative tous les trois mois pendant un an à partir du troisième mois de traitement.

Au troisième mois après le début du traitement, les patients exprimant b3a2 ont un ratio moyen *BCR-ABL1/ABL1* plus élevé que les patients exprimant b2a2 (Tableau III).

		3 month	6 month	9 month	12 month
e13a2	n	12	10	7	6
	mean	3.659%	0.558%	0.337%	0.358%
	median	2.500%	0.200%	0.050%	0.200%
	range	0.420%-12.500%	0.010%-2.750%	0.020%-1.350%	0.000%-1.380%
e14a2	n	18	13	12	7
	mean	7.044%	1.260%	0.731%	0.410%
	median	2.750%	0.190%	0.085%	0.340%
	range	0.070%-29.420%	0.000%-6.730%	0.000%-4.670%	0.000%-1.210%

Tableau III : Réponse moléculaire au traitement en fonction du type de réarrangement moléculaire. (Suttorp 2010).

Du troisième au neuvième mois, le ratio *BCR-ABL1/ABL1* moyen est environ 2 fois supérieur dans le groupe de patients exprimant b3a2 que dans le groupe de patients exprimant b2a2.

En revanche, dans le groupe de patients exprimant b3a2, la décroissance de la valeur absolue du ratio *BCR-ABL1/ABL* est plus rapide que dans le groupe de patients exprimant b2a2 (Figure 25). Toutefois, ces résultats ne sont pas significatifs statistiquement du fait du petit nombre de sujets étudiés. Cependant, l'hypothèse que l'expression du réarrangement b3a2 soit en faveur d'une meilleure réponse au traitement par Imatinib a déjà été évoquée chez le sujet adulte (Lucas 2009).

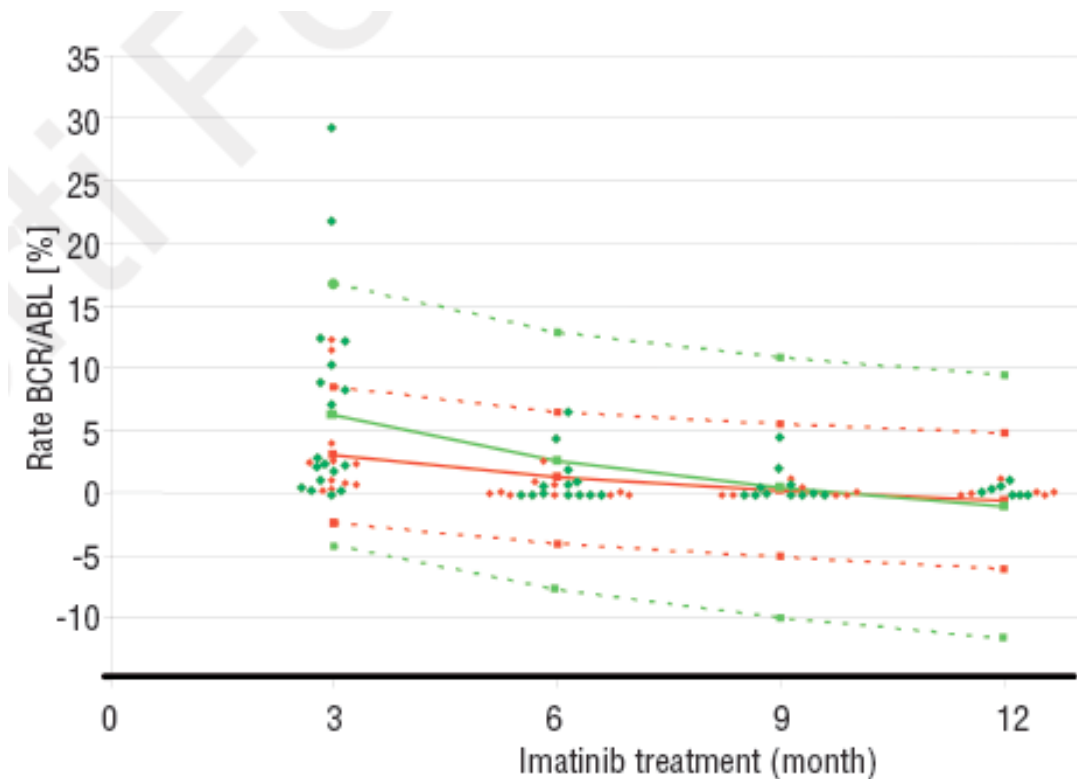


Figure 25 : Décroissance du ratio *BCR-ABL1/ABL* en fonction du type de réarrangement moléculaire (b2a2 en rouge, b3a2 en vert) (Suttorp 2010).

6. Pronostic

6.1. Evolution naturelle

L'histoire naturelle de la LMC de l'enfant évolue selon trois phases comme chez le sujet adulte : la phase chronique, la phase accélérée et la phase blastique. Environ 95% des enfants se présentent à la phase chronique de la maladie (Milot 2005).

La classification WHO de 2002 (Vardiman 2002), qui précisait les critères définissant les différentes phases, a été révisée en 2013 par Baccarani *et coll.* (Baccarani 2013), avec l'introduction des critères européens de l'ELN (*European Leukemia Net*).

D'après les critères du WHO (2013) :

- la phase accélérée est définie par : un pourcentage de blastes compris entre 10 et 19% dans le sang ou la moelle osseuse, plus de 20% de polynucléaires basophiles circulants, une thrombopénie ($<100\text{G/L}$) sans traitement, une thrombocytose ($>1000\text{G/L}$) malgré le traitement ou une augmentation de la splénomégalie ou de la numération des globules blancs, des anomalies cytogénétiques additionnelles dans les cellules avec le chromosome Philadelphie.

- la phase blastique est définie par un pourcentage de blastes supérieur à 20% dans le sang ou la moelle osseuse, une prolifération extra-médullaire de blastes à l'exception de la rate, e larges foyers ou groupes de blastes sur la BOM (biopsie ostéo-médullaire)

D'après les critères ELN (2013) :

- la phase accélérée est définie par : un pourcentage de blastes compris entre 15 et 29% ou un pourcentage de blastes plus promyélocytes supérieur à 30% dans le sang ou la moelle osseuse, plus de 20% de polynucléaires basophiles circulants, une thrombopénie ($<100\text{G/L}$) sans rapport avec le traitement, une thrombocytose ($>1000\text{G/L}$) malgré le traitement, des anomalies cytogénétiques additionnelles dans les cellules avec le chromosome Philadelphie.

- la phase blastique est définie par un pourcentage de blastes supérieur à 30% dans le sang ou la moelle osseuse, une prolifération extra-médullaire de blastes à l'exception de la rate.

6.2. Facteurs pronostiques

Dans une étude menée par Castro-Malaspina *et coll.*, 14 caractéristiques ont été étudiées comme facteurs prédictifs de mauvaise évolution de la maladie. Seul le pourcentage de blastes que ce soit dans le sang circulant ou dans la moelle osseuse est retrouvé comme facteur de mauvais pronostic. Ainsi ni l'âge, ni le sexe, ni le degré du syndrome tumoral (splénomégalie, hépatomégalie, atteintes ganglionnaires), ni le taux d'hémoglobine, ni la numération des globules blancs, ni le pourcentage de granuleux immatures, ni l'éosinophilie, ni la basophilie, ni le taux de plaquettes dans le sang circulant ne semblaient influencer le pronostic de la LMC (Castro-Malaspina 1983). Cependant, cette étude regroupait à la fois des diagnostics de LMC chez l'enfant mais aussi de LMMC juvénile (leucémie myélo-monocytaire chronique).

Plus récemment, un des scores pronostiques utilisé chez l'adulte, le score Sokal, a été adapté pour les sujets atteints de LMC de moins de 45 ans (Sokal 1984), (Sokal 1985). Il prend en compte la taille de la rate, différents facteurs dans le sang circulant (le pourcentage de blastes, le taux de plaquettes et le pourcentage d'hématocrite et le sexe, au moment du diagnostic) (Figure 26).

Il est calculé selon la formule : Score de Sokal = $(0,0255 \times (\text{rate} - 8,14)) + 0,0324 \times (\text{blastes} - 2,22) + 0,1025 \times (\text{plaquettes}/700)^2 - 0,0627 - 0,0173 \times (\text{hématocrite} - 34,2) \times (\text{sexe} - 1,40)$.

Les patients sont ainsi classés en fonction de ce score en faible risque, risque intermédiaire et risque élevé.

Taille de la rate (en cm)			
Plaquettes (G/L)			
Blastes sanguins (%)			
Hématocrite (%)			
Sexe			
Total		< 0,8	Risque faible
		0,8 - 1,2	Risque intermédiaire
		> 1,2	Risque élevé

Figure 26 : Le score de Sokal pour les sujets de moins de 45 ans.

Un nouveau score est apparu pour prédire la rémission cytogénétique complète (RCC) 18 mois après le début du traitement, le score EUTOS (Hasford 2011). Les facteurs prédictifs les plus puissants pour l'évaluation d'une RCC à 18 mois sont la taille de la rate (mesurée en cm sous le rebord costal) et le pourcentage de polynucléaires basophiles dans le sang circulant.

Le score EUTOS peut être calculé selon la formule :

$$\text{Score EUTOS} = (7 \times \text{basophiles}) + (4 \times \text{taille de la rate}).$$

Si cette somme est supérieure à 87, le patient présente un risque élevé de ne pas atteindre une RCC à 18 mois sous traitement, tandis que si cette somme est inférieure ou égale à 87, le patient présente un faible risque de ne pas atteindre une RCC à 18 mois sous traitement.

7. Traitement

Avant l'introduction des ITK chez l'enfant dans la pratique courante, en 2003, le traitement de choix chez l'enfant était l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Cependant, pour les enfants n'ayant pas recours à ce type de traitement, la première ligne thérapeutique était constituée par de l'interféron alpha.

7.1. L'interféron alpha (IFN α)

L'interféron alpha est un agent immunomodulateur actif dans la LMC qui a permis d'obtenir des rémissions cytologiques complètes et durables chez certains patients. Cependant, les effets indésirables sont importants et nécessitent souvent l'arrêt du traitement.

L'étude de Giona *et coll.* décrit le résultat à moyen terme de 30 patients diagnostiqués avec la LMC dans l'enfance et l'adolescence entre 1980 et 2001. La survie globale à 8 ans de 17 enfants traités par l'IFN α était de 63% comparativement à 61% des 13 enfants traités par allogreffe de CSH mais tous les bénéficiaires de l'IFN α avaient une maladie résiduelle (Giona 2005).

En France en 2006, 14 enfants ont été recrutés dans un essai de phase II testant l'association de l'IFN α et de la cytarabine. Une rémission hématologique complète (RHC) a été obtenue chez 7 des 12 enfants évaluable (58%) à 3 mois, une rémission cytogénétique majeure (RCM) chez 7 des 11 évaluable (50%) et une rémission cytogénétique complète (RCC) dans 2 cas sur 7 évaluable (14 %) à 12 mois. Cependant, à 13 mois, pour 13 enfants,

le traitement avait été modifié pour soit de l'Imatinib soit la réalisation d'une allogreffe de CSH et une toxicité de grade 3-4 a été retrouvée pour 8 enfants (Millot 2006). Ces chiffres sont superposables aux résultats obtenus chez l'adulte.

7.2. Allogreffe de CSH

L'allogreffe de CSH reste à l'heure actuelle le seul traitement curatif de la LMC de l'enfant et de l'adolescent (Shenoy 2008).

L'équipe de Cwynarski *et coll.* étudie la survie globale à 3 ans de 315 enfants atteints de LMC. La survie globale est de 75% pour les enfants transplantés avec un donneur apparenté à la phase chronique de la maladie contre 46% lorsque le donneur n'est pas apparenté ou non apparié. En fonction du stade de la maladie, la survie globale passe de 65% à la phase chronique à 39% en phase avancée pour les transplantés non apparentés (Cwynarski 2003). De plus, la mortalité liée à la transplantation est plus élevée pour les transplantés non appariés que pour les apparentés et pour les patients en phase accélérée que les patients en phase chronique.

Une autre étude menée par Suttorp *et coll.*, chez 176 enfants et adolescents retrouve une survie globale à 5 ans de 87% pour les transplantations avec donneur apparenté contre 45% pour les transplantations avec donneur non apparié (Suttorp 2009).

Dans une étude de 2003, en France, 66 enfants sont étudiés après allogreffe de CSH (Millot 2003). La survie globale chez les patients en phase chronique est de 73% contre 27% chez les patients en phase avancée de la maladie. La principale cause de décès liée à la greffe est la réaction du greffon contre l'hôte (GVH).

Des perfusions de lymphocytes compétents du donneur sont efficaces sur la réaction du greffon contre la leucémie (GVL) notamment à la phase chronique de la maladie, puisque que l'on observe des retours en rémission cytogénétique et même moléculaire. L'utilisation des ITK en post-greffe permet aussi d'obtenir des rémissions cytogénétique et moléculaire. Le choix de la thérapeutique dans ce contexte est cependant très discutée (Huff 2006).

Pour limiter la toxicité de la greffe, l'utilisation d'un conditionnement d'intensité réduite a été étudiée chez l'enfant mais les résultats obtenus sont clairsemés et non informatifs (Horn 2006).

A l'heure actuelle en France, chez l'enfant et l'adolescent, la première ligne de traitement de la LMC est constituée par l'utilisation de l'Imatinib. L'allogreffe de CSH ne trouve sa place qu'en deuxième ou troisième ligne de traitement proposée en fonction de la phase de la maladie et de l'efficacité des ITK (Andolina 2012).

7.3. Les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK)

7.3.1. Evaluation de l'efficacité de l'Imatinib chez l'enfant et l'adolescent

La première étude sur le sujet est menée par Champagne *et coll.* lors d'un essai de phase 1 mené chez 31 enfants atteints de LMC. Ils reçoivent des doses d'Imatinib allant de 260 à 570mg/m², afin d'étudier sa tolérance. La dose tolérée maximale n'a pas pu être identifiée, du fait de la très bonne tolérance de la molécule avec moins de 5% des patients présentant des effets indésirables de grade 1 ou 2 (Champagne 2004).

A l'issue de cette étude, il a été établi que la dose de 260 à 340 mg/m² est équivalente à la dose standard de 400 mg chez l'adulte en termes d'exposition à la drogue.

44 enfants atteints de LMC en phase chronique sont recrutés pour un essai de phase 4 dans une étude française et traités par Imatinib à la dose de 260 mg/m². Une réponse hématologique complète est obtenue chez 98% des patients, tandis qu'une réponse cytogénétique complète est obtenue pour 61% des patients et une réponse moléculaire majeure dans 31% des cas, à 1 an (Millot 2011). Durant tout le suivi de l'étude, la RCC a été obtenue pour 77% des enfants et la RMM pour 57% d'entre eux. Cependant, pour environ 30% des patients, le traitement a été arrêté pour cause de réponse non satisfaisante, avec poursuite soit par un traitement par ITK de seconde génération ou réalisation d'une allogreffe de CSH.

Une étude de l'efficacité de l'Imatinib est menée sur 30 enfants à « haut risque » par Millot *et coll.*, en 2006. Ces enfants présentent soit une phase chronique tardive (résistance au traitement par Interféron), soit une phase avancée de la maladie ou une rechute après allogreffe de CSH. Après traitement par Imatinib, à la dose 260 mg/m² ou 340 mg/m², une RHC est obtenue chez 80% et une RCC chez 60% des patients en phase chronique tardive

tandis qu'une RHC est obtenue chez 75 % et une RCC chez 29% des patients en phase avancée de la maladie (Milot 2006).

7.3.2. Effets indésirables spécifiques à l'enfant

Récemment, chez l'enfant, des troubles du métabolisme osseux ont été décrits avec de véritables problèmes de retard de croissance, notamment lorsque le traitement est instauré en phase pré-pubertaire.

Dans une étude sur 48 enfants traités par Imatinib, Shima *et coll.*, rapportent une diminution de taille chez 73% de patients avec un écart de -0,61 DS (déviatiion standard) après 34 mois de suivi de traitement (Shima 2011). Par rapport au début du traitement, Milot *et coll.*, ont aussi rapporté une diminution de - 0,37 DS chez des enfants traités par Imatinib et suivis pendant un an (Milot 2009).

De nombreuses recherches sont alors parues pour expliquer ce phénomène. Pour Vandyke *et coll.*, ce problème concerne le remodelage osseux, portant notamment sur les os longs. Il serait lié à l'action de l'Imatinib sur les PDGFR A et B et sur le récepteur de c-Kit, favorisant en conditions physiologiques l'action des ostéoblastes et inhibant l'action ostéoclastique (Vandyke 2010). En effet, il semble que les paramètres biologiques intéressants le remodelage osseux soient perturbés par l'action de l'Imatinib. Dans l'étude de Jaeger *et coll.*, 8 patients sur 17 développent une hyperparathyroïdie secondaire et 15 sur 17 ont des taux très bas de vitamine D (Jaeger 2012). Pour Narayanan *et coll.*, l'Imatinib agirait sur l'axe de sécrétion des hormones de croissance, la GH et l'IGF-1. Dans leur étude, 7 patients sur 18 ont un déficit en GH, tandis que 89% d'entre eux ont des taux d'IGF-1 inférieurs à la moyenne (Narayanan 2013).

En conclusion, lors du suivi des enfants traités par Imatinib au long cours, surtout en phase pré-pubertaire, une surveillance accrue de la croissance et du métabolisme osseux est maintenant recommandée (Andolina 2012).

7.3.3. Evaluation de l'efficacité du Dasatinib chez l'enfant et l'adolescent

Chez l'enfant, un essai de phase I a été réalisé par Aplanc *et coll.* chez 9 patients atteints de LMC (Aplanc 2011). L'escalade de doses va de 50 à 110 mg/m², sans qu'il y ait de

dose-limités toxiques. Les effets indésirables répertoriés sont similaires à ceux de l'Imatinib, avec cependant, quelques patients ayant présenté des épanchements pleuraux et des hémorragies digestives. Les effets indésirables de grade 3 ou 4 sont une hypokaliémie et une diarrhée. Au niveau de l'efficacité, les auteurs observent 3 RCC et 3 réponses cytogénétiques partielles.

Un deuxième essai de phase I/II est mené par Zwaan *et coll.* chez 58 enfants dont certains pré-traités par Imatinib avec une LMC ou avec une LAL à chromosome Philadelphie (Zwaan 2013). Les doses étudiées vont de 60 à 120 mg/m². Les principaux effets indésirables sont, par ordre de fréquence, les nausées (31%), les céphalées (22%), les diarrhées (21%) et les vomissements (17%) avec des effets de grade 3 ou 4 chez 3 patients. En phase chronique, sur 17 patients, 14 (82%) présentent une RCC et 8 (47%) une RMM. En phase accélérée ou avec une LAL, sur 17 patients, 6 (35%) présentent une RHC et 11 (65%) une RCC.

7.3.4. Evaluation de l'efficacité du Nilotinib chez l'enfant et l'adolescent

Chez les jeunes patients, il n'existe pas encore de données disponibles sur l'utilisation du Nilotinib, il y a donc un besoin urgent d'essais cliniques bien conçus dans cette population de patients.

Réarrangements moléculaires
BCR-ABL1 au diagnostic dans
une cohorte pédiatrique
française : étude personnelle

I. Objectifs

La LMC est principalement une pathologie du sujet adulte, mais peut également survenir, de manière plus rare, chez l'enfant et l'adolescent. A l'heure actuelle, le diagnostic de cette pathologie repose sur un faisceau d'arguments cliniques et biologiques. Au diagnostic, il est primordial de détecter et de typer les réarrangements moléculaires *BCR-ABL1* pour permettre le suivi des patients et évaluer la réponse au traitement.

Des disparités de répartition des réarrangements moléculaires *BCR-ABL1* ont été rapportées dans les différentes séries publiées tant chez le sujet adulte que chez l'enfant et l'adolescent. En effet, dans la LMC, la prédominance de l'expression de l'un des deux réarrangements principaux (b2a2 ou b3a2), est controversée. De même, la proportion de patients qui co-expriment ces deux réarrangements simultanément varie entre 0 et 26 % selon les études. Elle représente cependant toujours la fraction de patients la plus faible. Un des premiers objectifs de cette étude était de voir s'il existe un réarrangement *BCR-ABL1* prédominant et si le nombre de doubles transcrits (b2a2 et b3a2) de la cohorte pédiatrique française est corrélé aux données déjà publiées, et dans le cas contraire d'essayer de comprendre les raisons de ces disparités.

Dans un premier temps, nous avons analysé les événements pouvant expliquer la co-expression de deux ARN messagers matures *BCR-ABL1* différents, au sein d'une même cellule leucémique. Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique de ce travail, les mécanismes d'épissage alternatif au niveau des ARN *BCR-ABL1* sont une hypothèse séduisante d'explication. Selon l'hypothèse de Branford *et coll.*, des patients pourraient donc co-exprimer deux réarrangements *BCR-ABL1*, mais sont-ils détectés par les techniques de biologie moléculaire actuelles et y-a-t'il un intérêt à les détecter, autrement dit, ces patients ont-ils des particularités clinico-biologiques nécessitant une prise en charge particulière ?

A partir des résultats issus de la cohorte pédiatrique française, nous nous sommes interrogés sur les types de techniques de détection des réarrangements *BCR-ABL1* utilisées pour le diagnostic. En effet, contrairement à la cohorte allemande où les analyses moléculaires sont réalisées en monocentrique, les analyses de la cohorte française sont réalisées en multicentrique, d'où un risque potentiel de non harmonisation des résultats. Nous avons

réalisé pour cela une revue critique des techniques de biologie moléculaire utilisées dans les différents centres. Ainsi, l'objectif majeur de ce travail était de vérifier l'homogénéité des résultats recensés afin d'obtenir une répartition précise des réarrangements moléculaires *BCR-ABL1* au moment du diagnostic au sein de la cohorte.

Dans un deuxième temps, notre objectif était de vérifier l'existence d'éventuelles corrélations entre les types de réarrangements moléculaires *BCR-ABL1* et les données clinico-biologiques au diagnostic. En effet, dans la population pédiatrique, peu d'études ont été menées sur le sujet mais quelques auteurs rapportent des discordances dans la présentation de la maladie par rapport au sujet adulte.

II. Méthodologie

1. Description de l'étude

Nous avons réalisé une étude multicentrique rétrospective sur une cohorte française de 134 enfants et adolescents atteints de LMC, mineurs au moment du diagnostic, quels que soit la phase de la maladie et le type de traitement adopté. Les patients ont été recrutés dans 27 centres nationaux, certains pouvant être inclus dans des protocoles thérapeutiques.

Les critères d'inclusion étaient donc :

- un diagnostic certain de LMC, posé entre janvier 2000 et octobre 2012, en France. Ce diagnostic repose sur l'association d'une hyperleucocytose avec hyperplasie de la lignée granuleuse sans anomalies morphologiques, la présence du chromosome Philadelphie détecté par analyse cytogénétique (caryotype conventionnel ou FISH), la détection et la quantification d'un type de réarrangement moléculaire *BCR-ABL1*,
- un âge inférieur à 18 ans,
- une technique qualitative de biologie moléculaire permettant la détection de tous les types de réarrangements moléculaires au diagnostic (RT-PCR multiplex).

2. Recueil des données

Le recueil de données clinico-biologiques des patients a été effectué à partir d'une extraction des patients français issus de la base de données du registre international de LMC pédiatrique par Mme ZIN-KA-IEU (Centre d'Investigation Clinique, Unité 802 INSERM). Nous avons pu ainsi récupérer des données, pour chacun des patients, au moment du diagnostic et au cours de leur évolution.

Au diagnostic, les données recueillies étaient :

- l'état civil : sexe, date de naissance,
- la présence ou non d'une splénomégalie palpable et sa taille sous le rebord costal,
- le score de Lansky (ou performance status),
- la numération et la formule sanguine : taux de globules blancs, taux de plaquettes, taux d'hémoglobine, pourcentage de polynucléaires basophiles, pourcentage de la myélémie, pourcentage de blastes et de promyélocytes,
- le pourcentage de blastes et de promyélocytes dans la moelle osseuse,

- les résultats des analyses de cytogénétique : recherche de la translocation t(9 ;22),
- les résultats des analyses de biologie moléculaire : type de réarrangement moléculaire *BCR-ABL1*.

La phase de la maladie dans laquelle se présentaient les patients a été déterminée d'après les critères de l'ELN 2013. Au diagnostic, la phase accélérée était définie par :

- un pourcentage de blastes sanguins compris entre 15 et 29%,
- ou un pourcentage de blastes plus promyélocytes supérieur à 30% dans le sang ou la moelle osseuse,
- ou plus de 20% de polynucléaires basophiles circulants.

La phase blastique était définie par :

- un pourcentage de blastes supérieur à 30% dans le sang ou la moelle osseuse,
- ou une prolifération extra-médullaire de blastes à l'exception de la rate.

Le score de Sokal chez le sujet de moins de 45 ans a été calculé par la formule qui prend en compte : la taille de la rate (en cm), le taux de plaquettes, le pourcentage de blastes dans le sang circulant, le taux d'hématocrite et le sexe. Il nous a permis de classer ces patients en groupes de risque faible, intermédiaire et élevé.

Le score EUTOS a été calculé en utilisant la taille de la rate sous le rebord costal (en cm) et le pourcentage de polynucléaires basophiles sanguins. Les patients ont pu ainsi être classés en risque faible ou élevé.

Au diagnostic, l'analyse moléculaire a été réalisée soit sur un prélèvement de moelle osseuse soit sur un prélèvement sanguin.

Des données complémentaires ont été recueillies auprès des différents laboratoires de biologie moléculaire ayant effectué le diagnostic de LMC chez ces patients. Pour chacun des centres concernés dans cette étude, nous avons demandé des précisions sur le type de technique de biologie moléculaire réalisé au moment du diagnostic afin de nous assurer de la détection de tous les types de réarrangement *BCR-ABL1*. Nous avons ainsi pu obtenir des informations pour l'ensemble des laboratoires à l'exception de celui du CHU de Saint-Denis à la Réunion.

3. Analyses statistiques

3.1. Analyse descriptive : présentation initiale

L'analyse descriptive a été réalisée sur l'ensemble de la cohorte puis par sous-groupes, selon la phase de la maladie et selon le type de réarrangement.

Tous les paramètres étudiés ont été décrits :

- pour les variables continues par leur effectif, médiane, et extrêmes ;
- pour les variables qualitatives par leur effectif, pourcentage et intervalle de confiance si nécessaire.

3.2. Analyses comparatives : comparaisons des paramètres étudiés

à l'inclusion selon le type de réarrangement

Les paramètres étudiés n'ayant pas une distribution gaussienne le plus souvent d'une part, et certains effectifs étant faibles d'autre part, les tests mis en œuvre pour les comparaisons des groupes et sous-groupes d'intérêt pertinents sont non paramétriques :

- test de l'ordre des rangs de Wilcoxon et test de Kruskal et Wallis et pour les variables quantitatives et ordinales,
- test exact de Fisher pour les variables qualitatives.

Le seuil de significativité retenu est $\alpha = 0,05$. Toutes les analyses sont bilatérales.

L'analyse statistique a été réalisée par Madame GUILHOT-GAUDEFFROY (Centre d'Investigation Clinique, Unité 802 INSERM) à l'aide du logiciel SAS (SAS Institute, Cary, NJ v.8).

III. Résultats

1. Les centres participant à l'étude et le type de technique utilisé

Vingt-sept centres ont participé à l'inclusion de 134 patients lors de cette étude. Les analyses moléculaires ont été effectuées dans 25 laboratoires différents. En effet, les tests moléculaires des centres de Paris Saint-Louis, Paris Trousseau et Paris Robert Debré ont été effectués dans le laboratoire de l'Hôpital Saint Louis, qui regroupe ainsi un tiers des patients de l'étude (45).

1.1. Méthodes utilisées par les différents laboratoires

Parmi les 24 laboratoires ayant répondu favorablement à notre enquête, 23 utilisent des techniques de RT-PCR multiplex et un seul une technique de RT-PCR monoplex. Le mode de révélation est généralement une électrophorèse sur gel d'agarose avec marquage des produits amplifiés par le bromure d'éthidium.

La méthode de RT-PCR monoplex (1 laboratoire) permet de mettre en évidence les réarrangements classiques dans *M-BCR* (b2a2, b3a2).

Les techniques de RT-PCR multiplex (23 laboratoires) sont des méthodes soit développées localement, soit dérivant de méthodes publiées (Cross 1994, van Dongen 1999). Ces méthodes permettent toutes le dépistage des réarrangements b2a2, b3a2, mais aussi du réarrangement e1a2, et pour certaines la détection de réarrangements *BCR-ABL1* plus rares (e19a2) ou atypiques grâce à des amorces *BCR* supplémentaires. Les protocoles utilisés sont généralement issus de recommandations scientifiques.

Les techniques de détection des différents laboratoires permettent donc, au minimum, la détection des principaux réarrangements moléculaires *BCR-ABL1* (b2a2 et b3a2), c'est-à-dire ceux intéressant la région de cassure majeure du gène *BCR* (*M-BCR*). Ceci a été clairement démontré lors des 3 dernières sessions du contrôle de qualité du GBMHH (groupe des biologistes moléculaires des hémopathies malignes) où la presque totalité des 43 laboratoires participants détecte les réarrangements b2a2, b3a2 et e1a2.

Centres	Nombre de patients	Technique détection	Détection des réarrangements b2a2, b3a2 et b2a2+b3a2
Amiens	1	RT-PCR multiplex (1)	oui
Angers	2	RT-PCR multiplex (2)	oui
Besançon	3	RT-PCR multiplex (2)	oui
Bordeaux	6	RT-PCR multiplex (2)	oui
Brest	3	RT-PCR multiplex (2)	oui
Clermont	1	RT-PCR multiplex (2)	oui
Dijon	2	RT-PCR multiplex (2)	oui
Grenoble	3	RT-PCR multiplex (2)	oui
Lille	10	RT-PCR multiplex (2)	oui
Lyon	5	RT-PCR multiplex (2)	oui
Montpellier	3	RT-PCR multiplex (2)	oui
Nantes	5	RT-PCR multiplex (2)	oui
Nice	2	RT-PCR multiplex (2)	oui
Paris Saint-Louis	45	RT-PCR multiplex (1)	oui
Paris Trousseau			
Paris Robert Debré			
Poitiers	4	RT-PCR multiplex (1)	oui
Reims	1	RT-PCR monoplex (3)	oui
Rennes	4	RT-PCR multiplex (1)	oui
Rouen	2	RT-PCR multiplex (2)	oui
St Etienne	7	RT-PCR multiplex (2)	oui
Strasbourg	3	RT-PCR multiplex (2)	oui
Toulouse	2	RT-PCR multiplex (2)	oui
Tours	7	RT-PCR multiplex (2)	oui
Nancy	5	RT-PCR multiplex (2)	oui
Marseille	6	RT-PCR multiplex (2)	oui
La réunion	2	<i>Pas de renseignement</i>	
Total : 27	134		oui

Tableau IV : Les différents centres inclus dans l'étude et le type de technique utilisé : (1) méthodes dérivées des travaux de Cross 1994 ou van Dongen 1999, (2) autres méthodes de RT-PCR multiplex, (3) RT-PCR monoplex dérivée de la publication de Kawazaki 1988 (Kawasaki 1988).

Ainsi tous les laboratoires sont capables de détecter les ARN *BCR-ABL1* chimériques principaux mais également la co-expression de deux ARN *BCR-ABL1*, comme l'expression simultanée de b2a2 et de b3a2.

Le choix des amorces utilisées au cours de la technique de RT-PCR multiplex était propre à chaque laboratoire. Tous les centres n'utilisaient donc pas des amorces identiques dans leur mélange de RT-PCR, bien que toujours spécifiques des ARN étudiés. Ceci ne posait donc pas de problème pour détecter d'éventuels doubles transcrits.

Par ailleurs, certains de ces laboratoires utilisaient également des amorces supplémentaires permettant la détection des réarrangements *BCR-ABL1* dits « atypiques ». Les centres qui ne bénéficiaient pas de ce type de techniques plus spécialisées, sous-traitaient cette analyse. En effet, ils envoyaient leurs prélèvements aux centres détectant les réarrangements « atypiques ». L'envoi des prélèvements n'a lieu que lorsque la suspicion clinique de LMC est forte et que la détection d'un réarrangement *BCR-ABL1* est négative tandis que l'étude cytogénétique met en évidence la translocation réciproque t(9;22)(q34;q11).

Au cours de la période d'inclusion, certains centres avaient modifié leur technique de détection des réarrangements *BCR-ABL1*. Cependant, ce changement n'a pas modifié la sensibilité de détection des réarrangements *BCR-ABL1*.

1.2. Les méthodes de RT-PCR multiplex de référence

Deux méthodes de RT-PCR multiplex décrites dans la littérature (Cross 1994, Van Dongen 1999) peuvent être considérées comme des méthodes de référence. Le travail de Van Dongen a d'ailleurs été financé par BIOMED1 dans le cadre de la standardisation de la détection des différents ARNm chimériques observées dans la LMC ou les leucémies aiguës.

Schématiquement, les amorces utilisées pour la détection des réarrangements de la région M-*BCR* dans les deux études sont décrites dans la figure 27. Ces amorces sont soit très proches, soit partiellement chevauchantes. Ainsi, lors de la RT-PCR multiplex, les amorces spécifiques des ARN *BCR* sont localisées le plus souvent au niveau de l'exon b2 et les amorces spécifiques des ARN *ABL1* au niveau de l'exon a3. Cette disposition permet ainsi la détection des réarrangements atypiques b2a3 et b3a3.

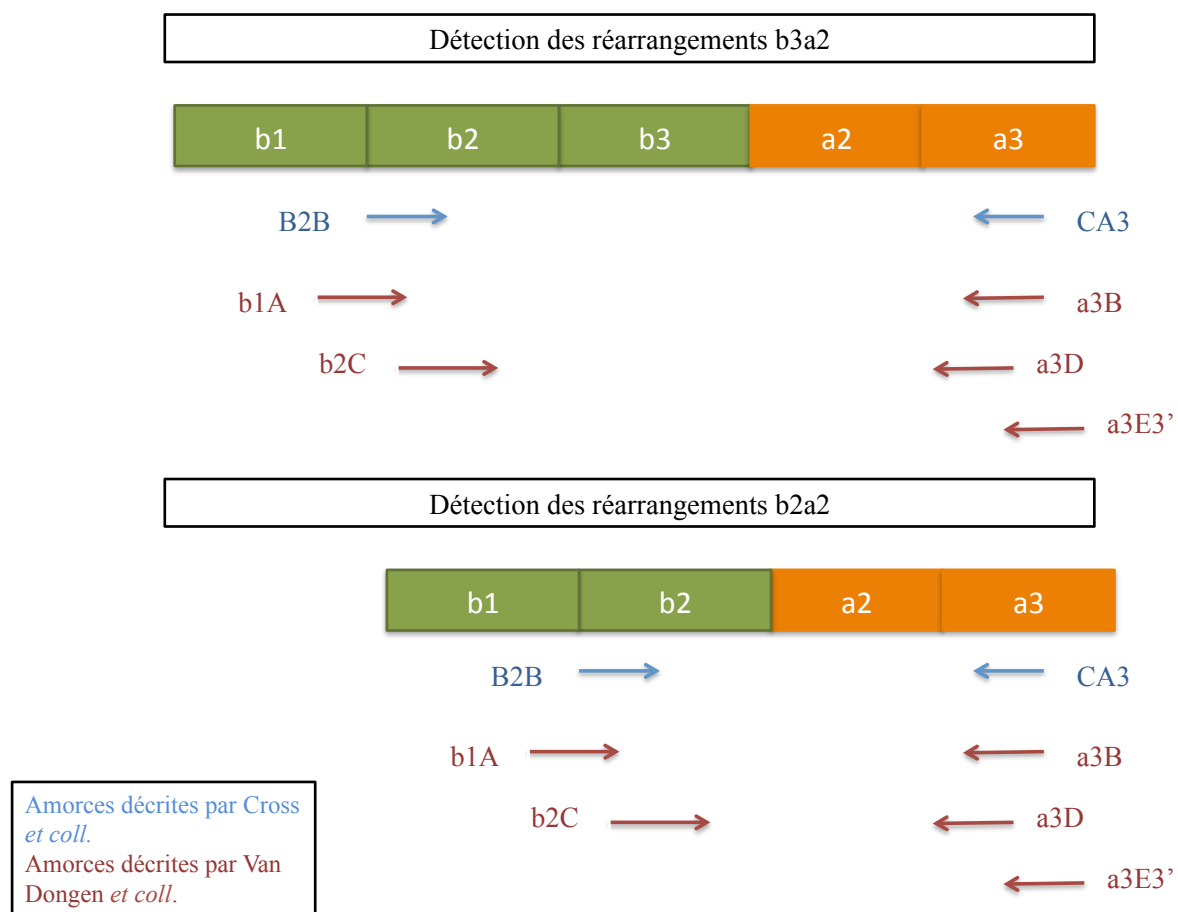


Figure 27 : Position des amorces pour la détection des réarrangements dans la région M-BCR (Cross 1994, Van Dongen 1999).

1.3. Détection d'un « double transcrit » b2a2 + b3a2

Ces données sont basées sur les résultats de la détection des réarrangements *BCR-ABL1* au CHU de Poitiers. Depuis septembre 2000, 196 patients (la plupart adultes) ont eu un diagnostic de LMC. Les réarrangements *BCR-ABL1* identifiés sont résumés dans le tableau V suivant.

Réarrangement	Nombre	Pourcentage
b2a2	74	38
b3a2	112	57
b2a2+b3a2	6	3.6%
b2a2+b3a2+e1a2	1	
e6a2	2	
b3-ins42-1a-a2	1	

Tableau V : Résultats de la détection des réarrangements *BCR-ABL1* de 196 patients au CHU de Poitiers.

Ainsi il a été détecté 7 « double transcrits » b2a2 et b3a2 (un patient ayant un « triple transcrit » b2a2, b3a2 et e1a2).

Dans tous les cas, lors de l'observation du gel d'agarose, le réarrangement b2a2 apparaît moins exprimé que le réarrangement b3a2 (Figure 28). De plus, des expériences de dilution nous permettent d'affirmer une double transcription b2a2 + b3a2 uniquement lorsque le nombre de copies d'ARNm b2a2 est au moins supérieur à 5% de l'ensemble du nombre de copies b2a2 + b3a2. Dans le cas contraire, le fragment b2a2 n'est pas retrouvé de façon systématique sur plusieurs expériences successives, du fait d'une variabilité de la méthodologie, et devrait être considéré négatif.

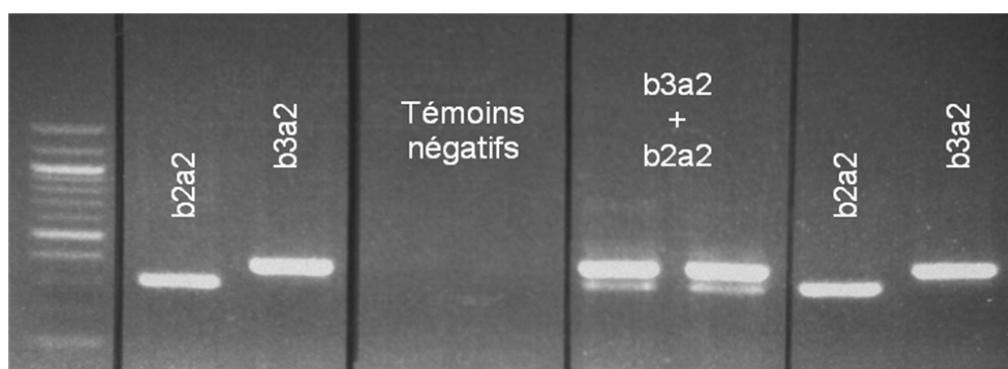


Figure 28 : Détection des « doubles transcrits » b2a2 + b3a2 par électrophorèse en gel d'agarose 1%.

2. Présentation initiale de la population

Sur les 134 enfants et adolescents issus de la cohorte nationale, 113 patients ont été inclus dans notre étude. En effet, pour 21 patients, nous n'avons pas pu collecter les résultats de la détection des réarrangements *BCR-ABL1*, soit parce que le typage n'avait pas été réalisé soit parce que ces informations ne nous ont pas été transmises.

2.1. Population générale (113 patients)

L'âge médian des patients au diagnostic était de 11,6 ans (1-17,4 ans) et 84 patients (74%) avaient plus de 10 ans au moment du diagnostic. Par tranche d'âge, il y avait 10 patients (9%), 19 patients (17%), 61 patients (54%) et 23 patients (20%) répartis entre 0 et 4 ans, 5 et 9 ans, 10 et 14 ans et 15 et 18 ans, respectivement (Figure 29).

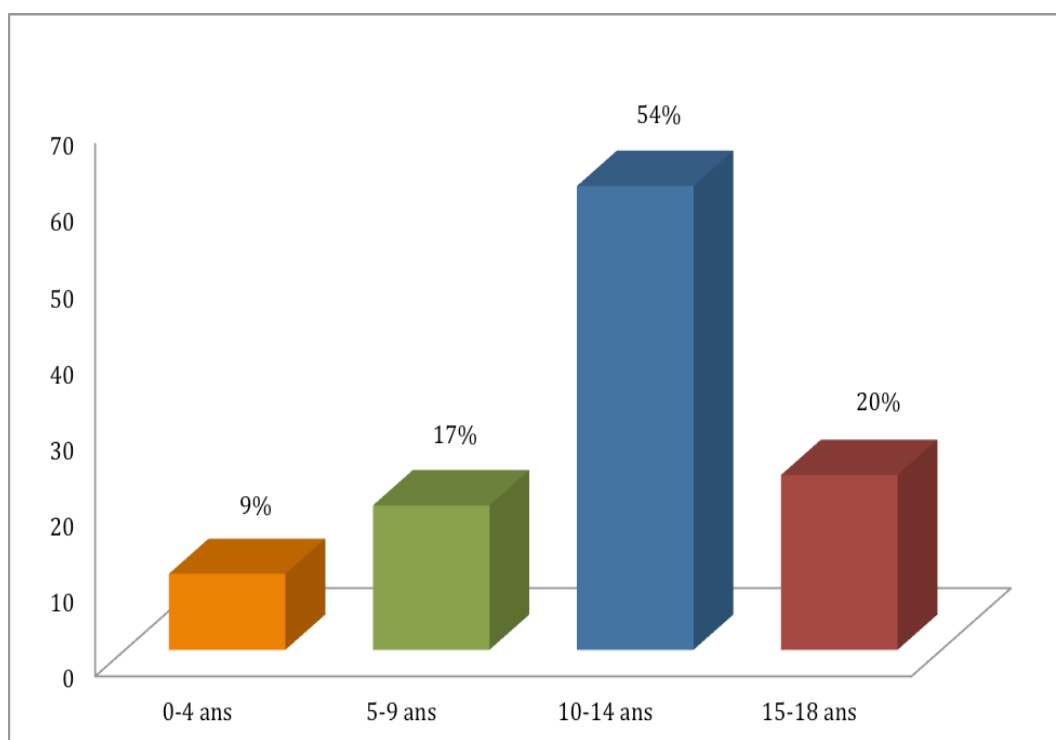


Figure 29 : Répartition des réarrangements *BCR-ABL1* par tranche d'âge au diagnostic.

Parmi les 113 patients, 65 (58%) étaient des garçons tandis que 48 (42%) étaient des filles, soit un sexe-ratio de 1,3 garçon pour 1 fille (Figure 30).

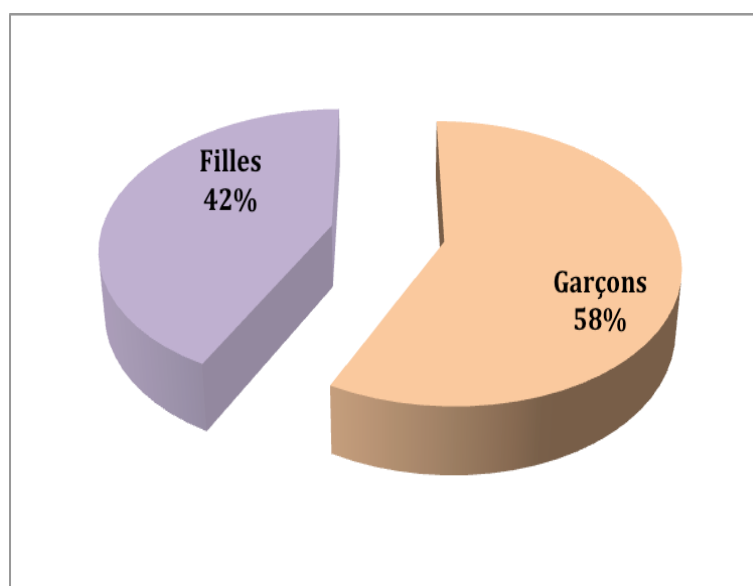


Figure 30 : Répartition selon le sexe dans la population étudiée.

Au moment du diagnostic, 109 patients (96%) se présentaient en phase chronique de la maladie, tandis que 4 patients (4%) se présentaient d'emblée en phase accélérée de la maladie, aucun des patients n'était en phase blastique (Tableau VI). Sur les 4 patients classés en phase accélérée (d'après les critères ELN), 2 patients avaient un pourcentage de blastes médullaires compris entre 15 et 29 %, 1 patient avait un pourcentage de blastes sanguins compris entre 15 et 29 % et le dernier avait un pourcentage de polynucléaires basophiles sanguins supérieur à 20% et un pourcentage de blastes sanguins compris entre 15 et 29 %.

Phase de la maladie	n	%
Chronique	109	96
Accélérée	4	4
Blastique	0	0

Tableau VI : Phases de présentation de la maladie (n = nombre de patients).

Parmi les 113 patients, 47 patients (42%) exprimaient le réarrangement *BCR-ABL1* de type b2a2, 62 patients (55%) exprimaient le réarrangement *BCR-ABL1* de type b3a2 et 4 patients (3%) co-exprimaient ces deux réarrangements (Figure 31).

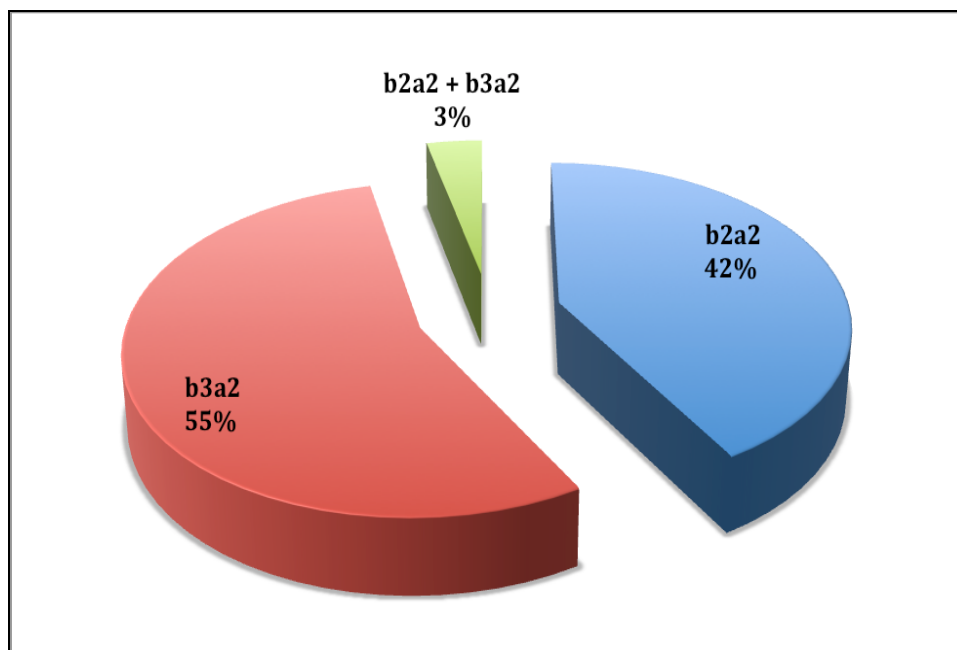


Figure 31 : Répartition des réarrangements *BCR-ABL* au diagnostic

2.2. Patients en phase chronique (109 patients)

2.2.1. Caractéristiques de tous les patients

Les caractéristiques cliniques de tous les patients en phase chronique sont résumées dans le tableau VII.

Au diagnostic, le score de Lansky était de 100 pour 73 patients (75%), c'est-à dire que ces enfants n'avaient pas de retentissement de la maladie sur leur activité, 18 patients (18%) avaient une restriction mineure au niveau des activités physiques intenses (score de Lansky à 90) et 7 patients (7%) se sentaient en plus anormalement fatigués.

Caractéristiques cliniques	n	%	Médian	Mini	Maxi
Age (ans)			11,6	1	17,4
Sexe					
Masculin	62	57			
Féminin	47	43			
Score de Lansky (évalué sur 98 patients)					
100	73	75			
90	18	18			
80	7	7			
Score de Sokal (évalué sur 89 patients)					
Faible	18	20			
Intermédiaire	25	28			
Elevé	46	52			
Score EUTOS (évalué sur 91 patients)					
Faible	67	74			
Elevé	24	26			
Splénomégalie (évaluée sur 104 patients)					
Non	24	23			
Oui	80	77			
Taille sous le rebord costal en cm (évaluée sur 71 patients)			11	1	21

Tableau VII : Caractéristiques cliniques des patients en phase chronique (n = nombre de patients).

Concernant les scores pronostiques, 46 patients (52%) étaient classés en risque élevé par calcul du score de Sokal, tandis que 24 patients (26%) étaient classés comme à risque de ne pas atteindre une réponse cytogénétique complète par calcul du score EUTOS.

Une splénomégalie a été retrouvée chez 80 patients (77%) avec une taille de la rate sous le rebord costal médiane de 11 cm (1-21) chez ces patients.

Les caractéristiques biologiques de tous les patients en phase chronique sont résumées dans le tableau VIII.

Caractéristiques biologiques	n	%	Médian	Mini	Maxi
Sang					
Globules blancs (G/L)	102		258,45	5,22	769
PN basophiles (%)	100		3	0	16
Myélémie (%)	98		35	0	64
Blastes (%)	98		1	0	14
Myéloblastes (%)	99		0	0	10
Promyélocytes (%)	98		2,75	0	16
Hématocrite (%)	100		29	14	46
Hémoglobine (g/dl)	101		9,6	4,6	15,3
Plaquettes (G/L)	102		508	51	4222
Moelle osseuse					
Blastes (%)	98		0	0	10
Myéloblastes (%)	96		2	0	8
Promyélocytes (%)	95		6	0	20
Cytogénétique					
t (9;22)	102	100 positifs	98		
Biologie moléculaire					
b3a2	59		54		
b2a2	46		42		
b2a2 + b3a3	4		4		

Tableau VIII : Caractéristiques biologiques des patients en phase chronique (n = nombre de patients évaluables).

Le taux de globules blancs médian était de 258,45 G/L (5,22-769), 90% des patients ayant un taux de globules blancs supérieur à 50 G/L (Figure 32).

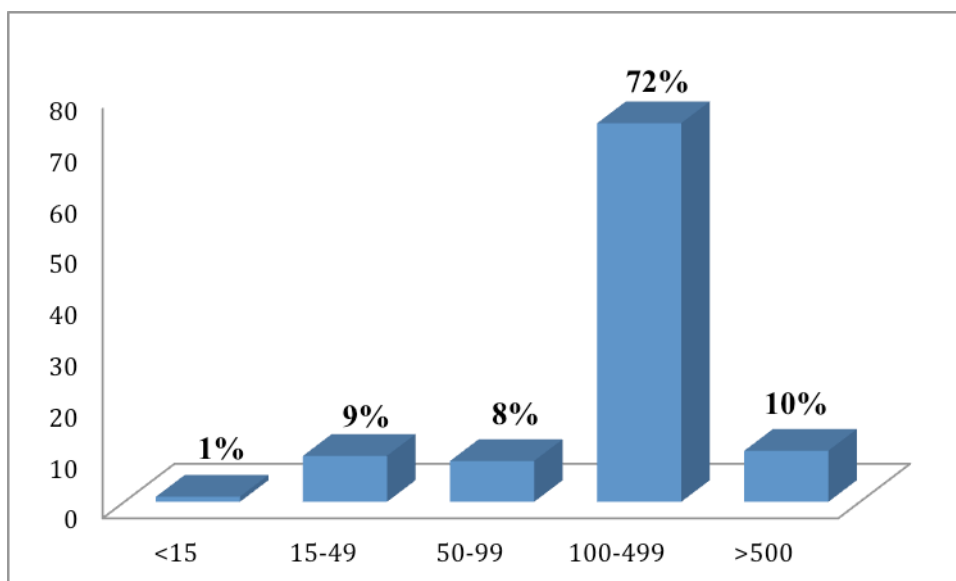


Figure 32 : Répartition du taux de globules blancs des patients en phase chronique.

Le taux de plaquettes médian était de 508 G/L (51-4222), 61% des patients se présentaient avec une thrombocytose (> 450 G/L), 2% des patients présentaient une thrombopénie (Figure 33).

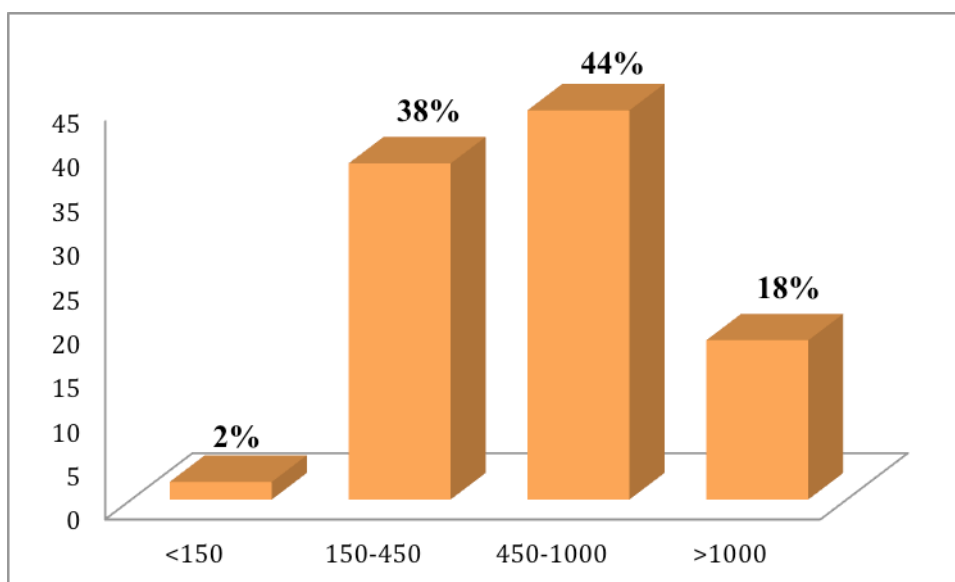


Figure 33 : Répartition du taux de plaquettes des patients en phase chronique.

Sur le reste de la numération et de la formule sanguine, le taux d'hémoglobine médian était de 9,6 (4,6-15,3), le pourcentage de basophiles médian était de 3% (0-16), le pourcentage de la myélémie médian était de 35% (0-64) et le pourcentage de blastes médian était de 1% (0-14).

Au diagnostic, parmi les 102 patients qui avaient bénéficié d'un caryotype, le chromosome Philadelphie était retrouvé chez 100 patients (98%).

2.2.2. Caractéristiques des patients selon le réarrangement

BCR-ABL1

Les caractéristiques cliniques des patients en phase chronique en fonction du type de réarrangement *BCR-ABL1* sont résumées dans le tableau IX.

Caractéristiques cliniques	b2a2		b3a2		b2a2+b3a2	
	n	%	n	%	n	%
Age (ans)	46	11,5(1,9-17,4)	59	12,2(1-17,2)	4	10(8,5-15,1)
Sexe						
Masculin	28	25,7%	32	29,4%	2	1,8%
Féminin	18	16,5%	27	24,8%	2	1,8%
Score de Lansky	(sur 40)		(sur 54)		(sur 4)	
100	33	33,7%	38	38,8%	2	2,1%
90	5	5,1%	12	12,2%	1	1,0%
80	2	2,1%	4	4,0%	1	1,0%
Score de Sokal	(sur 36)		(sur 49)		(sur 4)	
Faible	6	6,7%	11	12,4%	1	1,1%
Intermédiaire	10	11,2%	14	15,7%	1	1,1%
Elevé	20	22,5%	24	27,0%	2	2,3%
Score EUTOS	(sur 37)		(sur 50)		(sur 4)	
Faible	28	30,8%	37	40,6%	2	2,2%
Elevé	11	9,9%	13	14,3%	2	2,2%
Taille du débord costal (cm)	(sur 30)		(sur 38)		(sur 3)	
		11 (1-21)		10 (2-20)		15 (4-20)

Tableau IX : Caractéristiques cliniques des patients en phase chronique selon le réarrangement *BCR-ABL1* (n = nombre de patients).

Dans la population féminine, 18 (16,5%) filles exprimaient le réarrangement de type b2a2, 27 (24,8%) filles exprimaient le réarrangement de type b3a2, 2 (1,8%) filles co-exprimaient les deux réarrangements. Dans la population masculine, 28 (25,7%) garçons exprimaient le réarrangement de type b2a2, 32 (29,4%) garçons exprimaient le réarrangement de type b3a2, 2 garçons (1,8%) co-exprimaient les deux réarrangements.

Les caractéristiques biologiques des patients en phase chronique en fonction du type de réarrangement *BCR-ABL1* sont résumées dans le tableau X.

Caractéristiques biologiques	b2a2		b3a2		b2a2+b3a2	
	n	médian (étendue)	n	médian (étendue)	n	médian (étendue)
Sang						
Globules blancs (G/L)	43	299 (5,22-769)	55	196 (16-762)	4	199,95 (133-448,8)
PN basophiles (%)	42	3 (0-13)	54	3 (0-16)	4	4,5 (2-6)
Myélémie (%)	41	37 (0-64)	53	34 (0-55)	4	30,5 (27-57)
Blastes (%)	41	1 (0-14)	53	1 (0-12)	4	1,5 (1-4)
Myéloblastes (%)	42	0 (0-10)	53	0 (0-4)	4	0 (0-0)
Promyélocytes (%)	41	4 (0-16)	53	2 (0-11)	4	3 (2-4)
Hématocrite (%)	41	29 (14-42)	55	29,2 (16-46)	4	29,65 (23,2-36,2)
Hémoglobine (g/dl)	42	9,35 (5,4-14,1)	55	9,8 (4,6-15,3)	4	10,75 (8,5-12)
Plaquettes (G/L)	43	473 (102-1435)	55	535 (51-4220)	4	461 (414-1177)
Moelle osseuse						
Blastes (%)	40	1 (0-10)	54	0 (0-6)	4	0 (0-1)
Myéloblastes (%)	38	2 (0-8)	54	2 (0-6)	4	1 (1-5)
Promyélocytes (%)	38	7 (0-20)	53	6 (0-16)	4	7,5 (2-13)

Tableau X : Caractéristiques biologiques des patients en phase chronique selon le réarrangement *BCR-ABL1* (n = nombre de patients évaluables).

3. Comparaisons des paramètres étudiés à l'inclusion selon le type de réarrangement

Les analyses comparatives ont été réalisées uniquement sur les effectifs de population des patients exprimant les réarrangements b2a2 ou b3a2. L'effectif de la population de patients qui exprimaient à la fois ces deux réarrangements était trop faible pour permettre une analyse statistique (4 patients).

3.1. Analyses comparatives qualitatives

Caractéristiques qualitatives	b2a2		b3a2		p
	n	%	n	%	
Sexe					
Masculin	28	25,7%	32	29,4%	0,55
Féminin	18	16,5%	27	24,8%	
Score de Lansky					
100	33	33,7%	38	38,8%	0,4
90	5	5,1%	12	12,2%	
80	2	2,1%	4	4%	
Score de Sokal					
Faible	6	6,7%	11	12,4%	0,77
Intermédiaire	10	11,2%	14	15,7%	
Elevé	20	22,5%	24	27,0%	
Score EUTOS					
Faible	28	30,8%	37	40,6%	1
Elevé	9	9,9%	13	14,3%	
Splénomégalie					
Oui	35		42		0,64
Non	9		14		

Tableau XI : Comparaison des données qualitatives selon le type réarrangement *BCR-ABL1* (n = nombre de patients).

Aucune différence statistiquement significative n'a été démontrée en ce qui concerne le sexe, le score de Lansky, les scores pronostiques ou la présence d'une splénomégalie par rapport à l'expression d'un type de réarrangement moléculaire.

3.2. Analyses comparatives quantitatives

Aucune différence statistiquement significative n'a été démontrée entre l'âge et la taille de la rate sous le rebord costal en fonction de l'expression d'un réarrangement moléculaire.

Le pourcentage de promyélocytes dans le sang est significativement plus élevé dans le groupe de patients exprimant b2a2. Aucune autre différence significative n'a été montrée sur le reste des paramètres de l'hémogramme et du myélogramme (Tableau XII).

Caractéristiques quantitatives	b2a2		b3a2		p
	n	médian (étendue)	n	médian (étendue)	
Age (ans)	46	11,5(1,9-17,4)	59	12,2(1-17,2)	0,94
Taille de la rate (cm)					
Tous	39	10 (0-21)	52	5,5 (0-20)	0,42
Avec splénomégalie	30	12 (1-21)	38	11 (2-20)	0,45
Sang					
Globules blancs (G/L)	43	299 (5,22-769)	55	196 (16-762)	0,15
PN basophiles (%)	42	3 (0-13)	54	3 (0-16)	0,95
Myélémie (%)	41	37 (0-64)	53	34 (0-55)	0,27
Blastes (%)	41	1 (0-14)	53	1 (0-12)	0,46
Myéloblastes (%)	42	0 (0-10)	53	0 (0-4)	0,79
Promyélocytes (%)	41	4 (0-16)	53	2 (0-11)	0,03
Hématocrite (%)	41	29 (14-42)	55	29,2 (16-46)	0,30
Hémoglobine (g/dl)	42	9,35 (5,4-14,1)	55	9,8 (4,6-15,3)	0,44
Plaquettes (G/L)	43	473 (102-1435)	55	535 (51-4220)	0,16
Moelle osseuse					
Blastes (%)	40	1 (0-10)	54	0 (0-6)	0,91
Myéloblastes (%)	38	2 (0-8)	54	2 (0-6)	0,15
Promyélocytes (%)	38	7 (0-20)	53	6 (0-16)	0,27

Tableau XII : Comparaison des données quantitatives selon le réarrangement *BCR-ABL1* (n = nombre de patients évaluables).

III. Discussion

La LMC de l'enfant et de l'adolescent constitue une pathologie rare, elle ne concerne que 2 à 3% des leucémies dans cette catégorie de population. En revanche, elle a été très étudiée chez le sujet adulte et sert aujourd'hui de modèle dans la physiopathologie de la leucémogénèse. A l'heure actuelle, peu d'études concernent spécifiquement la population pédiatrique. De plus, contrairement aux études chez l'adulte, dans lesquelles les cohortes de patients regroupent un nombre très important de patients (Goh 2006), les études pédiatriques présentées jusque-là n'incluaient que peu de patients, du fait de la faible incidence de la pathologie. Seule l'étude CML-paed 1 menée par l'équipe allemande de Adler *et coll.* (Adler 2008), inclue, comme la cohorte française, un nombre supérieur à 100 patients (Tableau XIII).

Reference	Patients	BCR/ABL transcript type		
		b2a2	b3a2	b2a2 + b3a2
	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)
(A)				
Aurer <i>et al.</i> (18)	12 (100)	10 (84)	1 (8)	1 (8)
Millot <i>et al.</i> (5)	16 (100)	6 (37)	10 (63)	0 (0)
Hasan <i>et al.</i> (11)	47 (100)	32 (68)	15 (32)	0 (0)
CML-paed I	146 (100)	55 (38)	53 (36)	38 (26)
(B)				
Branford <i>et al.</i> (3)	105 (100)	36 (34)	45 (43)	24 (23)
Shepherd <i>et al.</i> (28)	119 (100)	41 (34)	72 (61)	6 (5)
Haferlach, personal communication	202 (100)	78 (39)	124 (61)	0 (0)
Melo <i>et al.</i> (29)	209 (100)	90 (43)	106 (51)	13 (6)
Arana-Trejo <i>et al.</i> (20)	226 (100)	120 (53)	88 (39)	18 (8)
Ruiz-Argüelles <i>et al.</i> (19)	238 (100)	103 (43)	129 (54)	6 (3)
Goh <i>et al.</i> (30)	538 (100)	174 (32)	364 (68)	0 (0)
Hochhaus, personal communication	737 (100)	274 (37)	348 (47)	115 (16)

Tableau XIII : Répartition des différents réarrangements moléculaires dans plusieurs études pédiatriques (A) et adultes (B). (Adler 2008)

Dans notre étude, la détection des réarrangements moléculaires *BCR-ABL1* avait été réalisée pour 113 patients. Nous avons mis en évidence une prédominance d'expression du réarrangement *BCR-ABL1* de type b3a2 (55%), par rapport au réarrangement *BCR-ABL1* de type b2a2 (42%). Ces résultats sont concordants avec la majorité des résultats issus des études réalisées dans la population adulte parmi lesquelles seules deux études retrouvaient une prédominance du réarrangement b2a2. De plus ces résultats présentent également une grande similarité avec les résultats des patients adultes diagnostiqués au CHU de Poitiers (b3a2 57%, b2a2 38%).

En revanche, les résultats obtenus au sein des populations pédiatriques sont plus contrastés. Celles menées par Aurer *et coll.* (Aurer 1991) et Hasan *et coll.* (Hasan 2006) montraient une prédominance du réarrangement b2a2, celle menée par Adler *et coll.* sur la cohorte allemande avec un effectif plus important montrait une répartition identique entre ces 2 réarrangements mais un taux de doubles réarrangements très important (Adler 2008).

Dans la cohorte française, seuls 4 patients (3%) co-exprimaient à la fois les deux réarrangements b2a2 et b3a2. Dans l'étude allemande de Adler *et coll.* (Adler 2008), la co-expression des réarrangements b2a2 et b3a2 était retrouvé chez 26% des patients (38/146). Bien que cette fraction de patients soit la plus faible, comme dans toutes les études pédiatriques et adultes, ce pourcentage d'expression de double réarrangement est considérablement élevé par rapport aux résultats de notre étude. . Il faut cependant souligner le fait que le taux de « doubles transcrits » varie considérablement suivant les études, aussi bien chez l'adulte (0 à 23%) que chez l'enfant (0 à 26%).

Les raisons d'une telle disparité dans l'expression des doubles réarrangements b2a2 et b3a2 ne sont aujourd'hui que spéculatives. Certains auteurs comme Adler (Adler 2008) et Ruiz-Argüelles (Ruiz-Argüelles 2004) ont suggéré la possible influence de facteurs environnementaux, de l'affiliation à certains groupes ethniques ou de la répartition géographique de certains agents infectieux tels que les rétrovirus. Cependant, aucune de ces explications n'est à l'heure actuelle démontrée.

Dans notre étude, nous nous sommes demandés si les différences observées dans le pourcentage de « doubles transcrits » au diagnostic pouvaient être liées aux techniques de biologie moléculaire utilisées. Nous avons pour cela contacté les 25 laboratoires impliqués afin de collecter des informations sur les techniques de détection des réarrangements *BCR-ABL1* utilisées au moment du diagnostic.

Au vu des renseignements collectés, nous pouvons dire que les amorces utilisées (bien que parfois différentes d'un laboratoire à l'autre) permettent de détecter la grande majorité des réarrangements *BCR-ABL1* (notamment tous les réarrangements de M-*BCR*).

Ces amorces dérivent généralement de recommandations scientifiques et notamment des études de Cross (Cross 1994) et de Van Dongen (Van Dongen 1999). Les « doubles transcrits » b2a2 + b3a2 sont donc détectables en théorie par tous les laboratoires.

Une explication avancée par Adler *et coll.* aux différences observées au niveau du nombre de doubles réarrangements serait que les co-expressions ne sont pas recherchées par tous les centres. Dans le cadre de notre étude, cette hypothèse n'était pas vérifiée puisque la totalité des centres utilisait des amorces spécifiques de la région M-BCR détectant ainsi les réarrangements b2a2, b3a2 et b2a2 + b3a2.

Une hypothèse plus vraisemblable serait plutôt le seuil de b2a2 au sein des ARNm b2a2 + b3a2 permettant d'affirmer de façon certaine la présence du « double transcrit ». Dans notre laboratoire ce seuil a été fixé à 5%. Ainsi, des faux négatifs peuvent ne pas être mis en évidence (dans ce cas le réarrangement b3a2 est uniquement détecté). *A contrario*, si le seuil de sensibilité est trop bas, des faux positifs peuvent être décrits. Dans l'étude allemande de Adler *et coll.*, aucune donnée de sensibilité n'est précisée.

L'absence de centralisation (pour la cohorte française) pourrait éventuellement expliquer ces différences. Cependant, parmi les 25 laboratoires impliqués, un laboratoire a réalisé 45 des 119 diagnostics, soit environ un tiers. Ce centre n'a retrouvé aucun double réarrangement b2a2+b3a2.

Si l'intérêt de différencier ces doubles réarrangements est légitime, quelle peut être leur intérêt ? Pour essayer de répondre à cette question, nous avons essayé de comprendre les mécanismes pouvant amener à cette co-expression. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées :

- La présence de 2 clones (un clone b2a2 et un clone b3a2).
- Un même clone leucémique avec plusieurs points de cassure dans *BCR* exprimant les ARNm b2a2 et b3a2 en même temps.
- Un mécanisme d'épissage alternatif résultant d'une seule et unique anomalie clonale (point de cassure unique au niveau génomique).
- Autre hypothèse ?

Les deux premières hypothèses nous paraissent peu probables, d'autant plus que des mécanismes d'épissage alternatif favorisant ou pas l'excision de l'exon b3 ont été montré dans *BCR*. Il nous semble plus envisageable que les doubles transcrits puissent être la conséquence de mécanismes concomitants de transcription, des études ayant suggéré un mécanisme d'épissage alternatif de l'ARN pré-messager chimérique (Shtivelman 1986), (Arana-Trejo 2002). Ce mécanisme a été approfondi par l'équipe de Branford *et coll.*

(Branford 2002) et permettrait d'expliquer qu'à partir d'un même ARN pré-messager *BCR* de type b3-a2, on puisse obtenir les deux ARN matures *BCR* de type b2a2 et b3a2.

En reprenant la physiopathologie de LMC, l'événement initial est la translocation réciproque entre le chromosome 9 et le chromosome 22. Au niveau chromosomique, les points de cassure sont bien définis sur chacun des deux gènes impliqués (*ABL1* et *BCR*). Dans plus de 95% des cas de LMC, sur le gène *BCR*, la cassure a lieu dans la région M-*BCR* au niveau soit de l'intron 13 (b2) soit de l'intron 14 (b3).

Inéluctablement, si le point de cassure a lieu au niveau de l'intron b2 (e13), l'ARN messager chimérique *BCR-ABL1* qui en résulte sera de type b2a2 (Figure 34).



Figure 34 : Schéma récapitulatif, point de cassure au niveau de l'intron 13 de *BCR*.

En revanche, si le point de cassure se situe au niveau de l'intron b3, l'ARN pré-messager sera de type b3 et l'ARN mature pourra être de type b3a2 ou b2a2, après épissage

alternatif. En effet, le saut de l'exon b3 ne peut survenir que sur des ARN pré-messagers de type b3 (Figure 35). Comme nous l'avons vu précédemment, l'expression soit de b2a2, soit de b3a2 serait liée à un polymorphisme dans la séquence nucléotidique du site de branchement de l'intron 13 du gène *BCR*. Selon cette hypothèse, les patients pour lesquels on retrouve une co-expression des deux réarrangements b2a2 et b3a2 auraient donc un point de cassure génomique au niveau de l'intron b3. En regard de ces observations, les patients qui expriment le réarrangement b3a2 et ceux qui co-expriment b2a2 et b3a2 auraient le même événement initial, le point de cassure au niveau de l'intron 14 (b3) sur le gène *BCR*.

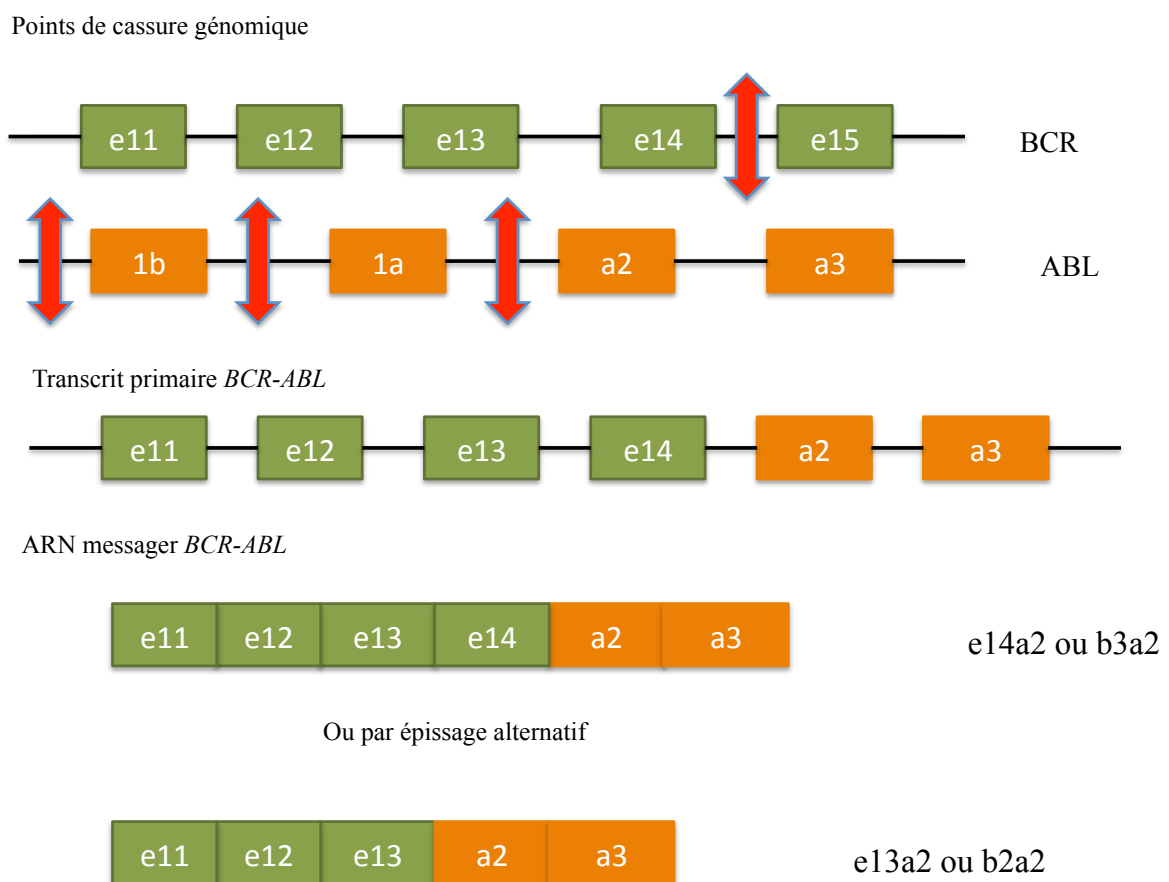


Figure 35 : Schéma récapitulatif, point de cassure au niveau de l'intron 14 de *BCR*.

Quelles sont les propriétés spécifiques des protéines BCR-ABL issues des réarrangements b2a2 ou b3a2 et leur implication dans le pronostic de la maladie ? Il est

difficile de répondre définitivement à cette question. Rappelons que les ARN messagers matures *BCR-ABL1* b2a2 et b3a2 ne sont différents que par la taille de l'exon e14 du gène *BCR*, soit 75 bases. Ces ARN messagers sont traduits en 2 protéines de fusion, p210^{*BCR-ABL1*}, ne différant que par 25 acides aminés. Comme nous l'avons décrit auparavant, les différentes voies de signalisation cellulaire responsables de la leucémogénèse dans la LMC sont induites par l'activité tyrosine-kinase de la protéine de fusion, qui est conservé dans les deux types de protéines.

L'expression conjointe des ARNm b2a2 et b3a2 a-t-elle une réalité biologique et clinique ? De nouveaux travaux sur des cohortes importantes de patients, comparant les caractéristiques épidémiologiques, cliniques et biologiques de patients exprimant b3a2 et celles de patients exprimant b3a2 + b2a2 pourraient être ainsi utiles.

Est-il alors pertinent de distinguer ces deux sous-groupes de patients (b3a2, b2a2 + b3a2) lors de l'interprétation des résultats des analyses de biologie moléculaire puisque qu'ils dérivent d'un réarrangement génomique b3a2 ?

Dans la deuxième partie de cette discussion, nous analyserons les relations éventuelles entre le type de réarrangement retrouvé au diagnostic et les données clinico-biologiques des patients.

Dans notre étude, l'âge médian des patients au diagnostic était de 11,6 ans (1-17,4 ans) et 84 patients (74%) avaient plus de 10 ans au moment du diagnostic. Nos patients étaient majoritairement des garçons (58%) contre 42 % de filles. Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre l'âge au diagnostic, le sexe et le type de réarrangement *BCR-ABL1*, comme dans les autres cohortes pédiatriques (Milot 2005), (Adler 2008). Seule une série de patients adultes retrouvait une prédominance significative d'expression du réarrangement b3a2 chez des hommes (Arana-Trejo 2002).

Au niveau de la présentation de la maladie, 96 % de nos patients étaient en phase chronique et 77 % d'entre eux se présentaient avec une splénomégalie dont la taille sous le rebord costal médiane était de 11cm (1-21), comme décrit dans les autres séries pédiatriques (Milot 2005). Le score pronostic de Sokal, adapté au sujet de moins de 45 ans, nous permettait de classer une majorité de patients (52%) en risque élevé. Aucune corrélation significative n'a été mise en évidence entre la présence d'une splénomégalie, la taille de celle-ci, les scores pronostiques et le type de réarrangement moléculaire.

Au niveau biologique, le taux médian de globules blancs était de 258,45 G/L (5,22-769), 90% des patients avaient un taux de globules blancs supérieur à 50 G/L. Ce chiffre est élevé par rapport aux données décrites chez l'enfant et l'adolescent. Le taux médian de leucocytes au diagnostic était moins élevé dans les études de Adler *et coll.* (191,6 G/L) (Adler 2008) et Aurer *et coll.* (128 G/L) (Aurer 1991). Le taux médian de globules blancs dans le groupe exprimant b2a2 (299 G/L) semble être plus élevé que dans le groupe exprimant b3a2 (196 G/L), cependant sans différence significative ($p = 0,15$). Dans notre population, le taux médian de globules blancs est également plus élevé que les taux de globules blancs médians généralement décrits chez le sujet adulte. En effet, chez l'adulte, Zaccaria *et coll.* (Zaccaria 1993) et Prejzner *et coll.* (Prejzner 2002) retrouvaient des leucocytoses respectivement de 94 G/L et 92,8 G/L. De même, une étude française de Roy *et coll.* (Roy 2006), en 2006, retrouvait des taux médians de leucocytes au diagnostic de 96,4 G/L et 74,8 G/L. Au niveau de la formule sanguine, un pourcentage plus important de promyélocytes était significativement associé à l'expression du réarrangement b2a2 (4%, $p = 0,03$).

Dans notre étude, le taux médian de plaquettes est de 508 G/L (51-4222), correspondant aux chiffres retrouvés chez l'enfant (Milot 2005), (Adler 2008). Dans le groupe exprimant b3a2, le taux médian de plaquettes semble être plus élevé (535 G/L) que dans le groupe exprimant b2a2 (473 G/L), cependant sans différence significative ($p = 0,16$). De façon paradoxale, une association significative avait été montrée entre des taux de plaquettes plus élevés et l'expression de b3a2, chez l'enfant par Adler *et coll.* (Adler 2008), chez l'adulte par Perego *et coll.* (Perego 2000). Cependant d'autres études ne retrouvaient pas cette association (Arana-Trejo 2002), (Prejzner 2002).

Le taux médian d'hémoglobine était de 9,6 g/dl (4,6-15,3) et aucune corrélation n'a été mise en évidence entre ce taux et l'expression d'un réarrangement moléculaire, il en est de même pour le reste des paramètres de la numération sanguine et du myélogramme.

Les données concernant la relation, au diagnostic, entre des facteurs épidémiologiques, cliniques et biologiques sont encore très variables d'une série à l'autre, chez l'enfant et l'adulte. Seule une hyperleucocytose plus élevée semble caractériser la présentation de la maladie chez l'enfant par rapport à l'adulte. L'évolution et le suivi des patients, notamment ceux traités par ITK, nécessitent également d'être étudiés dans des séries pédiatriques. Pour la cohorte française, les données de suivi sont disponibles avec un recul intéressant et pourrait faire l'objet d'un travail complémentaire à notre étude.

Conclusion

La LMC de l'enfant et de l'adolescent constitue une pathologie rare, elle ne concerne que 2 à 3% des leucémies dans cette catégorie de population. Les principaux réarrangements moléculaires *BCR-ABL1* retrouvés dans cette population sont les mêmes que chez l'adulte, b2a2 et b3a2. La répartition de ces deux réarrangements au sein des séries publiées est très variable, la prédominance de l'expression de l'un ou de l'autre de ces réarrangements n'est pas confirmée. De plus, la proportion de patients qui expriment ces deux réarrangements simultanément est sujette à variations puisque retrouvée entre 0 et 26 % des cas selon les études.

Dans la présente étude sur la cohorte française pédiatrique, cette disparité ne nous semble pas être influencée par les techniques de biologie moléculaire utilisées. Grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques, les RT-PCR multiplex réalisées au diagnostic ciblent parfaitement la région M-*BCR* et permettaient donc la détection des réarrangements b2a2 et b3a2, y compris si ces deux réarrangements étaient co-exprimés. La lecture interprétative des résultats dépend certes de la sensibilité assumée dans chaque laboratoire et pourrait expliquer en partie les variations observées.

Au diagnostic, nous avons retrouvé des données qui correspondaient à celles déjà décrites dans les séries pédiatriques. Le taux médian de globules blancs de notre cohorte était relativement élevé par rapport à ces séries. Il semble être le paramètre le plus différent entre l'enfant et l'adulte dans la présentation de cette pathologie. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de corrélation significative entre le type de réarrangement *BCR-ABL1* et les facteurs épidémiologiques, cliniques et biologiques au sein de notre cohorte, à l'exception d'un pourcentage médian de promyélocytes sanguin plus élevé associé au réarrangement b2a2.

A l'heure actuelle, le seul mécanisme susceptible d'expliquer la co-expression des réarrangements b2a2 et b3a2 est l'épissage alternatif. Cet événement ne pourrait avoir lieu que si le point de cassure se situe au niveau de l'intron 14 (b3) du gène *BCR*. Selon cette hypothèse, les patients qui expriment les deux ARN messagers en même temps auraient un réarrangement au niveau du gène de type b3a2. L'étude de l'ADN des cellules leucémiques de ces patients pourrait permettre de confirmer ou non cette hypothèse. Une question reste posée : ces « doubles transcrits » présentent-ils des implications biologiques et cliniques particulières ? Cela ne semble pas être le cas entre les patients exprimant le réarrangement

b2a2 et ceux exprimant le réarrangement b3a2. Il est donc peu probable que cela soit le cas pour les patients présentant au diagnostic les deux réarrangements.

BIBLIOGRAPHIE

Adler, R., Viehmann, S., Kuhlisch, E., Martiniak, Y., Rottgers, S., Harbott, J., Suttorp, M. (2008). "Correlation of *BCR/ABL* transcript variants with patients' characteristics in childhood chronic myeloid leukaemia." *Eur J Haematol* 82(2): 112-118.

Al-Ali, H. K. (2002). "CML with an e1a3 *BCR-ABL* fusion: rare, benign, and a potential diagnostic pitfall." *Blood* 100(3): 1092-1093.

Andolina, J. R., Neudorf, S.M., Corey, S.J. (2012). "How I treat childhood CML." *Blood* 119: 1821-1830.

Aplenc, R., Blaney, S. M., Strauss, L. C., Balis, F. M., Shusterman, S., Ingle, A. M., Agrawal, S., Sun, J., Wright, J. J., Adamson, P. C. (2011). "Pediatric phase I trial and pharmacokinetic study of dasatinib: a report from the children's oncology group phase I consortium." *J Clin Oncol* 29(7): 839-844.

Apperley, J. F. (2007). " Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia." *Lancet Oncol.* 8(11):1018-29.

Apperley, J. F. (2009). "CML in pregnancy and childhood." *Best Pract Res Clin Haematol* 22(3): 455-474.

Arana-Trejo, R. M., Ruiz Sanchez, E., Ignacio-Ibarra, G., Baez de la fuente, E., Garces,O., Gomez Moralez, E., Castro Granados, M., Ovilla Martinez, R., Rubio-Borja, M.E., Solrs Anaya, L., Herrera, P., Delgado Llamas, J., Kofman, S. (2002). "BCR : ABL p210, p190 and p230 fusion genes in 250 Mexican patients with chronic myeloid leukaemia (CML)." *Clin. Lab. Haem.* 24, 145–15.

Ariffin, H., Chen, S.P., Wong, H.L., Yeoh, A. (2003). "Validation of a multiplex RT-PCR assay for screening significant oncogene fusion transcripts in children with acute lymphoblastic leukaemia." Singapore Med J Vol44(10):517-520.

Aurer, I., Butturini, A., Gale, R.P. (1991). "*BCR-ABL* rearrangements in children with Philadelphia chromosome positive CML." Blood 78: 2407-2410.

Baccarani, M., Deininger, M., Rosti, G., Hochhaus, A., Soverini, S., Apperley, J.F., Cervantes, F., Clark, R.E., Cortes, J.E., Guilhot, F., Hjorth-Hansen, H., Hughes, T.P., Kantarjian, H.M., Kim, D.W., Larson, R.A., Lipton, J.H., Mahon, F.X., Martinelli, G., Mayer, J., Müller, M.C., Niederwieser, D., Pane, F., Radich, J.P., Rousselot, P., Saglio, G., Sauße, S., Schiffer, C., Silver, R., Simonsson, B., Steegmann, J.L., Goldman, J.M., Hehlmann, R. (2013). "European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013." Blood 122: 872-884.

Baccarani, M., Saglio, G., Goldman, J., Hochhaus, A., Simonsson, B., Appelbaum, F., Apperley, J., Cervantes, F., Cortes, J., Deininger, M., Gratwohl, A., Guilhot, F., Horowitz, M., Hughes, T., Kantarjian, H., Larson, R., Niederwieser, D., Silver, R., Hehlmann, R. (2006). "Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet." Blood 108(6): 1809-1820.

Baccarani, M., Saglio, G., Goldman, J., Hochhaus, A., Simonsson, B., Appelbaum, F., Apperley, J., Cervantes, F., Cortes, J., Deininger, M., Gratwohl, A., Guilhot, F., Horowitz, M., Hughes, T., Kantarjian, H., Larson, R., Niederwieser, D., Silver, R., Hehlmann, R. (2010). "Recommendations from the European LeukemiaNet for the Management of chronic myeloid leukemia (CML)."

Beillard, E., Pallisgaard, N., Van der Velden, V. H., Bi, W., Dee, R. Van der Schoot, E., Delabesse, E., Macintyre, E., Gottardi, E., Saglio, G., Watzinger, F., Lion, T., van Dongen, J. J., and P. Hokland, Gabert, J. (2003). "Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program." Leukemia 17(12): 2474-2486.

Ben-Neriah, Y., Bernard, A., Paskind, M., Daley, G.Q., Baltimore D. (1986). "Alternative 5' exons in c-abl mRNA." *Cell*. 44(4):577-86.

Birch, J. M., Alston, R.D., Quinn, M., Kelsey, A.M. (2003). "Incidence of malignant disease by morphological type, in young persons aged 12-24 years in England, 1979-1997." *Eur J Cancer* 39(18):2622-31.

Branford, S., Cross, N. C., Hochhaus, A., Radich, J., Saglio, G., Kaeda, J., Goldman, J., Hughes, T. (2006). "Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting *BCR-ABL* transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia." *Leukemia* 20(11): 1925-1930.

Branford, S., Hughes, T.P., Rudzki, Z. (2002). "Dual transcription of b2a2 and b3a2 *BCR-ABL* transcripts in chronic myeloid leukaemia is confined to patients with a linked polymorphism within the *BCR* gene." *British Journal of Haematology* 117, 875–877.

Burmeister, T., Reinhardt, R. (2008). "A multiplex PCR for improved detection of typical and atypical *BCR-ABL* fusion transcripts." *Leuk Res* 32(4): 579-585.

Castro-Malaspina, H., Schaison, G., Briere, J., Passet, S., Briere, J., Pasquier, A., Tanzer, J., Jacquillat, C., Bernard J. (1983). "Philadelphia chromosome-positive chronic myelocytic leukemia in children. Survival and prognostic factors." *Cancer* Aug 15;52(4):721-7.

Champagne, M. A., Capdeville, R., Krailo, M., Qu, W., Peng, B., Rosamilia, M., Therrien, M., Zoellner, U., Blaney, S. M., Bernstein, M. (2004). "Imatinib mesylate (STI571) for treatment of children with Philadelphia chromosome-positive leukemia: results from a Children's Oncology Group phase 1 study." *Blood* 104(9): 2655-2660.

Chisoe, S. L., Bodenteich, A., Wang, Y.F., Wang, Y.P., Burian, D., Clifton, S.W., Crabtree, J., Freeman, A., Iyer, K., Jian, L., et al (1995). "Sequence and analysis of the human *ABL* gene, the *BCR* gene, and regions involved in the Philadelphia chromosomal translocation." *Genomics*. 27(1):67-82.

Cortes, J. E., Kantarjian, H., Shah, N. P., Bixby, D., Mauro, M. J., Flinn, I., O'Hare, T., Hu, S., Narasimhan, N. I., Rivera, V. M., Clackson, T., Turner, C. D., Haluska, F. G., Druker, B. J., Deininger, M. W., Talpaz, M. (2012). "Ponatinib in refractory Philadelphia chromosome-positive leukemias." *N Engl J Med* 367(22): 2075-2088.

Cross, N. C., Melo, J.V., Feng, L., Goldman, J.M. (1994). "An optimized multiplex polymerase chain reaction (PCR) for detection of *BCR-ABL* fusion mRNAs in haematological disorders." *Leukemia*. Jan ; 8(1):186-9.

Cwynarski, K., Roberts, I. A., Iacobelli, S., Van Biezen, A., Brand, R., Devergie, A., Vossen, J. M., Aljurf, M., Arcese, W., Locatelli, F., Dini, G., Niethammer, D., Niederwieser, D., Apperley, J. F. (2003). "Stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia in children." *Blood* 102(4): 1224-1231.

Dai, Z., Quackenbush, R. C., Courtney, K. D., Grove, M., Cortez, D., Reuther, G. W., Pendergast, A. M. (1998). "Oncogenic Abl and Src tyrosine kinases elicit the ubiquitin-dependent degradation of target proteins through a Ras-independent pathway." *Genes & Development* 12(10): 1415-1424.

Dameshek, W. (1970). "1900–1969 " *Blood* 35: 577–582.

De Klein, A., Van Kessel, A.G., Grosveld, G., Bartram, C.R., Hagemeijer, A., Bootsma, D., Spurr, N.K., Heisterkamp, N., Groffen, J., Stephenson, J.R. (1982). "A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia." *Nature* 300(5894):765-7.

De Van Meissner, R., Dias, P. M. B., Covas, D. T., Job, F., Leite, M., Nardi, N.B. (1998). "A polymorphism in exon b2 of the major breakpoint cluster region (*M-BCR*) identified in chronic myeloid leukaemia patients." *British Journal of Haematology*, 103, 224–226.

Deininger, M. W. N., Goldman, J.M., Melo J.V. (2000). "The molecular biology of chronic myeloid leukemia." *Blood* 96: 3343-3356.

Del Pilar Moreno, M. (2001). "A novel *BCR-ABL* fusion transcript (e15a2) in 2 patients with atypical chronic myeloproliferative syndrome." *Blood* 97(11): 3668-3669.

Druker, B. J., Guilhot, F., O'Brien, S.G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N., Deininger, M.W., Silver, R.T., Goldman, J.M., Stone, R.M., Cervantes, F., Hochhaus, A., Powell, B.L., Gabrilove, J.L., Rousselot, P., Reiffers, J., Cornelissen, J.J., Hughes, T., Agis, H., Fischer, T., Verhoef, G., Shepherd, J., Saglio, G., Gratwohl, A., Nielsen, J.L., Radich, J.P., Simonsson, B., Taylor, K., Baccarani, M., So, C., Letvak, L., Larson, R.A. (2006). "Five-Year Follow-up of Patients Receiving Imatinib for Chronic Myeloid Leukemia." *N Engl J Med* 355:2408-2417.

Druker, B. J., Tamura, S., Buchdunger, E., Ohno, S., Segal, G.M., Fanning, S., Zimmermann, J., Lydon, N.B. (1996). "Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr–Abl positive cell." *Nature Medicine* 2, 561 - 566.

Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., O'Brien, S., Kurzrock, R., Kantarjian H.M. (1999). "The biology of CML." *The New England Journal of Medicine*.

Geary, C. G. (2000). "The story of chronic myeloid leukaemia." *British Journal of Haematology* 110, 2±11.

Giona, F., Moleti, M.L., Del Giudice, I., Testi, A.M., Diverio, D., De Cuia, M.R., Mandelli, F., Foa, R. (2005). "Long-term follow-up of Philadelphia chromosome-positive (Ph+)." *British Journal of Haematology*.

Goh, H. G., Hwang, J. Y., Kim, S. H., Lee, Y. H., Kim, Y. L., Kim, D. W. (2006). "Comprehensive analysis of *BCR-ABL* transcript types in Korean CML patients using a newly developed multiplex RT-PCR." *Transl Res* 148(5): 249-256.

Groffen, J., Stephenson, J.R., Heisterkamp, N., De Klein, A., Bartram, C.R., Grosveld G. (1984). "Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22." *Cell*. 36(1):93-9.

Guilhot, F., Chastang, C., Michallet, M., Guerci, A., Harousseau, J.L., Maloisel, F., Bouabdallah, R., Guyotat, D., Cheron, N., Nicolini, F., Abgrall, J.F., Tanzer, J. (1997). "Interferon alfa-2b combined with cytarabine versus interferon alone in chronic myelogenous leukemia. French Chronic Myeloid Leukemia Study Group." *N Engl J Med.* Jul 24;337(4):223-9.

Hasan, S. K., Sazawal, S., Kumar, B., Chaubey, R., Mishra, P., Mir, R., Chaudhry, V. P., Saxena, R. (2006). "Childhood CML in India: b2a2 transcript is more common than b3a2." *Cancer Genet Cytogenet* 169(1): 76-77.

Hasford, J., Baccarani, M., Hoffmann, V., Guilhot, J., Saussele, S., Rosti, G., Guilhot, F., Porkka, K., Ossenkoppele, G., Lindoerfer, D., Simonsson, B., Pfirrmann, M., Hehlmann, R. (2011). "Predicting complete cytogenetic response and subsequent progression-free survival in 2060 patients with CML on imatinib treatment: the EUTOS score." *Blood* 118(3): 686-692.

Heisterkamp, N., Groffen, J., Stephenson, J.R. (1983). "The human v-abl cellular homologue." *J Mol Appl Genet.* 2(1):57-68.

Hochhaus, A., Reiter, A., Skladny, H., Melo, J.V., Sick, C., Berger, U., Guo, J.Q., Arlinghaus, R.B., Hehlmann, R., Goldman, J.M., Cross, N.C. (1996). "A novel *BCR-ABL* fusion gene (e6a2) in a patient with Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia." *Blood* 88: 2236-2240.

Horibe, K., Tsukimoto, I., Ohno, R. (2001). "Clinicopathologic characteristics of leukemia in Japanese children and young adults." *Leukemia* Aug;15(8):1256-61.

Horn, B., Baxter-Lowe, L. A., Englert, L., McMillan, A., Quinn, M., Desantes, K., Cowan, M. (2006). "Reduced intensity conditioning using intravenous busulfan, fludarabine and rabbit ATG for children with nonmalignant disorders and CML." *Bone Marrow Transplant* 37(3): 263-269.

Huff, C. A., Fuchs, E. J., Smith, B. D., Blackford, A., Garrett-Mayer, E., Brodsky, R. A., Flinn, I. W., Ambinder, R. F., Borrello, I. M., Matsui, W. H., Vogelsang, G. B., Griffin, C. A., Luznik, L., Jones, R. J. (2006). "Graft-versus-host reactions and the effectiveness of donor lymphocyte infusions." *Biol Blood Marrow Transplant* 12(4): 414-421.

Hughes, T., Deininger, M., Hochhaus, A., Branford, S., Radich, J., Kaeda, J., Baccarani, M., Cortes, J., Cross, N. C., Druker, B. J., Gabert, J., Grimwade, D., Hehlmann, R., Kamel-Reid, S., Lipton, J. H., Longtine, J., Martinelli, G., Saglio, G., Soverini, S., Stock, W., Goldman, J.M. (2006). "Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting *BCR-ABL* transcripts and kinase domain mutations and for expressing results." *Blood* 108(1): 28-37.

Jaeger, B. A. S., Tauer, J.T., Ulmer, A., Kuhlisch, E., Roth, H.J., Suttorp, M. (2012). "Changes in bone metabolic parameters in children." *Med Sci Monit* 18(12): CR721-728.

Jinawath, N., Norris-Kirby, A., Smith, B. D., Gocke, C. D., Batista, D. A., Griffin, C. A., Murphy, K. M. (2009). "A rare e14a3 (b3a3) *BCR-ABL* fusion transcript in chronic myeloid leukemia: diagnostic challenges in clinical laboratory practice." *J Mol Diagn* 11(4): 359-363.

Johansson, B., Fioretos, T., Mitelman, F. (2002). "Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia." *Acta Haematol.* 107(2):76-94.

Kawasaki, E. S., Clark, S.S., Coyne, M.Y., Smith, S.D., Champlin, R., Witte, O.N., McCormick, F.P. (1988). "Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug ; 85(15):5698-702.

Larson, R. A., Druker, B.J., Guilhot, F., O'Brien, S.G., Riviere, G.J., Krahnke, T., Gathmann, I., Wang, Y. (2008). "Imatinib pharmacokinetics and its correlation with response and safety in chronic-phase chronic myeloid leukemia- a subanalysis of the IRIS study." *Blood* 111: 4022-4028.

Leibundgut, E., Jotterand, M., Rigamonti, V., Parlier, V., Hlematter, D., Tobler, A., Solenthaler M. (1999). "A novel *BCR-ABL* transcript e2a2 in a chronic myelogenous leukaemia patient." *British Journal of Haematology* 106, 1041±1044.

Lichty, B. D. (2000). "Exon-skipping in *BCR/ABL* is induced by ABL exon 2." *Biochem. J.* 348, 63–69

Liu, L. G., Tanaka, H., Ito, K., Kyo, T., Ito, T., Kimura, A. (2003). "Chronic myelogenous leukemia with e13a3 (b2a3) type of *BCR-ABL* transcript having a DNA breakpoint between *ABL* exons a2 and a3." *Am J Hematol* 74(4): 268-272.

Lucas, C. M., Harris, R. J., Giannoudis, A., Davies, A., Knight, K., Watmough, S. J., Wang, L., Clark, R. E. (2009). "Chronic myeloid leukemia patients with the e13a2 *BCR-ABL* fusion transcript have inferior responses to imatinib compared to patients with the e14a2 transcript." *Haematologica* 94(10): 1362-1367.

Mahmoud, S. F., McCobb, D. P. (2004). "Regulation of Slo Potassium Channel Alternative Splicing in the Pituitary by Gonadal Testosterone." *Journal of Neuroendocrinology* Vol. 16, 237±243.

Mahon, F. X., Deininger, M.W.N., Schultheis, B., Chabrol, J., Reiffers, J., Goldman, J.M., Melo, J.V. (2000). "Selection and characterization of *BCR-ABL* positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571- diverse mechanisms of resistance." *Blood*. 96 : 1070-9.

Mahon, F. X., Hayette, S., Lagarde, V., Belloc, F., Turcq, B., Nicolini, F., Belanger, C., Manley, P. W., Leroy, C., Etienne, G., Roche, S., Pasquet, J. M. (2008). "Evidence that resistance to nilotinib may be due to *BCR-ABL*, Pgp, or Src kinase overexpression." *Cancer Res* 68(23): 9809-9816.

McWhirter, J. R., Wang, J.Y.J. (1993). "An actin-binding function contributes to transformation." *The EMBO Journal* no.4 pp.1533- 1546, 1993.

Melo, J. V. (1996). "The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype." *Blood* 88: 2375-2384.

Millot, F., Baruchel, A., Guilhot, J., Petit, A., Leblanc, T., Bertrand, Y., Mazingue, F., Lutz, P., Verite, C., Berthou, C., Galambrun, C., Bernard, F., Yacouben, K., Bordigoni, P., Edan, C., Reguerre, Y., Couillault, G., Mechinaud, F., Cayuela, J. M., Guilhot, F. (2011). "Imatinib is effective in children with previously untreated chronic myelogenous leukemia in early chronic phase: results of the French national phase IV trial." *J Clin Oncol* 29(20): 2827-2832.

Millot, F., Baruchel, A., Guilhot, J., Petit, A., Leblanc, T., Bertrand, Y., Mazingue, F., Patrick, L., Vérité, C., Berthoux, C., Galambrun, C., Bernard, F., Yacouben, K., Bordigoni, P., Edan, C., Reguerre, Y., Couillaud, G., Cayuela, J.M., Guilhot, F. (2009). "Imatinib Is Efficient but Has a Negative Impact On Growth in Children with Previously Untreated chronic Myelogenous Leukaemia (CML) in Early Chronic Phase (CP): Results of the French National Phase IV Trial." *Blood*. 2009; 110:863.

Millot, F., Esperou, H., Bordigoni, P., Dalle, J. H., Michallet, M., Michel, G., Bourhis, J. L., Kuenz, M., Blaise, D., Garban, F., Plouvier, E., Rome, A., Guilhot, J., Guilhot, F. (2003). "Allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia in childhood: a report from the Societe Francaise de Greffe de Moelle et de Therapie Cellulaire (SFGM-TC)." *Bone Marrow Transplant* 32(10): 993-999.

Millot, F., Guilhot, J., Nelken, B., Leblanc, T., De Bont, E. S., Bekassy, A. N., Gadner, H., Suflarska, S., Sary, J., Gschaidmeier, H., Guilhot, F., Suttorp, M. (2006). "Imatinib mesylate is effective in children with chronic myelogenous leukemia in late chronic and advanced phase and in relapse after stem cell transplantation." *Leukemia* 20(2): 187-192.

Millot, F., Guilhot, J., Nelken, B., Leblanc, T., Leverger, G., Bernard, F., Gandemer, V., Behard, C., Berger, C., Cornu, G., Duchene, S., Guilhot, F. (2006). "Results of a phase II trial testing interferon-alpha 2b and cytarabine in children and adolescents with chronic myelogenous leukemia." *Pediatr Blood Cancer* 47(5): 555-559.

Millot, F., Traore, P., Guilhot, J., Nelken, B., Leblanc, T., Leverger, G., Plantaz, D., Bertrand, Y., Bordigoni, P., Guilhot, F. (2005). "Clinical and biological features at diagnosis in 40 children with chronic myeloid leukemia." *Pediatrics* 116(1): 140-143.

Modrek, B., Lee, C. (2002). "A genomic view of alternative splicing." *Nature genetics* • volume 30

Narayanan, K. R., Bansal, D., Walia, R., Sachdeva, N., Bhansali, A., Varma, N., Marwaha, R. K. (2013). "Growth failure in children with chronic myeloid leukemia receiving imatinib is due to disruption of GH/IGF-1 axis." *Pediatr Blood Cancer*.

Nilsen, T. W. (2003). "The spliceosome the most complex macromolecular machine in the cell." *BioEssays* 25:1147–1149.

Nowell, P. C., Hungerford, D.A. (1960). "Chromosome Studies on Normal and Leukemic Human Leukocytes." *JNCI J Natl Cancer Inst*.

Park, I. J., Lim, Y. A., Lee, W. G., Park, J. S., Kim, H. C., Lee, H. J., Cho, S. R. (2008). "A case of chronic myelogenous leukemia with e8a2 fusion transcript." *Cancer Genet Cytogenet* 185(2): 106-108.

Pasternak, G., Hochhaus, A., Schultheis, B., Hehlmann R. (1998). "Chronic myelogenous leukemia molecular and cellular aspects." *J Cancer Res Clin Oncol* 124: 643±660.

Pendergast, A. M., Gishizky, M., Havlik, M.H., Witt, O.N. (1993). "SH1 Domain Autophosphorylation of P210 BCR/ABL." *Molecular and cellular biology* p. 1728-1736.

Penserga, E. T., Skorski, T. (2007). "Fusion tyrosine kinases: a result and cause of genomic instability." *Oncogene* 26(1): 11-20.

Perego, R. A., Costantin,i M., Cornacchini, G., Gargantini, L., Bianchi, C., Pungolino, E., Rovida, E., Morra, E. (2000). "The possible influences of B2A2 and B3A2 BCR/ABL protein structure on thrombopoiesis in chronic myeloid leukaemia." *Eur J Cancer*. Jul ; 36(11):1395-401.

Piller, G. J. (2001). "Leukaemia, a brief historical review from ancient times to 1950." *British Journal of Haematology*.

Pocaly, M., Lagarde, V., Etienne, G., Ribeil, J. A., Claverol, S., Bonneu, M., Moreau-Gaudry, F., Guyonnet-Duperat, V., Hermine, O., Melo, J. V., Dupouy, M., Turcq, B., Mahon, F. X., Pasquet, J. M. (2007). "Overexpression of the heat-shock protein 70 is associated to imatinib resistance in chronic myeloid leukemia." *Leukemia* 21(1): 93-101.

Prejzner, W. (2002). "Relationship of the *BCR* gene breakpoint and the type of *BCR/ABL* transcript to clinical course, prognostic indexes and survival in patients with chronic myeloid leukemia." *Med Sci Monit*. May ; 8 (5) : BR193-7.

Preston, D. L., Kusumi, S., Tomonaga, M., Izumi, S., Ron, E., Kuramoto, A., Kamada, N., Dohy, H., Matsuo, T., Matsui, T., et al (1994). "Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987." *Radiat Res* Feb;137(2 Suppl):S68-97.

Preudhomme, C., Cayuela, J.M., Chomel, J.C., Corm, S., Hayette, S., Mahon, F.X., Nicolini, F.E., Réa, D., Roche-Lestienne, C., Guilhot, F. (2010). "Management of positive Philadelphia chromosome leukemia with ABL point mutations : recommendations from the FI-LMC group." *Hématologie* ; 16 (1) : 65-79.

Quintás-Cardama, A., Cortes, J. (2009). "Molecular biology of *BCR-ABL1*-positive chronic myeloid leukemia." *Blood*.

Rowe, J. M., Lichtman, M.A. (1984). "Hyperleukocytosis and leukostasis, common features of childhood chronic myeloid leukemia." *Blood* 63: 1230-1234.

Rowley, J. D. (1973). "A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining." *Nature* 243, 290 - 293.

Roy, L., Guilhot, J., Krahne, T., Guerci-Bresler, A., Druker, B.J., Larson, R.A., O'Brien, S., So, C., Massimini, G., Guilhot F. (2006). "Survival advantage from imatinib compared with the combination interferon-alpha plus cytarabine in chronic-phase chronic myelogenous leukemia: historical comparison between two phase 3 trials." *Blood* Sep 1 ; 108(5):1478-84.

Ruiz-Argüelles, G. J., Garcés-Eisele, J., Reyes-Núñez, V., Ruiz-Delgado, G.J. (2004). "Frequencies of the breakpoint cluster region types of the *BCR/ABL* fusion gene in Mexican Mestizo patients with chronic myelogenous leukemia." *Rev Invest Clin.* 2004 Sep-Oct;56(5):605-8.

Ruskin, B., Greene, J.M., Green, M.R. (1985). "Cryptic branch point activation allows accurate in vitro splicing of human beta-globin intron mutants." *Cell*, 41, 833–844.

Saußele, S., Weißer, A., Muller, M.C., Emig, M., La Rosee, P., Paschka, P., Kuhn, C., Willer, A., Hehlmann, R., Hochhaus, A. (2000). "Frequent polymorphism in *BCR* exon b2 identified in *BCR-ABL* positive and negative individuals using fluorescent hybridization probes." *Leukemia* 14, 2006–2010.

Shenoy, S., Smith, F. O. (2008). "Hematopoietic stem cell transplantation for childhood malignancies of myeloid origin." *Bone Marrow Transplant* 41(2): 141-148.

Shima, H., Tokuyama, M., Tanizawa, A., Tono, C., Hamamoto, K., Muramatsu, H., Watanabe, A., Hotta, N., Ito, M., Kurosawa, H., Kato, K., Tsurusawa, M., Horibe, K., Shimada, H. (2011). "Distinct impact of imatinib on growth at prepubertal and pubertal ages of children with chronic myeloid leukemia." *J Pediatr.* 159(4):676-81.

Shtivelman, E., Lifshitz, B., Gale, R., Canaani E. (1985). "Fused transcript of *ABL* and *BCR* genes in chronic myelogenous leukaemia." *Nature* 315, 550 - 554.

Shtivelman, E., Lifshitz, B., Gale, R.P., Roe, B.A., Canaani E. (1986). "Alternative splicing of RNAs transcribed from the human *ABL* gene and from the *BCR-ABL* fused gene." *Cell.* 47(2):277-84.

Skorski, T., Kanakaraj, P., Nieborowska-Skorska, M., Ratajczak, M., Wen, S.C., Zon, G., Gewirtz, M., Perussia, B., Calabretta, B. (1995). "Phosphatidylinositol-3 Kinase Activity Is Regulated by BCR/ABL and Is Required for the Growth of Philadelphia Chromosome-Positive Cells." *Blood*, Vol 86,Nº2 pp 726-73.

Sokal, J. E., Baccarani, M., Tura, S., Fiacchini, M., Cervantes, F., Rozman, C., Gomez, G.A., Galton, D.A., Canellos, G.P., Braun T.J. (1985). "Prognostic discrimination among younger patients with chronic granulocytic leukemia- relevance to bone marrow transplantation." *Blood* 66: 1352-1357.

Sokal, J.E., Cox, E.B., Baccarani, M., Tura, S., Gomez, G.A., Robertson, J.E., Tso, C.Y., Braun, T.J., Clarkson, B.D., Cervantes, F. (1984). "Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia." *Blood* 63: 789-799.

Steelman, L. S., Pohnert, S. C., Shelton, J. G., Franklin, R. A., Bertrand, F. E., McCubrey, J. A. (2004). "JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis." *Leukemia* 18(2): 189-218.

Suttorp, M. (2008). "Innovative approaches of targeted therapy for CML of childhood in combination with paediatric haematopoietic SCT." *Bone Marrow Transplant* 42 Suppl 2: S40-46.

Suttorp, M., Claviez, A., Bader, P., Peters, C., Gadner, H., Ebell, W., Dilloo, D., Kremens, B., Kabisch, H., Führer, M., Zintl, F., Göbel, U., Klingebiel T. (2009). "Allogeneic stem cell transplantation for pediatric and adolescent patients with CML: results from the prospective trial CML-paed I." *Klin Padiatr.* 221(6):351-7.

Suttorp, M., Millot, F. (2010). "Treatment of pediatric chronic myeloid leukemia in the year 2010 use of tyrosine kinase inhibitors and stem-cell transplantation." *American Society of Hematology*.

Suttorp, M., Thiede, C., Tauer, J. T., Range, U., Schlegelberger, B., Von Neuhoff, N. (2010). "Impact of the type of the *BCR-ABL* fusion transcript on the molecular response in pediatric patients with chronic myeloid leukemia." *Haematologica* 95(5): 852-853.

Tefferi, A. (2008). "The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek." *Leukemia* 22(1): 3-13.

Turhan, A. (2002). "Biologie de la protéine de fusion BCR-ABL : progrès récents." *Hématologie*. 8, 35-45.

Van der Velden, V. H., Beverloo, H.B., Hoogeveen, P. G., Zwaan Ch, M. (2007). "A novel *BCR-ABL* fusion transcript (e18a2) in a child with chronic myeloid leukemia." *Leukemia* 21(4): 833-835.

Van der Velden, V. H. J., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., Van Dongen, J.J.M. (2003). "Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR : principles, approaches, and laboratory aspects." *Leukemia* 17, 1013–1034.

Van Dongen, J. J. M., Macintyre, E.A., Gabert, J.A., Delabesse, E., Rossi, V., Saglio, G., Gottardi, E., Rambaldi, A., Dotti, G., Griesinger, F., Parreira, A., Gameiro, P., Gonzalez Diaz, M., Malec, M., Langerak, A.W., San Miguel, J.F., Biondi A. (1999). "Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease." *Leukemia* 13, 1901–1928.

Vandyke, K., Fitter, S., Dewar, A.L., Hughes, T.P., Zannettino, A.C.W. (2010). "Dysregulation of bone remodelling by imatinib mesylate." *Blood* 115: 766-774.

Vardiman, J. W., Harris, N. L., Brunning, R. D. (2002). "The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms." *Blood* 100(7): 2292-2302.

Verfaillie, C. M., Hurley, R., Lundell, B.I., Zhao, C., Bhatia, R. (1997). "Integrin-mediated regulation of hematopoiesis: do BCR/ABL-induced defects in integrin function underlie the abnormal circulation and proliferation of CML progenitors?" *Acta Haematol.* 97(1-2):40-52.

Wong, S., Witte, O. N. (2004). "The BCR-ABL story: bench to bedside and back." *Annu Rev Immunol* 22: 247-306.

Zaccaria, A., Martinelli, G., Buzzi, M., Testoni, N., Farabegoli, P., Zuffa, E., Zamagni, M.D., Russo, D., Baccarani, M., Ambrosetti, A., et al. (1993). "The type of *BCR/ABL* junction does not predict the survival of patients with Ph1-positive chronic myeloid leukaemia." *Br J Haematol.* Jun ; 84(2):265-8.

Zhang, X., Subrahmanyam, R., Wong, R., Gross, A. W., Ren, R. (2001). "The NH(2)-terminal coiled-coil domain and tyrosine 177 play important roles in induction of a myeloproliferative disease in mice by Bcr-Abl." *Mol Cell Biol* 21(3): 840-853.

Zhu, N., Eghbali, M., Helguera, G., Song, M., Stefani, E., Toro, L. (2005). "Alternative splicing of Slo channel gene programmed by estrogen, progesterone and pregnancy." *FEBS Letters* 579.

Zwaan, C. M., Rizzari, C., Mechinaud, F., Lancaster, D.L., Lehrnbecher, T., Van der Velden, V.H., Beverloo, B.B., Den Boer, M.L., Pieters, R., Reinhardt, D., Dworzak, M., Rosenberg, J., Manos, G., Agrawal, S., Strauss, L., Baruchel, A., Kearns, P.R. (2013). "Dasatinib in children and adolescents with relapsed or refractory leukemia: interim results of the CA180-018 phase i study from the ITCC Consortium." *J Clin Oncol.* 31(19):2460-8.

Serment d'Hippocrate

Au moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque.

Résumé

La leucémie myéloïde chronique ou LMC est une hémopathie maligne du groupe des néoplasies myéloprolifératives ou syndromes myéloprolifératifs. Elle est la conséquence directe de la translocation t(9;22)(q34;q11) à l'origine du gène chimérique *BCR-ABL1*. Les ARN messagers *BCR-ABL1* les plus fréquemment retrouvés dans la LMC sont de type b2a2 (e13a2) et b3a2 (e14a2). Certains patients peuvent cependant exprimer les deux ARNm (b2a2+b3a2). Des mécanismes d'épissage alternatif au niveau de la partie *BCR* des transcrits primaires *BCR-ABL1* pourraient expliquer cette co-expression. Chez les patients atteints de LMC, des disparités de répartition des réarrangements moléculaires *BCR-ABL1* ont été rapportées. Si la prédominance du réarrangement b3a2 semble avérée chez les patients adultes, cette donnée est encore controversée dans les cohortes pédiatriques. De plus, la proportion de patients co-exprimant simultanément les deux réarrangements varie considérablement selon les études (adultes ou pédiatriques).

Un des objectifs de ce travail était de vérifier au sein de la cohorte pédiatrique française, la répartition des réarrangements moléculaires *BCR-ABL1* au moment du diagnostic (b2a2, b3a2 et b2a2+b3a2). Dans les différents laboratoires ayant effectué ces diagnostics, les systèmes de détection mis en place (RT-PCR multiplex, amorces spécifiques de la région M-*BCR*) permettent la détection des ARNm chimériques issus d'une cassure M-*BCR*, y compris les « doubles transcrits » b2a2+b3a2. Les différences observées entre la cohorte allemande (26% de « doubles transcrits » au diagnostic) et la cohorte française (3%) pourraient dépendre de la limite de détection assumée dans chaque laboratoire.

Dans un deuxième temps, notre objectif était de rechercher l'existence d'éventuelles relations entre les types de réarrangements moléculaires *BCR-ABL1* et les données clinico-biologiques au diagnostic. Le taux médian de globules blancs de notre cohorte était relativement élevé par rapport aux autres séries et semble être le paramètre le plus différent entre l'enfant et l'adulte dans la présentation de cette pathologie. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de corrélation significative entre le type de réarrangement *BCR-ABL1* et les facteurs épidémiologiques, cliniques et biologiques au sein de cette cohorte, à l'exception d'un pourcentage médian de promyélocytes sanguin plus élevé associé au réarrangement b2a2.

Mots-clés :

LMC, cohorte pédiatrique, RT-PCR multiplex, *BCR-ABL1*, b2a2/b3a2, co-expression, épissage alternatif.