

MONITORAGE DU TRANSCRIT BCR-ABL DANS LA LMC PAR CEPHEIDXPRT MONITOR ASSAY™®

MONITORING OF BCR-ABL TRANSCRIPT IN CML BY CEPHEIDXPRT MONITOR ASSAY™®

D. BAHRI^{1,*}; W.EI BORGHI^{1,3}; S. KEFI^{2,3}; F.BEN LAKHAL^{1,3}; S.FEKIH SALEM^{1,3}; R.BEN LAKHAL²; B. MEDDEB^{2,3} ET E. GOUIDER^{1,3}

1 : Service d'hématologie biologique, CHU Aziza Othmana de Tunis -Tunisie

2 : Service d'hématologie clinique, CHU Aziza Othmana de Tunis -Tunisie

3 : UR14ES11 Université Tunis El Manar

*E-mail de l'auteur correspondant : dhouhabahrii@gmail.com

Résumé

L'essai Xpert BCR-ABL Monitor est une alternative à la RT-PCR classique pour le suivi des patients atteints de leucémie myéloïde chronique. Objectif de l'étude: Analyser les données du monitoring moléculaire des transcrits BCR-ABL par GeneXpertCepheid. Une quantification du transcrit BCR-ABL était réalisée chez des patients sous inhibiteurs de Tyrosine Kinase (ITK) et en réponse cytogénétique complète. Mille quatre cent dix échantillons de 270 patients étaient analysés. Une réponse moléculaire majeure (RMM) a été retrouvée dans 79,2%. Une réponse moléculaire complète (RMC) a été retrouvée dans 32 prélèvements de 16 patients. L'âge médian des patients en RMC était de 51 ans et un sex-ratio de 1,28. Dix patients ont atteint une RMM au bout de 12 mois sous ITK. Une RMC a été atteinte dans un délai médian de 24 mois. L'arrêt des ITK a été fait chez 2 patients en RMC maintenue depuis une durée moyenne de 17,2 mois. L'utilisation du test XpertBCR-ABL est une alternative robuste et nécessaire à la prise de décisions thérapeutiques dans notre centre.

Mots - clés : Leucémie myéloïde chronique; Monitoring moléculaire; BCR-ABL; GeneXpert

Abstract

The Xpert BCR-ABL Monitor trial is an alternative to conventional RT-PCR for monitoring patients with chronic myeloid leukemia. Objective of the study: To analyze data from the molecular monitoring of BCR-ABL transcripts by GeneXpertCepheid. BCR-ABL transcript quantification was performed in patients on ITK and in complete cytogenetic response. 1410 samples from 270 patients were analyzed. A major molecular response (MMR) was found in 79.2%. A complete molecular response (CMR) was found in 32 samples from 16 patients. The median age of patients in CMR was 51 years and a sex ratio of 1.28. Ten patients achieved MMR after 12 months on treatment. A CMR was achieved at a median of 24 months. Treatment discontinuation was achieved in 2 patients in maintained CMR for a median duration of 17.2 months. The use of the XpertBCR-ABL test is a robust and necessary alternative for therapeutic decision-making in our centre.

Key - words: Chronic myeloid leukemia; Molecular monitoring; BCR-ABL; GeneXpert

ملخص

تم تطوير تجربة XpertBCR-ABL Monitor كبديل عن تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل الألية، لتسهيل مراقبة المرضى الذين يعانون من سرطان الدم النقوي المزمن تحت العلاج. الهدف من الدراسة هو تحليل بيانات المراقبة الجزيئية لنسخ-BCR-ABL التي يتم إجراؤها على GeneXpertCepheid®.

تم تحليل 1410 عينة تقابل 270 مريضاً. تم العثور على استجابة جزيئية رئيسية أو أكثر في 79.2% من العينات المتعلقة 95.6% من المرضى. تم العثور على استجابة جزيئية كاملة في 32 عينة من 16 مريضاً، وكان متوسط عمر المرضى الذين أكملوا استجابة جزيئية كاملة 51 سنة. كانت نسبة الجنس 1.28. حقق عشرة مرضى استجابة جزيئية رئيسية بعد 12 شهراً من العلاج. تم الوصول إلى استجابة جزيئية كاملة في غضون 24 شهراً. تم إيقاف العلاج عند مريضين تمكنوا من الحفاظ على استجابة جزيئية كاملة لمدة 17.2 شهراً في المتوسط.

في مركزنا، يمثل استخدام اختبار Xpert BCR-ABL كبديل مراقبة فعال عن تقنية تفاعل البوليميراز المتسلسل الألية الكلاسيكية ذوالحساسية اللازمة لاتخاذ قرارات علاجية.

الكلمات المفتاحية: سرطان الدم النقوي المزمن; تحليل بيانات المراقبة الجزيئية; GeneXpert; BCR-ABL

INTRODUCTION

Le suivi moléculaire des patients ayant une leucémie myéloïde chronique (LMC), traités par des inhibiteurs de Tyrosine Kinase (ITK) est aujourd'hui fondamental à l'évaluation, la stratification thérapeutique ainsi qu'à la prise de décisions cliniques. Ce suivi moléculaire consiste en la mesure quantitative des niveaux de transcrits BCR-ABL1 (ARNm) par la technique de PCR Quantitative en temps réel après Transcription Inverse : la RTq-PCR. Plus récemment, l'essai Xpert BCR-ABL Monitor (Gx), a été proposé comme une alternative robuste à la RTq-PCR.

L'objectif de notre travail a été d'analyser une première série Tunisienne du monitoring moléculaire des transcrits BCR-ABL réalisé sur GeneXpert Cepheid®.

MATERIEL ET METHODES

Il s'agit d'une étude rétrospective menée au service d'Hématologie biologique de l'hôpital Aziza Othmana de Janvier 2016 à Juin 2019. Il a été inclus dans l'étude les patients atteints de LMC pris en charge au service d'hématologie clinique de notre institution. Ces patients étaient traités par des ITK et étaient en réponse cytogénétique complète. Chaque patient devrait bénéficier d'une quantification BCR-ABL trimestrielle ou semestrielle selon l'évolution de sa pathologie. Un prélèvement périphérique frais sur tube EDTA était adressé au laboratoire pour chaque suivi.

Une quantification du transcrit BCR-ABL des patients LMC était réalisée sur l'automate GeneXpert Cepheid® au service d'hématologie biologique à l'hôpital Aziza Othmana.

L'automate de type GeneXpertDxSystem requiert l'utilisation de cartouches à usage unique contenant les réactifs de PCR et «abritant» la réaction de PCR. Le sang total lysé selon les recommandations du fabricant était ajouté aux cartouches GeneXpert puis analysé sur l'instrument qui réalise la procédure automatisée comme suit :

- Une extraction des ARN totaux
- Une Reverse transcription des ARN extraits
- Une PCR quantitative en temps réel : il s'agit d'une PCR nichée avec deux couples d'amorces et deux sondes marquées, spécifiques des gènes BCR-ABL et ABL (Figure 1).

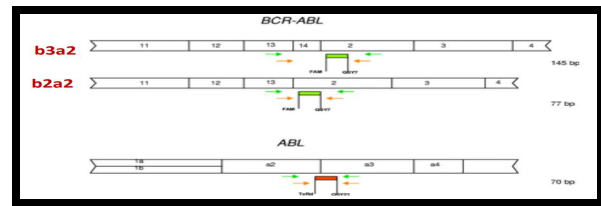


Figure 1 : Set amorces et sondes dans le système CepheidXpert BCR-ABL

Un couple d'amorces externes (en vert) sert à initier la transcription inverse (phase RT) et le 1er tour de PCR (15 cycles). Un couple d'amorces internes (en orange) sert à initier le 2ème tour de PCR (PCR nichée) en 35 cycles qui correspond en fait à la PCR en temps réel. La sonde spécifique de BCR-ABL (en vert) est marquée en 5' par le fluorophore FAM (Reporter) et par le fluorophore QSY7 (Quencher) en 3' ; elle s'hybride à l'exon a2 de d'ABL. La sonde spécifique du gène ABL (en orange) est marquée en 5' par le fluorophore Texas Red(TxRd) et le fluorophore QSY21 (Quencher) en 3' ; elle s'hybride à la jonction a2 et a3 du gène ABL.

Le logiciel effectue une analyse des données de fluorescence pour déterminer les Ct ABL et BCR-ABL pour chaque échantillon et calcule le ratio rapporté au standard international BCR-ABL/ABL (%) IS en utilisant : le delta Ct (ΔCt) = Ct ABL – Ct BCR-ABL et l'efficacité de la réaction de PCR ($E\Delta Ct$) associée à chaque lot de réactif (cartouche) et établi par Cepheid à partir d'une courbe de calibration ΔCt fx (log de la quantité d'ARN). Les résultats étaient exprimés selon une échelle internationale (IS pour international scale) grâce à des facteurs de conversion (FC) puis exprimés selon la formule suivante[1]: % BCR-ABL/ABL IS = $E\Delta Ct (\Delta Ct) \times 100 \times FC$.

L'analyse est validée pour des échantillons dont le Ct ABL est compris entre 12 et 18.

Selon les taux de transcrit BCR-ABL, les patients ont été classés en 5 niveaux de réponse(Figure 2) :

- Absence de RMM (rémission moléculaire majeure) : Taux de transcrit BCR-ABL > 0,1% (IS)
- RMM : Taux de transcrit BCR-ABL ≤ 0,1% (IS)
- RM4 : Taux de transcrit BCR-ABL ≤ 0,01% (IS)
- RM4.5 : Taux de transcrit BCR-ABL ≤ 0,0032% (IS)
- RM5 : Taux de transcrit BCR-ABL ≤ 0,001% (IS)
- RMC : Taux de transcrit BCR-ABL ≤ 0,0001% (IS)

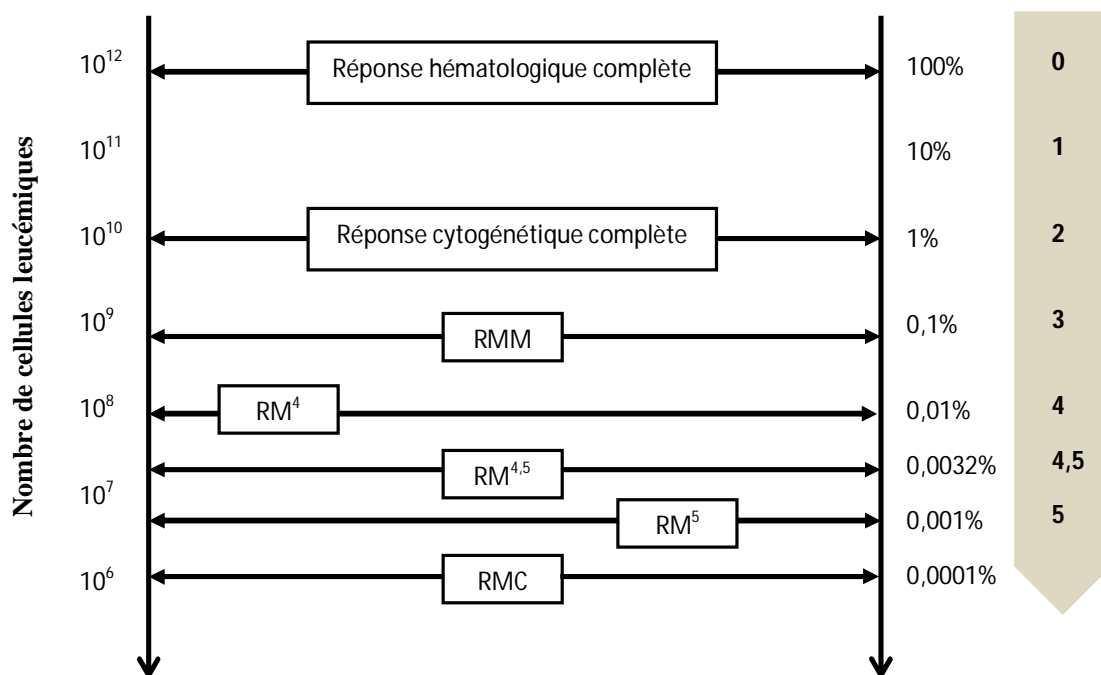


Figure 2 : Définition des différents types de réponses moléculaires

RMM : réponse moléculaire majeure, RM⁴ : réponse moléculaire 4 Log, RM^{4,5} : réponse moléculaire 4,5 Log, RM⁵ : réponse moléculaire 5 Log, RMC : réponse moléculaire complète

Les données démographiques à savoir l'âge et le sexe ainsi que les données cliniques ont été étudiées pour les patients ayant une réponse moléculaire complète. Nous avons étudié particulièrement les différentes réponses hématologique, cytogénétique et moléculaire selon les objectifs thérapeutiques définis par l'European Leukemia Net et l'OMS 2016 [2]. Les différents délais de réponse thérapeutiques ont été calculés en mois par rapport à la prise de l'ITK de 1ère génération.

RESULTATS

Un total de 1410 échantillons soit une moyenne de 403 échantillons/an correspondant à 270 patients ont été analysés. Chaque patient aurait bénéficié d'un nombre moyen de prélèvements égal à 6 avec des extrêmes allant de 2 à 13 durant la période d'étude.

Une réponse moléculaire majeure ou plus était retrouvée dans 1117/1410 (79,2%) prélèvements relatifs à 258 (95,6%) patients. Une réponse moléculaire complète était retrouvée dans 32 prélèvements correspondant à 16 patients (Tableau I). Dans notre série, la plus petite valeur de quantification détectée était de 0,000034%.

L'âge médian des patients ayant achevé une réponse moléculaire complète était de 51 ans avec

de extrêmes allant de 35 à 73. Le sex-ratio (H/F) était de 1,28.

Un traitement par ITK de 1ère génération a été initié chez les patients de ce groupe dans un délai moyen de 2,4 mois (0-12). Tous ces patients ont atteint une réponse hématologique complète au bout de 3 mois. Une réponse cytogénétique complète à 6 mois a été atteinte dans 10 cas.

Dix patients (63%) ont atteint une réponse moléculaire majeure au bout de 12 mois sous ITK 1ère génération. Une réponse moléculaire complète a été atteinte dans un délai médian de 24 mois (6-240). Le plus bref et le plus long délai de réponse moléculaire ont été retrouvés chez un patient de sexe féminin et de sexe masculin respectivement (6 versus 240 mois). Le recours à un ITK de 2ème génération a été instauré chez 3 patients. Un patient avait atteint une réponse moléculaire complète sous l'ITK de 1ère génération et les deux autres l'ont atteint sous Dasatinib et Nilotinib (Tableau II).

Deux patients avec réponse moléculaire complète maintenue depuis plus de 2 ans (un homme et une femme) dont l'âge est de 53 et 40 ans respectivement, sont en arrêt de traitement depuis une durée moyenne de 17,2 mois. Un 3ème patient est proposé pour un éventuel arrêt thérapeutique.

Tableau I : Répartition des échantillons/patients selon le type de réponse moléculaire

| | Nombre échantillons n (%) | Nombre de patients n (%) |
|---|------------------------------|-----------------------------|
| Absence de réponse moléculaire | 353 (24%) | 12 (4%) |
| Réponse moléculaire majeure | 562 (38%) | 117 (43%) |
| Réponse moléculaire 4 Log | 177 (12%) | 37 (14%) |
| Réponse moléculaire 4,5 Log | 123 (8%) | 28 (10%) |
| Réponse moléculaire 5 Log | 223 (15%) | 60 (23%) |
| Réponse moléculaire complète | 32 (2%) | 16 (6%) |
| Total | 1470 (100%) | 270 (100%) |

DISCUSSION

L'importance pronostique du suivi moléculaire des patients atteints de LMC est maintenant bien établie [3, 4]. Le suivi moléculaire a été mis en place dans notre service depuis 2015, après validation de la méthode GenExpert. La transcription inverse quantitative en temps réel (qRT-PCR) est la méthode la plus sensible disponible pour détecter les faibles nombres de copies des produits de fusion BCR-ABL [5]. Les méthodes qRT-PCR actuellement utilisées sont très complexes, laborieuses et manquent de standardisation, et les résultats doivent être rapportés par rapport à un standard international [6].

Cepheid a récemment introduit son test GeneXpert pour l'identification des cellules leucémiques hébergeant la fusion du gène BCR-ABL à partir d'échantillons de sang. Cet instrument automatisé autonome intègre la préparation d'échantillons microfluidiques avec la détection de signaux fluorescents en temps réel par RT-PCR, et les résultats sont exprimés par rapport au standard international. Pratiquement tous les réactifs utilisés pour la préparation de l'ARN et les étapes ultérieures de RT-PCR et de PCR sont lyophilisés dans une cartouche multichambre jetable, ce qui

permet de réduire les biais liés aux réactifs et aux pipettes. L'échantillon est transféré à travers les chambres pendant le processus d'extraction par l'action de pompage d'un piston central ; ensuite, l'ARN purifié atteint la chambre de détection où la transcription inverse, les étapes d'amplification multiplexée et la détection du signal fluorescent ont lieu.

Cette méthode permet une détection reproductible de faibles niveaux de transcrits avec une limite de détection (L.O.D) et de quantification (L.O.Q) prouvées de 4,5 log (<0,0032%). Elle présente de nombreux avantages. L'automatisation est quasi-totale avec des temps de manipulations < 30min et une rapidité d'exécution (durée totale du test 2h30min), d'où la possibilité d'un ajustement thérapeutique rapide si les résultats montraient une augmentation du taux de transcrit BCR-ABL. Cependant, les principales limites du test sont: le type de transcrits détectés qui se résument uniquement aux transcrits b2a2 et b3a2 et le coût élevé des cartouches [1]. La méthode automatisée GeneXpert Cepheid® n'est validée que pour le monitoring des patients ayant au diagnostic les transcrits sus cités.

Cette technique est entrée en vigueur dans notre centre pour le monitoring des patients LMC traités par ITK.

Les objectifs thérapeutiques de la LMC sont en perpétuelle évolution. Le contrôle à long terme de la maladie et le maintien d'une réponse clinique et cytogénétique étaient auparavant l'objectif principal des cliniciens. Plus récemment, la rémission moléculaire maintenue est entrée dans la pratique courante et est de plus en plus adoptée comme objectif ultime de la thérapie [7].

L'International Randomized Study of Interferon versus STI571 a défini plusieurs seuils de réponses moléculaires permettant d'ajuster la conduite thérapeutique selon l'évolution de la LMC. Dans notre étude, une réponse moléculaire majeure ou plus a été retrouvée dans 258 cas (95%) sur les 270 patients atteints de LMC en réponse cytogénétique complète. Des taux de rémissions aussi élevés ont été rapportés par d'autres auteurs : 98 % dans la série de Tethova et al. [8] et 100% dans celle de Usman et al [9]. Ce taux était plus faible (58%) dans la série algérienne de Hadrieche et al [10].

Par ailleurs, dans une autre série Tunisienne, le taux de la réponse moléculaire majeure ou plus évaluée par RTq-PCR, a été de 80% [11].

Les réponses moléculaires 4Log, 4,5Log et 5Log ont été rapportées à un taux de 12, 11 et 22% respectivement dans la série algérienne réalisée par le Cepheid Xpert Monitor Assay™ [10] ce qui est comparable avec notre étude.

Dans notre série les meilleurs délais de réponse ont été observés chez les patients de sexe féminin. Ceci a été retrouvé dans certaines études ayant montré

que le sexe féminin a été corrélé avec les meilleures réponses moléculaires [12].

Certaines études se sont intéressées à l'étude de l'éventuel arrêt de traitement par ITK en cas de réponse moléculaire complète maintenue dans le temps. Mahon et al. ont étudié dans le protocole STIM la persistance de la rémission moléculaire après arrêt d'ITK chez 100 patients suivis pour LMC qui étaient sous Imatinib pendant au moins 3 ans et avaient une réponse moléculaire complète > 5Log maintenue depuis plus de 2 ans [13]. Les résultats de cette étude sont plutôt prometteurs. Ils ont montré que près de 40% de ces patients maintenaient une réponse moléculaire > 5Log persistante au-delà de 5 ans. Dans notre étude, deux patients sont en arrêt de traitement par ITK avec un maintien de réponse moléculaire profonde depuis une durée moyenne de 17,2 mois.

CONCLUSION

La quantification des ARN BCR-ABL1 est de plus en plus standardisée permettant d'avoir une évaluation objective de l'évolution de la maladie et de proposer une conduite thérapeutique commune à tous les cliniciens. Dans notre centre, l'utilisation du test Xpert BCR-ABL Monitor représente une alternative robuste et reproductible à la RT-qPCR. Ce test est entièrement automatisé, exprimé en ratio BCRABL/ABL et aligné sur l'échelle internationale. Il présente une sensibilité dans l'intervalle nécessaire à la prise de décisions cliniques (dégression ou arrêt de traitement) chez les patients ayant achevé une réponse moléculaire de type RM4.5.

Tableau II : Données démographiques et cliniques des patients

| | Age | sexe | Délai de début ITK ^a | RHC ^b à 3 mois* | RCyCt ^c 6 mois* | Délai RCyCt ^{c*} | RMM ^d 12 mois* | Délai RMM ^{d*} | Délai RMC ^{e*} | Recours ITK ^a 2G |
|------------|-----|-------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| P1 | 56 | Homme | 0 | Oui | Oui | 6 | oui | 12 | 18 | Non |
| P2 | 53 | Homme | 3 | Oui | Oui | 6 | ND | NA | ND | Non |
| P3 | 48 | Homme | 2 | Oui | Non | - | Non | - | - | Oui (Dasatinib) |
| P4 | 57 | Femme | 0 | Oui | Oui | 6 | Oui | 12 | 12 | Non |
| P5 | 35 | Femme | 1 | Oui | Oui | 6 | Oui | 6 | 6 | Non |
| P6 | 38 | Homme | 3 | Oui | Non | 12 | Non | 24 | 100 | Non |
| P7 | 60 | Femme | 9 | Oui | Non | 12 | Oui | 12 | 30 | Non |
| P8 | 46 | Homme | 4 | Oui | ND | - | Non | 30 | 240 | Oui (Nilotinib) |
| P9 | 73 | Femme | 1 | Oui | Non | 12 | Oui | 12 | 12 | Non |
| P10 | 54 | Femme | 1 | Oui | Oui | 3 | Oui | 9 | 12 | Non |
| P11 | 42 | Homme | 1 | Oui | Non | 12 | Oui | 12 | 30 | Non |
| P12 | 40 | Femme | 0 | Oui | Oui | 6 | Oui | 6 | 12 | Non |
| P13 | 57 | Homme | 12 | Oui | Oui | 6 | Non | - | - | Oui (nilotinib) |
| P14 | 46 | Homme | 0 | Oui | Oui | 6 | Non | 18 | 42 | Non |
| P15 | 56 | Homme | 2 | Oui | Oui | 6 | Oui | 12 | 36 | Non |
| P16 | 46 | Femme | 0 | Oui | Oui | 6 | Oui | 12 | 18 | Non |

^a : inhibiteur de la thyrosine kinase ^b : Réponse hématologique complète ^c : Réponse cytogénétique complète ^d : Réponse moléculaire majeure ^e : Réponse moléculaire complète ND : non déterminé. *les délais sont calculés par rapport à la prise d'ITK de 1^{ère} génération

RÉFÉRENCES

- [1] Jobbagy Z, van Atta R, Murphy KM, Eshleman JR, Gocke CD. Evaluation of the Cepheid GeneXpert BCR-ABL assay. *Journal Mol Diagn.* 2007;9(2):220-227.
- [2] Cayuela J-M, Chomel J-C, Coiteux V, Dulucq S, Escoffrebarbe M, Etancelin P, et al. Recommandations du France Intergroupe des leucémies myéloïdes chroniques (Fi-LMC) pour l'examen des mutations du domaine kinase de BCR-ABL1 dans la leucémie myéloïde chronique. *Bulletin du Cancer.* 2020;107(1):113-128.
- [3] Olavarria E, Kanfer E, Szydlo R, Kaeda J, Rezvani K, Cwynarski K, et al. Early detection of BCR-ABL transcripts by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction predicts outcome after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2001;97(6):1560-1565.
- [4] Mughal TI, Yong A, Szydlo RM, Dazzi F, Olavarria E, van Rhee F, et al. Molecular studies in patients with chronic myeloid leukaemia in remission 5 years after allogeneic stem cell transplant define the risk of subsequent relapse. *Br J Haematol.* 2001;115(3):569-574.
- [5] Goldman J. Monitoring minimal residual disease in BCR-ABL-positive chronic myeloid leukemia in the imatinib era. *Curr Opin Hematol.* 2005;12(1):33-39.
- [6] Hochhaus A. A further milestone towards comprehensive standardization of quantitative RT-PCR protocols for leukemic fusion gene transcripts has been reached. *Leukemia.* 2003;17(12):2383-2384.
- [7] Shanmuganathan N, Hughes TP. Molecular monitoring in CML: how deep? How often? How should it influence therapy? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2018;2018(1):168-176.
- [8] Tothova E, Kafkova A, Fricova M, Benova B, Kirschnerova G, Tothova A. Imatinib mesylate in Philadelphia chromosome-positive, chronic-phase myeloid leukemia after failure of interferon alpha. *Neoplasma.* 2005;52(1):63-67.
- [9] Usman M, Kakepoto G, Adil S, Sajid R, Arain S, Khurshid M. Hematologic and cytogenetic findings in eleven chronic myelogenous leukemia patients treated with imatinib mesylate at a tertiary care hospital. *J Pak Med Assoc.* 2004;54(1):17.
- [10] F Harieche NA, F Boukhemia, W Assouak, R Belhimer, F Zerhouni, RM Hamladji, et al. Quantification du transcrit BCR-ABL1 avec la XPERT BCR-ABL monitor ASSAYET XPERT BCR-ABL ULTRA(CEPHEID) 2017 consulté le 03/05/2020. Available from: <https://www.hematologie-dz.com/online/uploads/2018/RH-13-14.pdf>.
- [11] Menif S, Ben Youssef Y, Bellaaj H, Ben Lakhel R, Laatiri A. Suivi moléculaire des patients tunisiens atteints de leucémie myéloïde chronique. *La Tunisie Médicale.* 2017;95(12):229-231.
- [12] Lin HX, Sjaarda J, Dyck J, Stringer R, Hillis C, Harvey M, et al. Gender and BCR-ABL transcript type are correlated with molecular response to imatinib treatment in patients with chronic myeloid leukemia. *Eur J Haematol.* 2016;96(4):360-366.
- [13] Mahon F-X, Réa D, Guilhot J, Guilhot F, Huguet F, Nicolini F, et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol.* 2010;11(11):1029-1035.