



HAL
open science

Mécanismes de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase sur le modèle de leucémie myéloïde chronique

Sami Mohamad Joha

► **To cite this version:**

Sami Mohamad Joha. Mécanismes de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase sur le modèle de leucémie myéloïde chronique. Sciences du Vivant [q-bio]. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2009. Français. NNT: . tel-00451045

HAL Id: tel-00451045

<https://theses.hal.science/tel-00451045>

Submitted on 28 Jan 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DU DROIT ET DE LA SANTÉ-LILLE 2

THÈSE

Présentée pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DU DROIT ET DE LA
SANTÉ**

**DISCIPLINE: Biomolécules, Pharmacologie, Thérapeutique
Spécialité: Hématologie et transfusion**

par

Mohamad Sami JOHA

**Mécanismes de résistance aux inhibiteurs de tyrosine
kinase sur le modèle de leucémie myéloïde chronique.**

Thèse dirigée par le **Pr Claude PREUDHOMME** et le **Docteur Thierry IDZIOREK**

Soutenue le **15 décembre 2009** devant le Jury composé de :

Professeur	Bruno QUESNEL	Président
Professeur	Philippe ROUSSELOT	Rapporteur
Docteur	Franck-Emmanuel NICOLINI	Rapporteur
Professeur	François-Xavier MAHON	Examineur
Professeur	Claude PREUDHOMME	
Docteur	Thierry IDZIOREK	

Résumé

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une transformation maligne d'une cellule souche hématopoïétique, caractérisée par une anomalie génétique acquise : le chromosome Philadelphie (Ph), résultant de la translocation réciproque $t(9;22)(q34;q11)$, et son équivalent moléculaire, l'oncogène *BCR-ABL*. La protéine *BCR-ABL* présente une activité tyrosine kinase constitutive qui agit sur les voies de survie et de prolifération. La progression de la maladie vers la phase accélérée puis blastique s'accompagne d'anomalies génétiques additionnelles marqueurs d'une instabilité génomique croissante. La responsabilité de *BCR-ABL* dans la genèse de cette instabilité génomique est fortement suspectée. Dérivé de 2-phénylamino-pyrimidines, l'Imatinib inhibe l'activité tyrosine kinase de *BCR-ABL* ainsi que la prolifération de lignées cellulaires *BCR-ABL* positives et induit leur apoptose. Les échecs du traitement par l'Imatinib sont dus à des mécanismes de résistance qui ne sont pas tous entièrement caractérisés. Des nouveaux inhibiteurs de tyrosine kinases (ITKs) ou des associations avec l'Imatinib ont été développés afin de la surmonter. Cependant, une résistance croisée et multiple demeure difficile à traiter et nécessite une meilleure compréhension des mécanismes de résistance afin d'éradiquer la maladie dans un avenir proche.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont montré que la présence de microremaniements génétiques (traduisant une instabilité) au sein de progéniteurs leucémiques CD34⁺ de patients traités par l'Imatinib corrélait avec la perte de réponse à l'Imatinib chez les patients diagnostiqués en phase chronique, suggérant que la résistance à l'Imatinib pourrait être corrélée aux altérations génétiques survenant précocement dans la physiopathologie de la maladie. 113 gènes affectés ont été détectés dont certains sont localisés dans des régions connues pour être hypervariables (CNV) suggérant un rôle de ces régions dans le développement de la LMC ou la résistance à l'Imatinib. Nous avons mis en évidence la présence d'une anomalie acquise récurrente dans telle région localisée en 8p23.1 qui groupe les gènes de la famille de la Défensine B. Ce microremaniement n'est pas lié à la résistance à

l'Imatinib car il est retrouvé dans les populations cellulaires CD34⁺ Ph⁺ et Ph⁻, il peut donc être considéré comme un marqueur de l'instabilité d'une sous-population cellulaire clonale de CD34⁺ présentant une grande prédisposition à acquérir des altérations génétiques additionnelles, comme la fusion **BCR-ABL**.

Nos études montrent que des altérations secondaires pourraient être le support d'une résistance à l'Imatinib. La résistance à l'Imatinib peut alors être liée à la dérégulation des voies de signalisation en amont ou en aval de **BCR-ABL**, affectant ainsi la prolifération, la survie, la différenciation et l'intégrité du génome. Il semble donc que le traitement par l'Imatinib seul ne soit pas suffisant pour éradiquer la maladie. Pour cette raison, de nouvelles molécules à associer avec l'Imatinib sont actuellement en cours d'évaluation. Parmi ces associations, les inhibiteurs de la voie Ras ont montré une certaine efficacité dans la restauration de l'activité proapoptotique de l'Imatinib. Il était donc intéressant de chercher une cible thérapeutique régulant négativement cette voie afin de surmonter cette résistance. GILZ (Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper) inhibe la voie Ras/Raf par une interaction directe. Il inhibe également la voie NFκB dont certains antagonistes sont capables de surmonter la résistance à l'Imatinib. Nos résultats montrent, pour la première fois, que l'expression de GILZ est diminuée dans des lignées humaines ou murines exprimant **BCR-ABL** sensibles ou résistantes aux ITKs ainsi que dans les cellules dormantes résiduelles isolées d'un modèle cellulaire murin développé au laboratoire. L'expression forcée de GILZ dans ces lignées résistantes restaure la sensibilité à l'Imatinib. Nos résultats montrent que le mécanisme passe par une inhibition de la voie mTORC2/Akt^{Ser473}. Elle est due à une interaction directe de GILZ avec mTORC2 permettant l'activation de FoxO3a et l'induction de l'expression de la protéine proapoptotique Bim. Dans ce système, GILZ augmente l'expression de Bim tandis qu'Imatinib, par ses effets "**Off-target**", diminue celle de Mcl-1 inversant ainsi le rapport des membres antiapoptotiques/proapoptotiques de la famille Bcl-2 et entraînant l'apoptose. Le traitement séquentiel par les glucocorticoïdes puis l'Imatinib induit l'apoptose de cellules souches de patients résistants par le même mécanisme, suggérant que la modulation de l'expression de GILZ pourrait

représenter une nouvelle stratégie thérapeutique pour cibler les cellules leucémiques résistantes ou résiduelles.

La régulation de la voie mTORC2/Akt^{Ser473} semble être d'une importance cruciale dans la survie des cellules **BCR-ABL**⁺, ainsi que dans la résistance aux ITKs. Parmi les gènes méthylés dans notre étude, on retrouve un gène impliqué dans la régulation de cette voie et qui code pour la phosphatase PHLPP (PH domain and Leucine rich repeat Protein Phosphatase) dont l'activité est de déphosphoryler la sérine 473 d'Akt favorisant son inactivation. Nos résultats montrent que la réexpression du variant 1 de cette phosphatase (PHLPP1) dans notre modèle murin de résistance restaure la sensibilité à l'Imatinib et que la répression de celui-ci n'est pas exclusivement due à l'activité tyrosine kinase de **BCR-ABL**, mais aussi à des modifications épigénétiques.

Nos études ont permis d'identifier des gènes impliqués dans la résistance des LMC aux ITKs et de proposer de nouveaux traitements pour surmonter cette résistance en inhibant la voie Akt^{Ser473}.

Publications

1: Alkhatib R, **Joha S**, Cheok M, Roumy V, Idziorek T, Preudhomme C, Quesnel B, Sahpaz S, Bailleul F, Hennebelle T. Activity of Ladanein on Leukemia Cell Lines and Its Occurrence in *Marrubium vulgare*. **Planta Med.** 2009 Jul 30. [Epub ahead of print]

2: Alkhatib R, Hennebelle T, **Joha S**, Idziorek T, Preudhomme C, Quesnel B, Sahpaz S, Bailleul F. Activity of elaeochytrin A from *Ferula elaeochytris* on leukemia cell lines. **Phytochemistry.** 2008 Dec;69(17):2979-83.

3: **Joha S**, Deluche L, Corm S, Daudignon A, Geffroy S, Quief S, Villenet C, Kerckaert JP, Lai JL, Preudhomme C, Roche-Lestienne C. Cryptic and partial deletions of PRDM16 and RUNX1 without t(1;21)(p36;q22) and/or RUNX1-PRDM16 fusion in a case of progressive chronic myeloid leukemia: a complex chromosomal rearrangement of underestimated frequency in disease progression? **Genes Chromosomes Cancer.** 2008 ;47(12):1110-7.

4: Liu J, **Joha S**, Idziorek T, Corm S, Hetuin D, Philippe N, Preudhomme C, Quesnel B. BCR-ABL mutants spread resistance to non-mutated cells through a paracrine mechanism. **Leukemia.** 2008 ;22(4):791-9.

5: Roche-Lestienne C, Deluche L, Corm S, Tigaud I, **Joha S**, Philippe N, Geffroy S, Lai JL, Nicolini FE, Preudhomme C; Fi-LMC group. RUNX1 DNA-binding mutations and RUNX1-PRDM16 cryptic fusions in BCR-ABL+ leukemias are frequently associated with secondary trisomy 21 and may contribute to clonal evolution and imatinib resistance. **Blood.** 2008 ;111(7):3735-41.

6- **Joha S**, Corm S, Nicolini FE, Tienne G, Guilhot F, Lippert E, Roumier C, Nibourel O, Crardel N, Maguer-Satta V, Idziorek T, Kerckaert JP, Lai JL, Preudhomme C, Roche-Lestienne C. Characterization of the genetic instability in chronic myeloid

leukaemia patients by acquired copy number alteration analysis of CD34+ cell populations. Under revision in **Genes Chromosomes and Cancer**.

7- Joha S, Idziorek T, Roche-Lestienne c, Preudhomme C, Quesnel B. Pleckstrin homology Domain Leucine-rich repeat protein phosphatase gene 1 is methylated in CML and its reexpression induces cell death in Imatinib-resistant cells. Under revision in **Leukemia Research**.

8- Joha S, Hétuin D, Jouy N, Dezitter X, Dauphin V, Corm S, Mahon FX, Roche-Lestienne C, Preudhomme C, Quesnel B, Idziorek T. Gilz overcomes resistance to BCR-ABL Tyrosine Kinase inhibitors by inhibiting the mTORC2 pathway. Under revision in **Cancer Research**.

Abréviations

4E-BP	eIF4E-binding proteins
ABI	Abl-interactor protein
Abl	Abelson
Akt	V-akt murine thymoma viral oncogene
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	ATM and Rad3-related
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
Bcr	Breakpoint Cluster Region
BER	Base excision repair
BRCA1	Breast cancer associated protein 1
Cbl	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence
Cdc6	cell division cycle 6
CDK	Cyclin-dependent kinase
c-Kit	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
Crk	sarcoma virus CT10 oncogene homolog
Crkl	sarcoma virus CT10 oncogene homolog-like
DNA-PK	DNA dependent protein kinase
DNMT	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase
eIF4E	elongation initiator factor 4 ^E
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
Fos	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
FoxO3a	Forkhead box O3a
GAP	GTPases-activating protein
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GILZ	Glucocorticoid-induce leucine zipper
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
GβL	G protein beta subunit-like
HAT	Histone acetyltransferase
HDAC	Histone deacetylase

HR	Homologous recombinaison
hTERT	Human telomerase reverse transcriptase
hTR	Human telomerase RNA
IKKa	I-kappa-B Kinase alpha
Jak	Janus kinase
Jun	Jun oncogene
Lyn	Lck/Yes-related novel tyrosine kinase
Mdm2	Murine double minute 2
MEK1	MAPK/ERK kinase 1
MMR	MisMatch repair
Myc	myelocytomatosis viral oncogene homolog
NER	Nucleotide excision repair
NFκB	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
NHEJ	Non homologous end joining
NK	Natural Killer cell
NQO2	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2
P53	Tumor protein p53
P73	Tumor protein p73
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
Pdk1	3'-phosphoinositide dependent kinase 1
Ph	Philadelphia chromosome
PHLPP	PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase
PKC	Protein kinase C
PP2A	Protein phosphatase 2 (formerly 2A)
PRAS40	Proline-rich Akt substrate 40 kDa
Protor	Protein observed with Rictor
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
Raf-1	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
Raptor	Regulatory associated protein of mTOR
Ras	Rat sarcoma viral oncogene homolog

Rho	Ras homolog gene family
Rictor	Rapamycin-insensitive companion of mTOR
ROS	Reactive oxygen species
SET	SET nuclear oncogene
SHIP	SH2 containing inositol-5 phosphatase
SOCS	Suppressor of cytokine signaling
SOS	Son of sevenless
STAT	Signal transducers and activators of transcription
TSC1	Tuberous sclerosis 1
TSC2	Tuberous sclerosis 2

Table des matières

Résumé	i
Publications	iv
Abréviations	vi
Table des matières	ix
CHAPITRE I : INTRODUCTION	2
1.1 Le Cancer	2
1.2 La leucémie myéloïde chronique	3
1.2.1 Les leucémies	3
1.2.1.1 Les leucémies aiguës	4
1.2.1.2 Les leucémies chroniques	4
1.2.2 La leucémie myéloïde chronique	4
1.2.2.1 Définition	4
1.2.2.2 Evolution	5
1.2.2.3 Mécanisme moléculaire	7
1.2.2.4 La signalisation leucémogène de la protéine BCR-ABL	10
1.2.2.3 Traitements	23
1.3 Imatinib	25
1.3.1 Naissance	25
1.3.2 Mode d'action	26
1.3.3 Enfance (Gleevec)	27
1.3.4 Jeunesse	28
1.4 Résistance à l'Imatinib	30
1.4.1 Définition de la résistance à l'Imatinib	30
1.4.2 Mécanismes de la résistance à l'Imatinib	31
1.4.2.1 Résistance dépendante de BCR-ABL	31
1.4.2.2 Résistance indépendante de BCR-ABL	34
1.4.2.3 Cellules souches leucémiques quiescentes	39
1.5 Surmonter la résistance à l'Imatinib	39
1.5.1 Les inhibiteurs de Tyrosine Kinase (ITKs) de seconde génération	40

1.5.1.1 Les ITKs de BCR-ABL ATP-Compétitifs	40
1.5.1.2 Les ITKs de SRC/ABL	41
1.5.1.3 Les ITKs de T315I	43
1.5.1.4 Les ITKs allostériques	44
1.5.2 Nouvelles molécules à associer ou pas à l'Imatinib	45
1.5.2.1 Homoharringtonine	45
1.5.2.2 Les inhibiteurs de HSP90	46
1.5.2.3 L'arsenic trioxyde	46
1.5.2.4 Les inhibiteurs de protéasome	46
1.5.2.5 Les inhibiteurs de CDK (Cyclin-Dependent Kinase)	47
1.5.2.6 Les inhibiteurs DNMTs (DNA-Methyltransferase)	47
1.5.2.7 Les inhibiteurs de HDAC (Histones désacétylases)	48
1.5.2.8 Les inhibiteurs de Farnesyl transférase	49
1.5.2.9 Les inhibiteurs de MEK1/2	50
1.5.2.10 Les inhibiteurs de la voie PI3K/Akt/mTOR	50
CHAPITRE II : OBJECTIFS	53
CHAPITRE III : RESULTATS	57
Partie I	57
Partie II	59
Partie III	60
CHAPITRE IV : DISCUSSION	62
CHAPITRE V : BIBLIOGRAPHIE	75

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1 Le Cancer

Le cancer est une **maladie** résultant d'**altérations de l'ADN** cellulaire, survenant dans 90% des cas dans **les cellules somatiques**. Ces anomalies de l'ADN peuvent être d'origine **génétique** ou **épigénétique** et sont **transmissibles** aux cellules filles. Dans 10% des cas, il s'agit d'un cancer héréditaire. Les cellules néoplasiques, bénignes ou malignes, sont diverses et hétérogènes. Cependant, toutes ces cellules ont comme caractéristique commune de proliférer en dépit des contrôles normaux. Les cellules néoplasiques malignes ont en plus la capacité d'envahir et de coloniser les tissus environnants. Il est clairement établi que le développement d'un cancer est le résultat d'une combinaison entre, d'une part, l'activation de voies favorisant la prolifération cellulaire et, d'autre part, l'inhibition de signaux restreignant le potentiel prolifératif des cellules. Hanahan *et al.* (2000) ont proposé de classer ces différentes modifications en six catégories, qui semblent généralement retrouvées dans chaque type de cancer ¹ : une autosuffisance en signaux de croissance, une résistance à l'**apoptose**, une insensibilité aux signaux d'inhibition de croissance, un potentiel réplicatif infini ("immortalisation"), un potentiel de néovascularisation et une capacité d'invasion tissulaire. La cellule cancéreuse n'est pas impliquée seule dans le développement de la tumeur. Ainsi, de nombreux travaux soulignent l'importance des cellules de l'environnement péri-tumoral (ou stroma péri-tumoral). Ces cellules non tumorales (fibroblastes, cellules immunitaires, cellules endothéliales vasculaires...) sont des collaboratrices actives de la cellule tumorale ^{2,3}. Elles peuvent favoriser la croissance tumorale en induisant, par exemple, l'expression de protéases extracellulaires, de facteurs de croissance, de facteurs angiogéniques ou encore de chimiokines. A l'opposé, ces cellules peuvent également limiter le développement tumoral par exemple via la réponse immunitaire anti-tumorale.

Différents agents conduisent au développement d'un cancer. Classiquement, on distingue les agents initiateurs et les agents promoteurs. Les agents initiateurs

sont des agents génotoxiques qui induisent une lésion définitive de l'ADN. Par contre, les agents promoteurs n'induisent pas de lésions de l'ADN mais favorisent l'expression d'une lésion, préalablement induite par un agent initiateur ⁴.

Un autre champ de recherche actif en cancérologie concerne **les cellules souches tumorales** ⁵⁻⁷. L'existence de cellules souches tumorales a d'abord été suggérée dans les tumeurs hématopoïétiques, puis cette notion s'est étendue aux tumeurs solides (tumeurs cérébrales, tumeurs du sein...). Ces cellules souches tumorales seraient des cellules initiatrices de tumeur, définies par leur capacité à s'auto-renouveler et à maintenir la croissance de la tumeur et son hétérogénéité. Ces cellules, très rares, présenteraient par ailleurs une résistance aux différents traitements anti-tumoraux, d'où l'importance de leur identification et de leur caractérisation permettant d'imaginer de nouvelles thérapies qui cibleraient ces cellules, afin d'éradiquer définitivement la tumeur. De nombreuses recherches sur ces cellules souches tumorales sont actuellement en cours mais beaucoup de questions restent encore posées.

1.2 La leucémie myéloïde chronique

1.2.1 Les leucémies

Les leucémies sont des cancers caractérisés par une prolifération maligne des cellules de la moelle osseuse (cellules **sanguines** ou **précurseurs** de cellules sanguines) appelé également **tumeur liquide**, à distinguer des lymphomes qui sont aussi des tumeurs de cellules du sang mais se développant dans les aires lymphoïdes secondaires ⁸⁻¹⁰. Chaque type de leucémie peut progresser différemment, mais généralement les cellules malignes prennent la place des cellules normales et empêchent leurs fonctions. Sans traitement efficace, les cellules leucémiques envahissent d'autres organes et aboutissent à une conséquence fatale. La leucémie est cliniquement et pathologiquement scindée en deux : leucémie aiguë et chronique. Elle est aussi scindée en fonction de l'origine des cellules tumorales : cellules lymphoïdes et cellules myéloïdes.

1.2.1.1 Les leucémies aiguës

Ce sont des leucémies caractérisées par la prolifération rapide de cellules immatures du sang, anormales histologiquement et inefficaces fonctionnellement^{8,10,11}. Les leucémies aiguës apparaissent chez l'enfant et le jeune adulte. Un traitement immédiat doit être effectué pour éviter la diffusion de ces cellules aux organes.

1.2.1.2 Les leucémies chroniques

Au contraire des leucémies aiguës, les cellules cancéreuses sont plus matures, bien que toujours anormales et passant dans le sang, l'évolution se fait sur des mois à des années^{8,12,13}. Les cellules tumorales sont créées en plus grand nombre que la normale mais au début suffisamment faiblement pour ne pas entraîner le décès. Les leucémies chroniques arrivent principalement chez les personnes âgées. Ce type de leucémie peut être traité plus tardivement permettant ainsi de voir pendant un laps de temps le mécanisme et l'évolution de la maladie pour mieux la traiter.

1.2.2 La leucémie myéloïde chronique

1.2.2.1 Définition

Appelée également leucémie myélogène, leucose myéloïde, myélose leucémique de Schridde, La leucémie myéloïde chronique (LMC) est un syndrome myéloprolifératif clonal dû à la transformation d'une cellule souche pluripotente. Elle se caractérise entre autres, par la présence dans le sang du patient d'une augmentation considérable du nombre de globules blancs (hyperleucocytose) pouvant aller de 100 à 300 000. Cette pathologie est liée à une anomalie chromosomique dite chromosome Philadelphie qui correspond à un chromosome 22 raccourci, résultat de la translocation réciproque et équilibrée entre les bras longs des chromosomes 9 et 22 : $t(9;22)(q34;q11)$ (Figure 1)¹⁴⁻¹⁷.

L'étiologie de LMC est inconnue, mais dans 5% des cas elle est secondaire à une exposition chronique au benzène ou aux radiations ionisantes. Le nombre de

INTRODUCTION

nouveaux cas par année est estimé d'être entre 600 et 1000 cas en France. L'incidence augmente au fur et à mesure que l'âge avance et on constate, d'autre part, une très légère prédominance masculine.

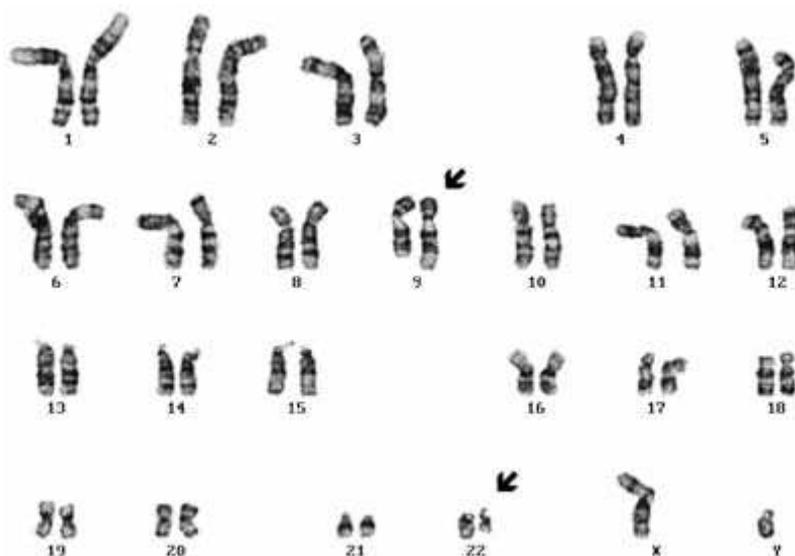


Figure 1 Caryotype médullaire montrant un chromosome 22 raccourcis correspondant au chromosome Philadelphie et un chromosome 9 plus long (der9).

1.2.2.2 Evolution

L'évolution de la leucémie myéloïde chronique se fait en trois phases. La première est une phase chronique (PC) suivie d'une phase d'accélération (PA) (10% des patients se présentent d'emblée à ce stade) et la troisième est une phase de transformation en leucémie aiguë ou phase blastique (TA ou PB) ¹⁸⁻²⁰.

1. *Phase chronique* : C'est habituellement le stade où se fait le diagnostic. Dans cette phase, la cellule granuleuse prédomine dans la moelle osseuse et dans la myélémie (Figure 2). Il existe une augmentation de basophiles et de plaquettes avec moins de 10% de blastes dans le sang. Environ 50% de patients ne présentent que peu ou pas de symptômes pendant cette phase précoce. La phase chronique peut durer de plusieurs mois à quelques années (durée moyenne de 5 à 6 ans), mais évoluera en définitive vers la phase suivante.

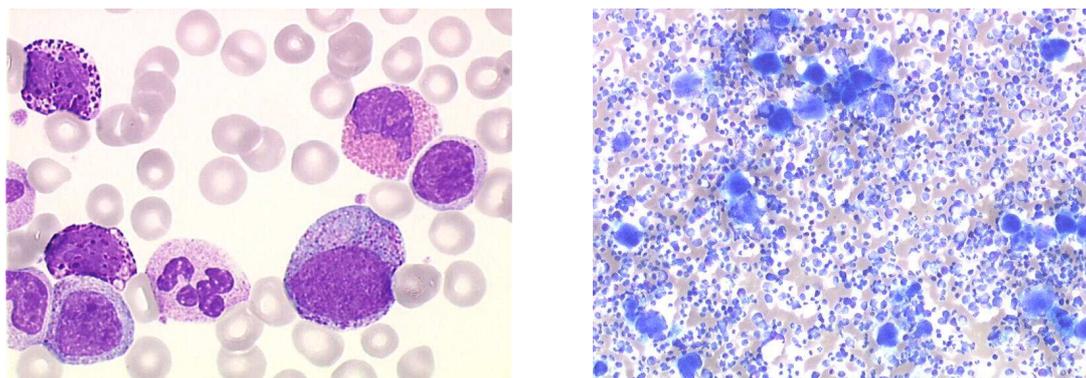


Figure 2 Aspect du frottis sanguin (gauche) et de l'étalement médullaire (droite) montrant une hyperplasie granuleuse pour LMC en PC.

2. *Phase d'accélération* : Cette phase constitue une étape intermédiaire observée dans environ 75 % des cas, entre la phase chronique et la phase blastique. L'hyperleucocytose et la myélémie augmentent malgré le traitement associé avec une augmentation de blastes dans le sang (15 au 20%). L'observation d'une hyperbasophilie importante (> 20 %) est un signe de mauvais pronostic. La durée moyenne de cette phase est de 6 à 9 mois.

3. *Phase blastique* : cette phase est marquée par tous les signes cliniques d'une leucémie aiguë : fièvre, amaigrissement, douleurs osseuses, anémie, thrombopénie, hyperleucocytose avec une population leucoblastique devenant rapidement prédominante, effaçant la polynucléose et la myélémie (Figure 3). Cette phase blastique, dont la survenue est inéluctable (médiane de survenue : 4 ans), ressemble à une leucémie aiguë. Il existe par définition une blastose sanguine ou médullaire supérieure à 30 %. Environ 20 % des acutisations sont de type lymphoïde, 50 % de type myéloïde et 20 à 30 % de type indifférencié ou associant des blastes de plusieurs lignées. L'espérance de vie après apparition des signes de l'acutisation est inférieure à 6 mois. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la progression sont mal connus : ils font sans doute intervenir une augmentation d'activité oncogénique (duplication du chromosome Ph1) et une instabilité génétique accrue ^{18,20}.

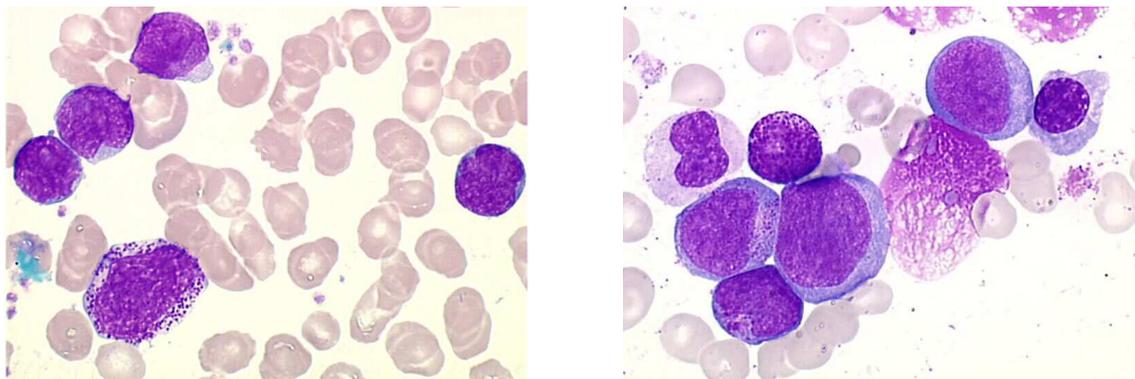


Figure 3 Aspect du sang pour LMC en phase blastique de type lymphoïde (gauche) et de type myéloïde (droite).

Il existe un score que l'on appelle l'indice de Sokal qui permet d'évaluer la gravité de la maladie. Ce score est basé sur une analyse multivariée qui a fait ressortir quatre facteurs pronostiques indépendants : l'âge, la taille de la rate, le pourcentage de blastes sanguins et la numération plaquettaire. Quand le score est faible (<0.8) la survie globale est d'environ 5 ans. La survie chute quand le score est élevé (>0.8).

1.2.2.3 Mécanisme moléculaire

Le chromosome Philadelphie est le résultat de la translocation réciproque et équilibrée entre les bras longs des chromosomes 9 et 22 : $t(9;22)(q34;q11)$ ^{16,21}. Sur le bras long du chromosome 9 la région *abl* (Abelson) se coupe et sa partie télomérique vient se localiser à la place de la partie télomérique du bras long du chromosome 22 dans une région appelée *bcr* (Breakpoint Cluster Region) ^{22,23}. Cette translocation aboutit à un chromosome 22 très court (Ph1) sur lequel se trouve le gène chimérique ***BCR-ABL***, formé du début de *BCR* et la fin d'*ABL* ²⁴. La conservation du cadre de lecture permet la synthèse d'ARN messagers hybrides dits chimériques comportant des séquences *BCR* en 5' et *ABL* en 3'. L'ARN chimérique est traduit en une protéine de fusion ***BCR-ABL*** ayant un pouvoir oncogénique avec activité tyrosine kinase constitutive. Les points de cassure sont souvent regroupés sur une seule région d'*ABL* (souvent entre les régions Ib et a2), alors qu'il existe plusieurs régions de cassure sur *BCR* dont la majorité surviennent dans les régions introniques (Figure 4) : La région M *BCR* (pour major *BCR*) est majoritairement impliquée dans la LMC dont le transcrit est b3a2 (60% des cas) ou b2a2 (35% des cas), qui produisent la protéine

INTRODUCTION

p210. La région m *BCR* (pour minor *BCR*) est impliquée dans 0.4 % des LMC et environ 65% des LAL Ph+ dont le transcrit est e1a2, qui produit la protéine p190. La région μ *BCR* (pour micro *BCR*) est impliquée dans < 0.1 % des LMC dont le transcrit est e19a2, qui produit la protéine p230^{14,15}.

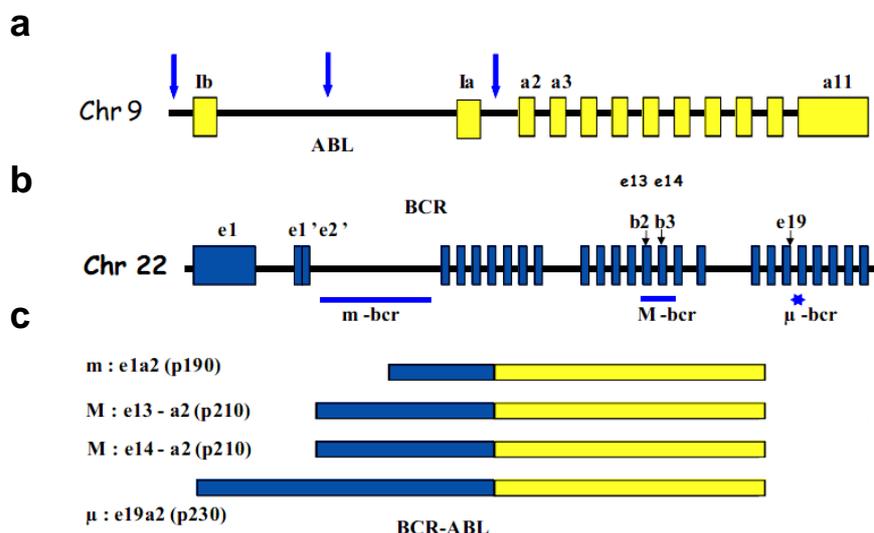


Figure 4 (a) le gène *ABL* situé sur le bras long du chromosome 9, s'étend sur 230 kb et comprend, de l'extrémité 5' centromérique vers l'extrémité 3', deux exons alternatifs (Ia et Ib) séparés par un intron de 200 kb, et dix exons numérotés de a2 à a11. (b) le gène *BCR* situé sur le bras long du chromosome 22, s'étend sur 135 kb et comprend 23 exons. (c) les différentes fusions *BCR-ABL*¹⁵.

1. *Fonctions de la protéine ABL* : Le gène *abl* code une protéine tyrosine kinase de 145 kDa, sans fonction de récepteur (Figure 5). Elle est exprimée de façon ubiquitaire et contrairement à la protéine *BCR-ABL*, qui est principalement localisée dans le cytoplasme, la protéine *ABL* est retrouvée tant dans le noyau que dans le cytoplasme^{25,26}.

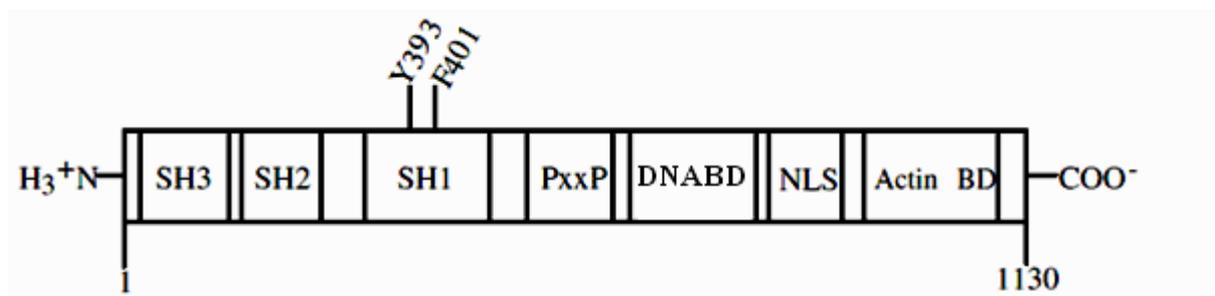


Figure 5 Structure de la protéine ABL.

La région N-terminale comporte un domaine d'interaction SH2, un domaine d'interaction SH3, ainsi que le domaine catalytique SH1 qui présente l'activité tyrosine kinase. Un domaine central riche en prolines (PxxP) permet des interactions

INTRODUCTION

avec des protéines possédant des domaines SH3. La région C-terminale présente un domaine de liaison à l'ADN (DNABD), trois signaux de localisation nucléaire (NLS : Nuclear Localisation Signal) et un site de liaison à l'actine. Dans son état normal, *ABL* se trouve être dans un état fermé (inactif) qui est la résultante d'interactions propres à la kinase (autoinhibition). Cet état inactif, peut être compromis, en faveur d'un état actif, et ce, par l'intervention d'autres protéines, dont d'autres kinases, qui s'associeront à l'*ABL*, et viseront à la rouvrir, modifiant ainsi sa conformation, de sorte que son substrat et l'ATP puissent avoir un accès au site de phosphorylation. L'autoinhibition d'*ABL* est assurée principalement par l'action d'un groupe myristoyl qui est rattaché au domaine N terminal de la kinase (le domaine SH3). Ce myristate trouve également un point d'ancrage réversible, au niveau d'une poche hydrophobe du lobe C du domaine kinase formant ainsi un verrou. Ce verrou a pour conséquence de fermer la kinase, en induisant un clamp entre les domaines SH et les deux lobes du domaine kinase ; les domaines SH2 et SH3 se retrouvant alors respectivement très proches des lobes C et N du domaine kinase. Le clamp ainsi créé, prévient la phosphorylation du segment d'activation en le séquestrant, de sorte que la tyrosine 412 de ce segment ne soit pas accessible aux kinases. Ce segment d'activation lorsqu'il est non phosphorylé sur Y412 empêche l'accrochage du substrat d'*ABL* et de l'ATP au niveau du domaine catalytique, grâce à une conformation non adaptée, non reconnue par les deux substrats ²⁷⁻³⁰. Le maintien de l'état inactif de la kinase, est un aspect primordial de la régulation, puisque si celle-ci se trouvait être active de façon constitutive, cela entraînerait de graves complications, telle la LMC ³¹.

La protéine *ABL* est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, la réponse au stress génotoxique et la transmission de l'information passant par les intégrines ^{25,32,33}. En plus, La protéine *ABL* peut induire l'apoptose en stabilisant la protéine p73 et/ou la protéine p53 ^{32,34}.

2. *Fonctions de la protéine BCR* : Le gène *bcr* code pour deux protéines de 160 et de 130 kDa, provenant de la traduction de deux ARNm de 6,7 et de 4,5 kb. La protéine *BCR* a une expression ubiquitaire avec des quantités élevées au niveau des cellules hématopoïétiques et du cerveau ³⁵. Elle est essentiellement cytoplasmique mais, dans certaines phases du cycle, elle est aussi détectable dans le noyau où elle

pourrait se lier à l'ADN ³⁶. Les fonctions biologiques normales de la protéine BCR sont encore mal connues (Figure 6).

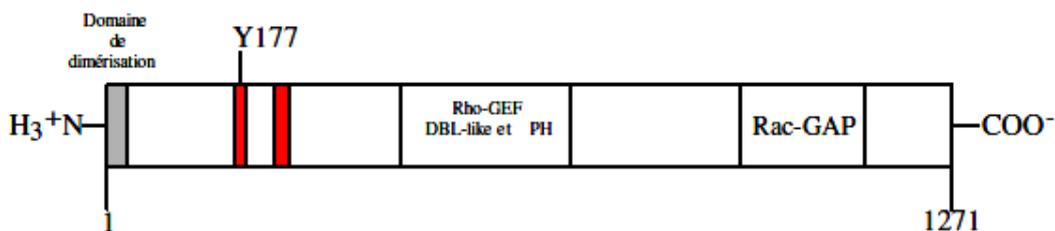


Figure 6 Structure de la protéine BCR.

La région N-terminale présente un domaine sérine/thréonine kinase et un domaine d'oligomérisation. Le domaine d'oligomérisation est responsable de l'homotétramérisation de la molécule et est indispensable à l'activité transformante de la molécule ³⁷. On retrouve dans la région centrale un domaine composé de séquences DBL-like et homologues à la pleckstrine qui stimulent l'échange GTP-GDP par les Rho-GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor). La région C-terminale présente des séquences homologues aux domaines catalytiques des protéines GAP (GTPases-activating protein) agissant sur Rac et régulant la polymérisation de l'actine ainsi que l'activité NADPH oxydase des macrophages et granulocytes neutrophiles. La protéine BCR peut être phosphorylée sur plusieurs résidus tyrosyl notamment, dans la région N-terminal, sur le résidu Tyr 177 qui lui permet d'interagir avec différentes protéines adaptatrices via leur domaine SH2 ³⁸.

1.2.2.4 La signalisation leucémogène de la protéine BCR-ABL

L'activité tyrosine kinase constitutive de la protéine ABL est un élément essentiel de la fonction leucémogène de la protéine de fusion **BCR-ABL**. Structuellement, la protéine **BCR-ABL** contient la plupart des domaines fonctionnels d'ABL, à l'exemple des domaines SH2 et SH3, du domaine tyrosine kinase SH1, du domaine de fixation à l'ADN et du domaine de liaison à l'actine. Contrairement à la protéine ABL dont la fonction est étroitement régulée, le domaine de oligomérisation de BCR, situé à l'extrémité N-terminale de la protéine de fusion, permet une activation constitutive de la fonction tyrosine kinase d'ABL et la localisation majoritairement cytoplasmique de la protéine **BCR-ABL** (Figure 7) ³⁹.

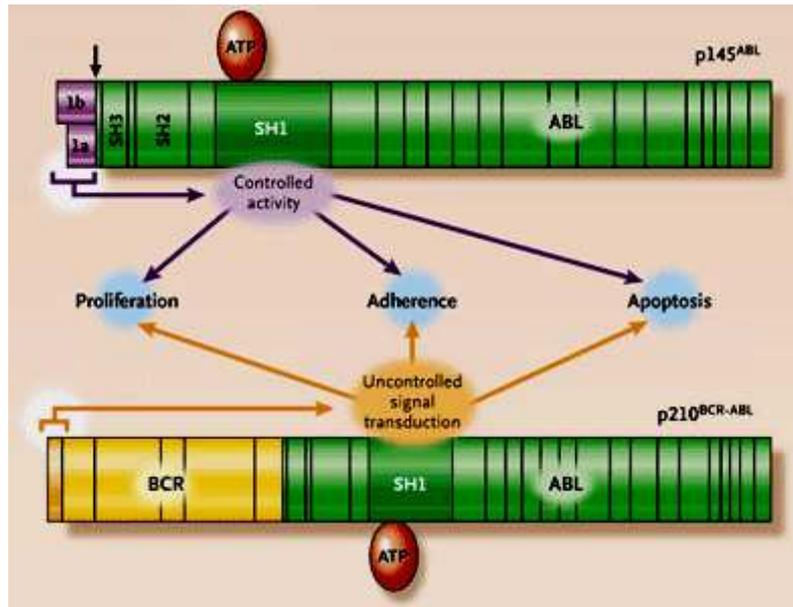


Figure 7 Structure de **BCR-ABL** comparée avec la structure de **ABL** ³⁹.

L'oligomérisation de l'oncoprotéine **BCR-ABL** permet une autophosphorylation croisée sur plusieurs résidus de tyrosine. Cette autophosphorylation crée des sites de fixation pour domaines SH2 des protéines adaptatrices ou catalytiques. En conséquence, **BCR-ABL** interfère avec des processus cellulaires normaux comme la prolifération, l'apoptose, l'adhérence et la stabilité génétique en activant des voies de transduction du signal de façon autonome (Figure 8) ^{39,40}.

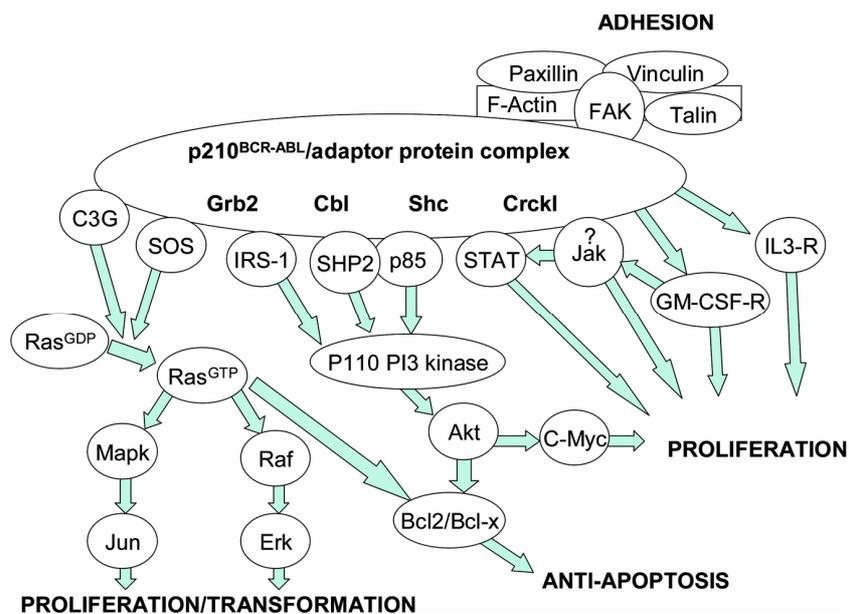


Figure 8 Principales voies de signalisation activées par **BCR-ABL** et leurs effets cellulaires ⁴⁰.

INTRODUCTION

1. *La voie Ras* : Ras est une petite protéine associée à la membrane par une ancre lipidique, ne contient qu'une seule petite sous-unité et possède une activité GTPasique. Le mécanisme moléculaire d'activation de la voie Ras par **BCR-ABL** commence par l'autophosphorylation du résidu tyrosyl 177 de *BCR* qui fournit un site d'ancrage au domaine SH2 de l'adaptateur Grb2. Grb2 recrute par son domaine SH3 la protéine SOS (Son Of Sevenless) qui favorise l'échange d'un GDP contre un GTP dans la boucle effectrice de Ras et stabilise Ras dans sa forme active ⁴¹⁻⁴⁴. Ras active va alors s'associer avec un domaine Raf-RBD de la protéine Raf-1. Le recrutement à la membrane de Raf-1 permet son activation. Raf1 activée, de son tour, active la cascade MEK1/MEK2, ERK qui conduit à l'activation de facteurs de transcription ⁴⁵. L'activation de Ras fait aussi intervenir la cascade de SAP kinase.

L'effet cellulaire de la voie Ras est l'expression anormalement élevée de gènes indispensables pour la prolifération cellulaire, tels que c-Fos (un facteur de transcription induisant la réplication de l'ADN), c-Myc (nécessaire pour la transcription de l'ARN ribosomal), ou c-Jun ⁴⁵. Elle stimule aussi, en coordonnant avec la voie PI3K, l'expression de cycline D1 et de Cdk6, deux éléments importants pour l'initiation de cycle cellulaire en G1 ^{46,47}. Cette voie active également la synthèse protéique en favorisant la traduction au niveau des ribosomes.

Finalement, cette voie participe dans la survie cellulaire par son rôle sur l'expression des protéines de la famille BCL2 (B Cell Lymphoma). Les protéines de la famille BCL2 peuvent être subdivisées en trois classes sur la base du nombre de domaines BH (pour Bcl2 homology). Les membres antiapoptotiques comme Bcl2 et Bcl_{XL} ont quatre domaines de BH (BH1 à BH4), les membres proapoptotiques tels que Bak et Bax possèdent trois domaines de BH (BH1 à BH3). Les protéines telles que Bad, Bid et Bim qui ne possèdent qu'un seul domaine BH3 (BH3-only protein) sont toutes proapoptotiques ⁴⁸. Les protéines de la famille BCL2 sont capables de former des homo-oligomères ou des hétérodimères entre elles. Certaines de ces protéines comme Bcl2, Bcl_{XL}, Mcl1, Bax, Bad ou Bim possèdent un signal de localisation à la membrane externe de la mitochondrie. Le maintien de l'homéostasie de la mitochondrie ou l'induction de la mort dépend du ratio des protéines pro et antiapoptotiques de la famille de Bcl2 ⁴⁸⁻⁵⁰. La voie Ras/ERK induit l'expression des

INTRODUCTION

protéines antiapoptotiques (Bcl2, Bcl-xL et Mcl1) par des mécanismes transcriptionnels et post-traductionnels. Elle affecte aussi l'activité des protéines proapoptotiques de la famille de BCL2 par des mécanismes post-transcriptionnels, en inhibant la localisation mitochondriale de Bad et Bax et en augmentant la dégradation de Bim ⁵¹.

2. *La voie PI3K/Akt/mTOR* : La PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) est un enzyme hétérodimérique à activité lipide kinase composé d'une sous-unité régulatrice (p85) et d'une sous-unité catalytique (p110). **BCR-ABL** forme des complexes avec la PI3-kinase, Cbl et les adaptateurs Crk et Crkl. Cbl est phosphorylée sur un résidu tyrosyl par **BCR-ABL** et peut alors se lier au domaine SH2 de Crkl. Celui-ci lie **BCR-ABL** par son domaine SH3. Le complexe **BCR-ABL** avec Cbl, Crk et Crkl recrute la PI3K via sa sous-unité régulatrice et l'active ⁵²⁻⁵⁴. La PI3K activée phosphoryle le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdIns[4,5]P₂) et produit le phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns[3,4,5]P₃). Cette production de P3I entraîne l'activation de PDK1 (3'-phosphoinositide dependent kinase 1), qui à son tour phosphoryle Akt, une serine/thréonine kinase. Akt est partiellement activé par phosphorylation sur le résidu thréonine 308 dans le domaine catalytique par PDK1 mais son activation complète requiert une deuxième phosphorylation (sérine 473) dans le motif hydrophobe, par une PDK2 récemment identifiée comme mTORC2, un complexe mTOR insensible à la rapamycine (Figure 9) ^{55,56}. Il fait partie de deux complexes distingués selon leur sensibilité à la rapamycine. Il comprend: mTOR, Rictor, GβL (mLST8), mSin1 et Protor (protein observed with rictor). Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR ou mAVO3) est essentiel pour l'activité kinase de mTORC2 ^{57,58}. mSin1 semble faciliter la localisation membranaire de mTORC2 avec Akt grâce à son motif PH-like ^{59,60}. L'autre complexe appelé mTORC1 est sensible à la rapamycine et comprend quatre partenaires identifiés : mTOR, raptor, GβL et PRAS40. Raptor (regulatory associated protein of mTOR), qui interagit directement avec 4E-BP et S6K grâce à leur motif TOS (séquence d'acides aminés : FEMDI et FDIDL, respectivement), est nécessaire à la phosphorylation de ces deux protéines par mTOR ⁶¹⁻⁶³. Indépendamment de raptor, GβL interagit directement avec le domaine kinase de mTOR pour augmenter son

activité ⁶⁴. Par contre, PRAS40 (proline-rich Akt substrate 40 kDa) régule négativement l'activité de mTOR d'une manière dépendante de son état de phosphorylation ⁶⁵⁻⁶⁷.

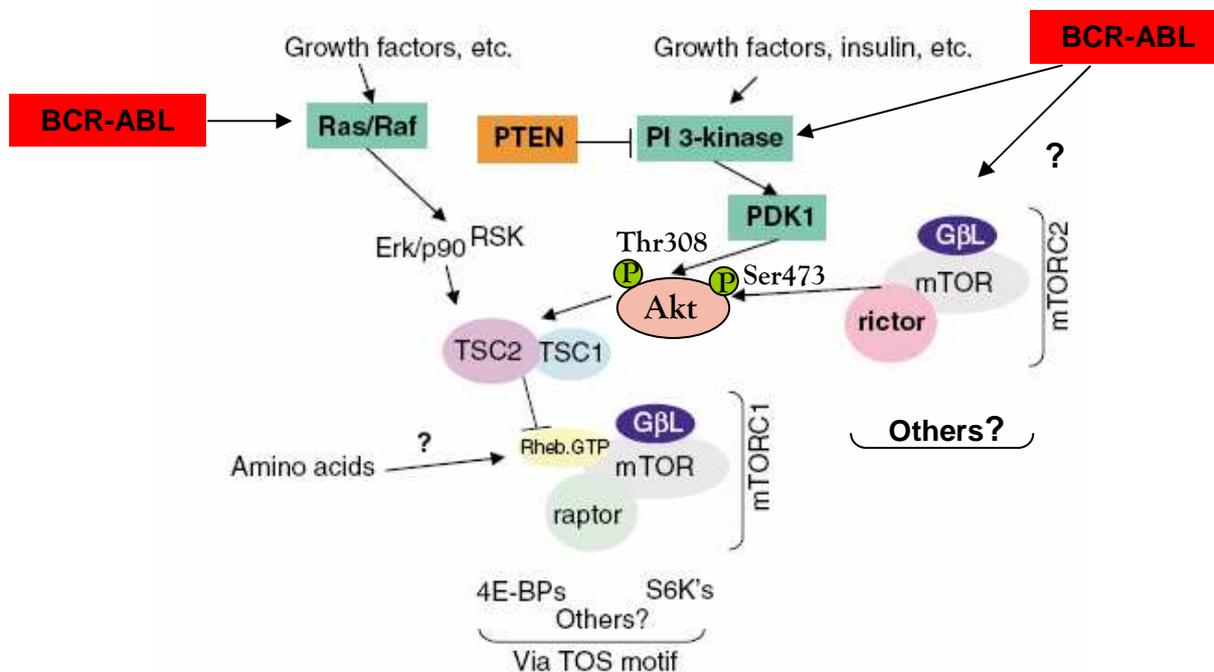


Figure 9 la voie de signalisation de mTOR par ses complexes 1 et 2. **BCR-ABL** pourrait activer la voie mTORC2 qui, de son tour, phosphoryle Akt sur la sérine 473. La phosphorylation d'Akt sur sa thréonine 308, induite par PI3K/PDK1, est nécessaire pour l'activation complète de l'Akt qui ensuite active la voie mTORC1 ⁶⁸.

Akt contribue à activer mTORC1 de manière directe en le phosphorylant sur le résidu sérine 2448. De plus, Akt peut activer le complexe mTORC1 d'une façon indirecte. Akt phosphoryle la protéine tuberine (TSC2) du complexe suppresseur de tumeur TSC1/TSC2 (tuberous sclerosis complex), ce qui induit la déstabilisation et l'inactivation du complexe. TSC2 ne peut alors plus exercer son activité de GAP (GTPase activating protein) envers la petite protéine G Rheb (Ras homolog enriched in brain) qui, sous forme liée au GTP, active mTORC1 par un mécanisme encore mal caractérisé ^{69,70}. Une fois activée, mTORC1 phosphoryle deux cibles majeures : les S6 kinases (S6K1 et 2) et les 4E-BP (eIF4E-binding proteins 1-3) ⁷¹. L'hyperphosphorylation des 4E-BP (famille de trois protéines, 4E-BP1-3) diminue leur interaction avec eIF4E (elongation initiator factor 4E) et stimule la traduction cap-dépendante. En fait, eIF4E peut se lier à la coiffe 7-méthyl-guanosine localisée en 5' de certains ARNm (cycline D3, c-myc ou VEGF) et former un complexe initiateur de leur traduction. Les 4E-BP sont aussi d'importants régulateurs de la croissance

INTRODUCTION

cellulaire car la surexpression d'un mutant constitutivement actif de 4E-BP1 diminue la progression en phase G1 et bloque la transformation induite par c-Myc ⁷². La protéine kinase S6K1 activée phosphoryle la protéine ribosomale S6. Il était initialement considéré que cette voie de signalisation conduisait à la traduction d'ARNm comportant une série de motifs pyrimidines, les 5'TOP (terminal oligopyrimidine tract). Ces ARNm codent des composants de l'appareil traductionnel comme des protéines ribosomales et des facteurs d'élongation. Des données récentes contestent ce modèle et les mécanismes par lesquels mTORC1 contrôle la traduction des 5'TOP ARN restent à démontrer ^{73,74}.

Dans les cellules LMC, il a été montré que l'activation de la voie PI3K/mTOR par **BCR-ABL** contribue à la production accrue des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et que l'inhibition de la PI3K ou mTOR conduit à une diminution significative de niveau de ROS. Le mécanisme passe par une augmentation du métabolisme du glucose et d'une hyperactivité de la chaîne mitochondriale de transport des électrons. Les niveaux élevés des ROS dans les cellules **BCR-ABL**⁺ peuvent contribuer aux dommages d'ADN spontanés et à l'instabilité génomique ^{75,76}.

Akt joue aussi un rôle important dans la survie induit par **BCR-ABL** car elle affecte un certain nombre de phosphorylations qui permettent à l'échappement à l'apoptose. Elle régule au moins trois voies de signalisation dans ce processus. La première est directe : Akt phosphoryle et inactive la protéine proapoptotique Bad sur sa sérine 136. La phosphorylation de Bad provoque sa liaison à la protéine 14-3-3, sa délocalisation à l'écart de la mitochondrie et sa dissociation de la protéine anti-apoptotique Bcl_{XL} ⁷⁷. La deuxième voie est la phosphorylation de facteur de transcription FoxO3a sur la sérine 253 et la thréonine 32. Lorsqu'il est phosphorylé, FoxO3a est cytosolique et ne permet pas la transcription de gènes critiques pour l'induction de l'apoptose telle que la protéine proapoptotique Bim ^{78,79}. Récemment, l'inhibition de FoxO3a par Akt est démontrée dépendante de l'activité de mTORC2. L'inhibition de mTORC2 supprime l'activité inhibitrice d'Akt vers FoxO3a ⁸⁰. La troisième voie de protection est la régulation d'expression de p53. Le suppresseur de tumeur p53 est un régulateur majeur de la mort cellulaire en particulier après dommage de l'ADN. Son expression et sa fonction sont fortement diminués par

l'action de la E3 ubiquitin ligase Mdm2 (Murine double minute 2). Akt phosphoryle Mdm2 sur les sérines 166 et 186 ce qui relocalise Mdm2 dans le noyau et augmente son activité ligase. Le complexe Mdm2/p53 est exporté dans le cytoplasme où p53 est dégradé par le système ubiquitine-protéasome. C'est ainsi que Akt empêche l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire dépendants de p53 ⁸¹.

Cette voie de signalisation est négativement contrôlée par l'effet de trois phosphatases différentes. La première est une lipide-phosphatase appelé PTEN (phosphatase and tensin homologue) qui déphosphoryle les P3 et les convertit en leur forme inactive P2. PTEN est également un gène suppresseur de tumeurs souvent muté dans nombre de cancers et de syndromes associés au cancer. PTEN empêche la PI3K/PDK1 de phosphoryler l'Akt sur le résidu thréonine 308 ⁸². La deuxième est la protéine phosphatase 2A (PP2A) qui inactive Akt par déphosphorylation de la thréonine 308 ⁸³. **BCR-ABL** inactive cette phosphatase en induisant l'expression de son inhibiteur, SET, dans les progéniteurs de LMC en phase blastique ⁸⁴. La réactivation moléculaire ou pharmacologique de PP2A a supprimé l'activité et l'expression de **BCR-ABL** ^{84,85}. Cependant l'inhibition de PP2A, par l'acide okadaïque, est quasiment sans effet sur la phosphorylation de la sérine 473 de Akt. La recherche d'une phosphatase insensible à l'acide okadaïque et possédant un domaine PH lui permettant de se colocaliser avec Akt a permis d'identifier la troisième phosphatase PHLPP (protein phosphatase, PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase). Cette protéine est la seule phosphatase du génome humain à posséder un domaine PH. Elle déphosphoryle la sérine 473 de Akt et n'a que peu d'effet sur la phosphorylation de sa thréonine 308 ⁸⁶.

En résumé, la voie PI3K/Akt/mTOR est impliquée dans le rôle transformant de la protéine **BCR-ABL** en régulant la croissance, la prolifération, la survie cellulaire et l'instabilité génétique.

3. *La voie JAK/STAT*: La famille des JAK-kinases, composée de tyrosine kinases intracellulaires, et les protéines STAT (signal transducers and activators of transcription) sont impliquées directement dans la transduction du signal à partir des membres de la famille des récepteurs aux cytokines ⁸⁷.

INTRODUCTION

La famille JAK est composée de quatre protéines chez les mammifères, JAK1, JAK2, JAK3 et Tyk2. Les JAK sont constituées de sept domaines d'homologie appelés domaines JH (JAK homology) numérotés à partir de l'extrémité carboxy-terminale des protéines JAK. Des études structurales ont montré que les domaines JH3 et JH4 possèdent des similitudes avec les domaines de type SH2. Les JAK ont été impliquées dans plusieurs pathologies malignes. Elles sont souvent constitutivement activées dans les tumeurs du système hématopoïétique ⁸⁸. Dans la LMC, **BCR-ABL** interagit avec JAK2 puis il l'active par une phosphorylation sur le résidu tyrosine 1007 ⁸⁹. L'effet de JAK2 activé est montré être indépendant de STAT5 sur l'induction de l'expression de c-Myc dans les cellules **BCR-ABL** positives ⁹⁰. Par contre Elle stimule, en coordonnant avec la voie MEK, l'activité de STAT3 ⁹¹.

La famille des STAT comprend chez les mammifères sept membres issus de gènes différents : STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b et STAT6. Toutes les STAT possèdent une structure commune organisée en six domaines : N-terminal, coiled-coil, DBD (DNA binding domain), linker, SH2 et TAD (transcriptional activation domain) en C-terminal. Le domaine SH2, hautement conservé chez les STAT, est impliqué à plusieurs niveaux de la signalisation: recrutement sur les récepteurs phosphorylés, association avec les JAK activées et homo ou hétérodimérisation. Quand elles ne sont pas activées, la majorité des STAT existe sous forme non phosphorylée sur tyrosine dans le cytoplasme de la cellule. Leur activation par phosphorylation sur un résidu tyrosine favorise leur translocation nucléaire sous forme d'homo ou d'hétérodimères, qui se lient, directement ou indirectement, à des séquences spécifiques présentes dans le promoteur de leurs gènes cibles activant ainsi la transcription ^{88,92}. Dans les lignées **BCR-ABL** positives, les protéines STAT sont tyrosine phosphorylées de manière constitutive et leur activité de liaison à l'ADN est maximale. L'activation de STAT5 par **BCR-ABL** confère la résistance à l'apoptose en activant la transcription des gènes codant les protéines anti-apoptotiques BCL_{XL} et Mcl1. STAT5 induit aussi avec STAT3 l'expression de c-Myc et les gènes régulant le cycle cellulaire comme cycline D1/D2 ^{44,93}. Récemment, des études ont montré que l'activation de voie JAK2/STAT5 dans les lignées et les progénitures **BCR-ABL** positives pourrait être due à la production

autocrines et paracrines de GM-CSF ou IL3 et constituerait un des mécanismes de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase ^{94,95}.

Des voies de régulation négatives interviennent sur la transduction du signal par la voie JAK/STAT au niveau de plusieurs points de contrôle. À ce jour, trois familles de protéines ont été identifiées comme exerçant cette fonction : les phosphotyrosines phosphatases (SHP, CD45, PTP1B/TC-PTP), les PIAS et les SOCS. Les protéines SOCS (suppressor of cytokine signaling) sont les principaux régulateurs de la voie JAK/STAT. Elles comprennent 8 membres : SOCS1 à 7 et CIS issus de différents gènes. Ces protéines contiennent un domaine SH2 central et un domaine C-terminal conservé, de 40 acides aminés, appelé SOCS-box. Celui-ci est impliqué dans la dégradation de leur cible par la voie dépendante du protéasome ⁹⁶. Parmi l'ensemble des SOCS, la fonction de SOCS1 a été la plus étudiée dans la LMC. SOCS1 s'associe à JAK2 via son domaine SH2. Cependant, pour l'inhibition de l'activité de JAK2, les deux domaines SH2 et KIR (kinase inhibitory region) sont requis. SOCS1 possède un domaine SH2 similaire à celui de STAT3 et peut ainsi entrer aussi en compétition avec STAT3 pour les mêmes tyrosines phosphorylées ⁹⁷. Des études, utilisant des lignées LMC ou des cellules CD34⁺ des patients, ont montré que l'expression de SOCS1 est inhibée suite à l'hyperméthylation de son gène et que la diminution de SOCS1 pourrait corrélée avec la phase de maladie ou avec la résistance ou la persistance des cellules leucémiques ⁹⁸.

4. *La voie Rac* : Les GTPases Rac appartiennent à la famille des petites protéines G Rho, branche de la vaste superfamille Ras. Elle comprend trois isoformes Rac1, 2 et 3. **BCR-ABL** forme des complexes avec Rac1, Rac2 et d'autres membres de la famille Rho GTPases comme RhoA et Cdc42, et il les active directement par le domaine DBL-like de *BCR*. D'autre part, **BCR-ABL** peut activer ces Rho GTPases via le recrutement de Vav1, une Rho-GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) protéine. **BCR-ABL** peut aussi activer Rac1 par l'activation de Fak Kinase (Focal adhesion kinase). Cette kinase, une fois activée et renforcée par la paxilline, transmet un signal activateur pour Rac1 ⁹⁹.

La voie Rac est impliquée dans les activités transformantes de **BCR-ABL** dont la survie cellulaire et la régulation de cytosquelette ⁹⁹. Il est probable que les

modifications de l'adhésivité et de la migration des cellules **BCR-ABL** positives soient liées à l'activation des voies de signalisation faisant intervenir les molécules de la plaque d'adhésion (Fak et paxilline) et Rac1 ^{100,101}. Il est possible que l'activation inappropriée de ces molécules puisse être responsable du déficit de fonctionnement des intégrines dans les cellules leucémiques, en particulier celui de l'intégrine beta-1 et que ce déficit puisse être corrigé par l'interféron-alpha ¹⁰²⁻¹⁰⁴. Des travaux plus récents semblent indiquer que **BCR-ABL** pourrait modifier la migration des cellules leucémiques en interagissant avec la molécule CXCR4, récepteur de SDF-1. Les mécanismes de cette interaction restent à élucider ^{105,106}. Enfin, Il a été récemment rapporté une diminution du potentiel transformant de **BCR-ABL** dans les cellules exprimant une forme dominante négative de Rac ¹⁰⁷.

5. *La voie NFκB* : NFκB est un facteur de transcription hétérodimérique qui est séquestré dans le cytoplasme par des protéines de la famille IκB (I-kappa-B). La phosphorylation d'IκB permet son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. La dégradation d'IκB libère NFκB qui est alors transloqué dans le noyau et qui active des gènes cibles: ce sont des gènes impliqués dans l'inflammation, dans les réponses au stress et dans l'inhibition de l'apoptose. Les gènes induits par NFκB pour promouvoir la survie ne sont pas encore clairement identifiés. Ils incluent un membre de la famille BCL2 (Bcl-1/A1), des inhibiteurs de caspases (c-IAP-1,2 et XIAP) et des facteurs TRAF1 et TRAF2 (TNFR-associated factor 1) ¹⁰⁸. **BCR-ABL** active la voie NFκB via la voie PI3K/Akt. Akt interagit directement avec IKKa (I-kappa-B Kinase alpha) et phosphoryle cette kinase sur thréonine facilitant ainsi la dégradation des IκB. L'activité de NFκB a été montrée être nécessaire pour la transformation des cellules primaires par **BCR-ABL** ¹⁰⁹. En plus, le blocage de la voie NFκB par les inhibiteurs de IKK a été démontré efficace pour surmonter la résistance à la thérapie ciblée dans la LMC ¹¹⁰.

6. *Les voies de signalisation impliquées dans la stabilité génomique et génétique* : **BCR-ABL** est la seule anomalie cytogénétique détectable au cours de la phase chronique de la maladie. La progression vers les phases accélérée puis blastique s'accompagne d'anomalies génomiques additionnelles marqueurs d'une instabilité génomique croissante ^{18,20}. Les trois anomalies les plus souvent rencontrées sont :

INTRODUCTION

l'isochromosome 17, la trisomie 8, la duplication du chromosome Ph⁺ et la trisomie 19^{111,112}. La responsabilité de **BCR-ABL** dans la genèse de cette instabilité génomique est fortement suspectée.

Dans les cellules normales, lorsque les lésions sont détectées, l'arrêt du cycle cellulaire est induit et les systèmes de réparation sont activés. Cinq principaux systèmes de réparation ont été mis en évidence chez les eucaryotes¹¹³. La réparation par excision de base, ou BER (Base Excision Repair) permet de réparer une base modifiée (oxydée, alkylée ou déaminée) ou délétère (spontanément clivée). La réparation par excision de nucléotide, le NER (Nucleotide Excision Repair) permet de remplacer des nucléotides modifiés par des rayons UV (dimère de pyrimidine). La réparation par le système de réparation de mésappariement, le MMR (Mismatch Repair) permet de rétablir les erreurs causées par l'infidélité des polymérases répliquatives. Les cassures double brin de l'ADN (DSBs) sont prises en charge par deux systèmes de réparation, la recombinaison homologue, ou HR (Homologous Recombinaison) qui permet le retour à la séquence initiale par copie du brin homologue du chromosome homologue, et le système de réparation par jonction d'extrémités non homologues, le NHEJ (Non Homologous End Joining) qui permet le collage direct des extrémités de la lésion, entraînant une perte d'information génétique.

Des études ont démontré que **BCR-ABL** perturbe ces différents systèmes de réparation favorisant la survie et l'émergence de cellules leucémiques portant des mutations ou des microremaniements. On peut distinguer plusieurs mécanismes par lesquels **BCR-ABL** affecte les voies de réparation de l'ADN :

- La voie ATM/ATR : Les kinases ATM/ATR (ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated et ATR : ATM and Rad3-related) sont les principaux acteurs impliqués dans les premières étapes de la mobilisation des points de surveillance enclenchés lors d'un dommage de l'ADN. L'induction de cassures double brin de l'ADN conduit à la dissociation des dimères d'ATR entraînant son autophosphorylation et aboutissant ainsi à l'activation d'ATR. Ainsi, la protéine ATR activée, il permet le recrutement de protéines de réparation au sein des foyers

de réparation ¹¹⁴. Dierov *et al.* ont démontré que **BCR-ABL** perturbe la transduction du signal dépendant de l'ATR. En effet, par sa liaison avec ATR, **BCR-ABL** augmente les cassures double brin de l'ADN induites par un stress génotoxique. Ainsi, **BCR-ABL** conduit à une synthèse d'ADN radio- résistante à cause du défaut de point de surveillance intra-S phase ¹¹⁵.

- La voie DNA-PK : Comme ATM et ATR, la DNA-PK (DNA dependent Protein Kinase), enzyme clé de la réparation par NHEJ, est considérée comme un senseur primaire des dommages de l'ADN. DNA-PK est un complexe enzymatique comprenant une unité catalytique (DNA-PKcs) et l'hétérodimère Ku70/Ku80 qui se lie à l'ADN au niveau des cassures double brin induites par irradiation ou agents chimiques. Ce complexe est le système de réparation majeur dans les cellules de mammifères et est également impliqué dans la recombinaison V(d)J ¹¹⁶. Dans les cellules hématopoïétiques humaines ou murines exprimant **BCR-ABL**, on observe une diminution de l'expression de DNA-PKcs dépendante de l'activité tyrosine kinase de **BCR-ABL**. Cette réduction de l'expression est un phénomène dépendant de l'activation de protéasome, à la fois dans les conditions expérimentales et dans les cellules CD34⁺ de LMC. De manière attendue, cette diminution de l'expression de DNA-PKcs, entraîne au niveau des cellules leucémiques, une sensibilité accrue aux radiations ionisantes ¹¹⁷.
- La protéine BRCA1 (Breast Cancer Associated Protein) : Cette protéine est un suppresseur de tumeur impliqué dans la mise en place des points de surveillance dans les deux phase différentes de cycle cellulaire G2/M et S. Il a été démontré une diminution de l'expression de BRCA1 dépendante de l'activité tyrosine kinase de **BCR-ABL**. Cette réduction de l'expression est un phénomène post-transcriptionnel et peut-être dépendant de l'activation de protéasome ¹¹⁸.
- **BCR-ABL** est capable d'interagir avec la protéine XPB, un des composants du complexe multiprotéiques impliqué dans le NER qui

joue un rôle dans la réparation de l'ADN, l'initiation générale de la transcription et la régulation du cycle cellulaire. Dans des lignées cellulaires myéloïdes humaines et murines une augmentation de l'activité du NER par **BCR-ABL** et une résistance aux ultraviolets C sont observées. L'inhibiteur de tyrosine kinase, l'Imatinib, reverse ces effets montrant que l'activité kinase de **BCR-ABL** est à l'origine de cette dérégulation ^{119,120}.

- La voie de la télomérase : La télomérase, enzyme responsable du maintien de la taille du télomère, est constituée de deux composants essentiels : l'ARN matrice ou hTR (human Telomerase RNA) qui sert de matrice pour la synthèse de l'ADN télomérique matrice et l'enzyme reverse transcriptase hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase) ¹²¹. Les télomères des cellules LMC sont sensiblement plus courts que ceux des lymphocytes-T (Ph) du même donneur. Des études récentes réalisées sur les prélèvements de patients ont montré que dans la phase chronique, la majorité de patients atteints de LMC présentent une longueur du télomère réduite. Ce raccourcissement de la taille du télomère est probablement lié à une faible activité télomérasique et à la division cellulaire. L'expression de hTERT dans les cellules de LMC chez les patients en phase chronique est similaire à celle des cellules normales. Cependant, son épissage alternatif est modifié et l'expression de son partenaire hTR diminue ¹²². Ceci explique la faible activité de la télomérase dans cette phase. Durant les phases d'accélération et blastique les télomères arrivent à une taille critique. Les cellules LMC présentent des changements au niveau des microsatellites, signe d'une forte instabilité génomique dans ces deux phases ¹²³⁻¹²⁵.

7. *Autres voies de signalisations dérégulées par **BCR-ABL*** : Des travaux récents ont montré que **BCR-ABL** interagit avec l'ubiquitinylation de certaines protéines cibles en stimulant leur dégradation par le protéasome ¹²⁶. Cette implication de **BCR-ABL** a été démontrée initialement par l'étude des protéines adaptatrices ABI-1 et

ABI-2 (ABI : abl-interactor proteins) qui sont capables de se lier aux régions riches en proline d'ABL et de bloquer également l'activation de RAS. L'équipe de Pendergast a montré que les oncogènes **BCR-ABL** p210 et p190 pouvaient entraîner une réduction du niveau des protéines ABI-1 et ABI-2 dans les cellules leucémiques en favorisant leur dégradation par le système ubiquitine-protéasome ¹²⁷. SHIP (SH2 containing inositol-5 phosphatase) semble être également une cible de régulation négative de **BCR-ABL**. Les phosphatases SHIP1 and SHIP2 sont des molécules indispensables au fonctionnement normal du système hématopoïétique. Dans les cellules exprimant **BCR-ABL**, on observe une réduction de la protéine p145 SHIP spécifiquement induite par **BCR-ABL** ¹²⁸. On sait par ailleurs que l'activité tyrosine kinase de **BCR-ABL** dans les cellules leucémiques pourrait entraîner l'activation de certaines phosphatases, comme PTP1B, qui pourraient agir comme des régulateurs physiologiques lors de la phase chronique, avec un phénomène d'échappement lors de la phase blastique. La surexpression de PTP1B inhibe ainsi le potentiel transformant de **BCR-ABL** dans les systèmes expérimentaux, mais son rôle dans la progression de la LMC dans les cellules primaires reste à déterminer ¹²⁹⁻¹³¹. Les études récentes permettent de démontrer que **BCR-ABL** est capable d'inhiber l'expression de p27-kip, inhibiteur de CDK2, de manière à favoriser une accélération de l'entrée des cellules Ph⁺ en phase S. L'inhibition de l'expression de p27 dans les cellules exprimant **BCR-ABL** semble par ailleurs être un événement dépendant de l'activité du système ubiquitine-protéasome ¹³².

1.2.2.3 Traitements

Le traitement de la LMC a changé de manière progressive au cours des deux dernières décennies, les approches thérapeutiques non spécifiques laissant la place à une thérapie ciblée née par la conception de l'Imatinib.

1. *Chimiothérapie palliative* : Le traitement le moins nocif est le traitement à l'hydroxyurée (Hydréa), qui a remplacé à partir des années 70 le busulfan. Ce traitement permet d'obtenir une rémission hématologique dans environ 70 % des cas, mais les rémissions cytogénétiques sont très rares. L'intérêt de l'hydroxyurée tient à

son effet plus rapide et moins durable que celui du busulfan, ce qui rend le risque d'aplasie prolongée particulièrement faible ¹³³.

2. *Interféron α* : Il est le traitement standard depuis 1980 avec une rémission hématologique chez 80 % des cas, mais les rémissions cytogénétiques sont obtenues chez 10 à 20 % de patients. Malgré sa toxicité, l'interféron α reste le traitement de référence des patients atteints de LMC qui ne sont pas candidats à une greffe de moelle allogénique ¹³⁴.

3. *Greffes* : Les allogreffes de moelle osseuse sont le traitement de choix qui seul peut offrir une chance raisonnable de guérison du malade. L'indication est malheureusement limitée : âge inférieur à 45 ans et donneur HLA compatible dans la fratrie.

Une nouvelle technique de greffe de moelle osseuse, moins toxique, mieux tolérée et pouvant être proposée à des patients plus âgés est en cours d'évaluation. Il s'agit des « mini-transplant ». Le « mini-transplant » est un terme dérivé du nom anglais : mini stem cells transplants (mini greffe de cellules souches). Il s'agit d'une nouvelle technique de greffe de moelle osseuse. Des cellules souches de la moelle osseuse d'un donneur, compatible avec le patient, vont être greffées (greffe allogénique). Classiquement cette greffe est précédée d'une chimiothérapie à très fortes doses qui détruit presque les cellules souches du patient. Mais dans le cas de cette « mini-greffe », le patient va recevoir une chimiothérapie à doses normales qui sera suffisante, associée à un traitement immunosuppresseur, pour permettre au patient d'accepter le greffon du donneur. Les cellules du donneur sont alors transfusées et elles vont remplacer les cellules souches du patient. Le but de cette greffe n'est pas de pouvoir faire une chimiothérapie à très fortes doses pour détruire le plus de cellules cancéreuses possibles, mais de se servir des globules blancs du donneur pour qu'ils reconnaissent les cellules de la LMC du receveur comme des cellules étrangères et qu'ils les détruisent. On appelle ce mécanisme une réaction greffon contre la tumeur. De plus, les cellules réactives contre la tumeur persistent chez le receveur et permettent d'empêcher la survenue de rechutes. Elle peut être considérée comme une forme d'immunothérapie. Comme les doses de chimiothérapie sont moins importantes, elle est moins toxique et mieux tolérée ¹³⁵⁻¹³⁷.

Il y a aussi l'autogreffe de moelle osseuse qui est une possibilité de greffe en cours d'étude. Elle est moins toxique que l'allogreffe et peut être proposée à un nombre plus important de patients car elle n'est pas limitée par l'existence d'un donneur compatible, mais elle expose à un risque plus important de rechute par le risque de contamination de greffon par les cellules malignes et par l'absence de l'effet immunologique de contrôle à long terme qu'apporte la réaction du greffon étranger contre la tumeur. Le but de ce traitement est d'éradiquer totalement les cellules souches malignes en administrant une chimiothérapie à très fortes doses associée à une irradiation corporelle totale. Ce traitement puissant a pour effet secondaire de détruire aussi les cellules saines de la moelle osseuse. Pour pallier à cet effet toxique la moelle osseuse détruite va être remplacée par les cellules souches saines du patient qui auront été prélevées auparavant et conservées. Le fait de diminuer la toxicité en supprimant les effets de la réaction du greffon contre l'hôte supprime aussi l'effet immunologique de réaction de greffon contre la tumeur, part importante de la guérison. Mais cet effet peut être compensé par des traitements d'entretien par interféron et/ou Imatinib en post-greffe ¹³⁸.

1.3 Imatinib

1.3.1 Naissance

En 1990, Lugo *et al.* mettent en évidence le rôle essentiel de l'activité tyrosine kinase (TK) dans le pouvoir transformant de la protéine **BCR-ABL** ¹³⁹. Les premiers inhibiteurs d'origine naturelle (herbimycine A, génistéine) ou synthétiques (tyrphostines) testés *in vitro* ont montré une efficacité et une sélectivité variables sur les lignées cellulaires **BCR-ABL** ^{140,141}. Lors de sa fabrication, l'Imatinib (appelé aussi CGP57148B ou STI571) n'était pas une molécule inhibitrice destinée à venir interagir avec la protéine **BCR-ABL**. Initialement le laboratoire Novartis avait établi une sélection aléatoire sur des inhibiteurs de la Protéine Kinase C alpha (PKC-alpha). Il identifieront la classe des phenylamino-pyridine comme étant de bons inhibiteurs compétitifs de l'ATP se fixant sur les PKCs. Par la suite, une équipe de chercheurs a

INTRODUCTION

modifié cette classe de composés montrant un haut niveau de spécificité, et a identifié un inhibiteur de l'activité TK de l'oncogène v-Abl et du récepteur PDGF (Platelet-derived growth factor receptor). Cet inhibiteur a ensuite été optimisé de sorte à être plus spécifique de la tyrosine kinase **BCR-ABL**, ainsi l'Imatinib est né (Figure 10) ¹⁴²⁻¹⁴⁵.

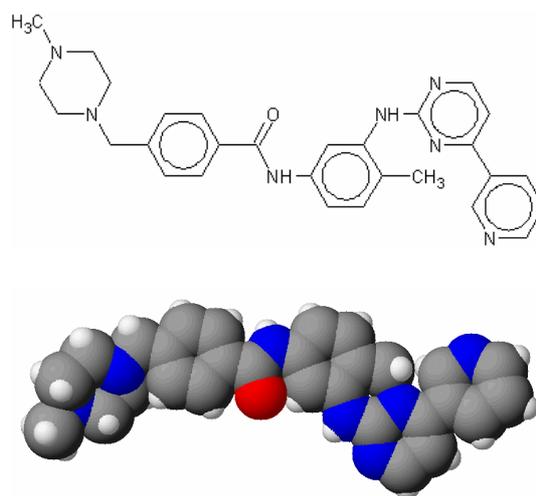


Figure 10 La structure chimique de l'Imatinib.

1.3.2 Mode d'action

L'Imatinib agit par inhibition compétitive de l'ATP au niveau du site catalytique de la protéine kinase. L'analyse de la structure cristallographique du domaine kinase d'Abl complexée avec l'Imatinib (Figure 11), montre qu'il existe des liens avec la poche de liaison à l'ATP et que l'Imatinib force la boucle d'activation dans une conformation non phosphorylée inactive. Il existe ainsi une interaction entre l'Imatinib et **BCR-ABL** localisée au niveau du site catalytique. Cette interaction implique notamment le résidu Tyrosine 272 (Y272) qui est localisé sur le P-loop, et entre normalement en contact avec le phosphate de l'ATP. Dans la structure d'Abl avec l'Imatinib, Y272 contribue à une complémentarité entre la protéine Abl et l'Imatinib via les interactions Van Der Waals avec les cycles aromatiques de l'Imatinib. En retour, le positionnement d'Y272 requière les liaisons hydrogènes avec Asparagine 341 (N341), guidant ainsi le sous-repliement de P-loop. La conséquence de ce repliement est de rendre Abl dans sa conformation inactive, alors incapable de

fixer le substrat. En somme, l'Imatinib agit en stabilisant la forme inactive de la tyrosine kinase **BCR-ABL**. Cela inhibe l'autophosphorylation de l'enzyme, qui interfère avec son activation et bloque le signal de transduction ^{146,147}. Bien que visant la poche de liaison des nucleotides d'Abl, l'Imatinib est très spécifique et inhibe seulement deux autres tyrosines kinases : le PDGFR et c-Kit.

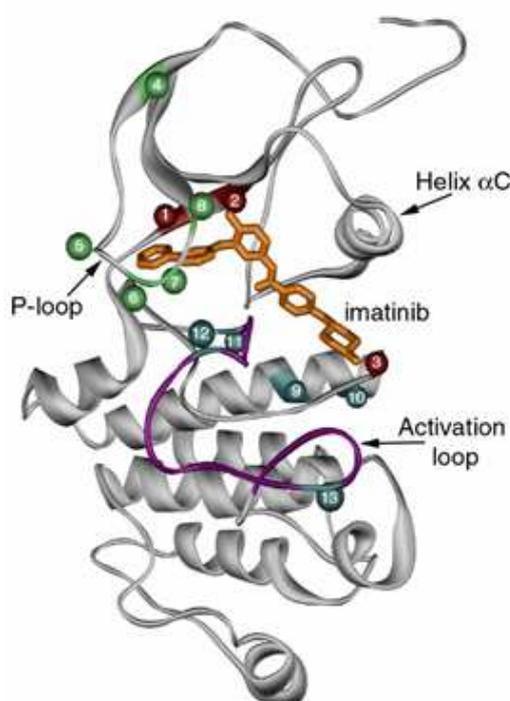


Figure 11 Structure tridimensionnelle de la kinase d'Abl dans sa configuration active associée à l'Imatinib. Les résidus 1,2 et 3 sont les acides aminés impliqués dans la fixation de l'Imatinib. Les résidus 4 jusque 13 participent au maintien de la conformation nécessaire à la liaison Kinase-Imatinib ¹⁴⁸.

1.3.3 Enfance (Gleevec)

Dans un premier temps, l'Imatinib a fait l'objet d'études *in vitro* et *in vivo* sur des modèles murins où il a sélectivement inhibé la prolifération des cellules exprimant **BCR-ABL** et il a induit leur apoptose avec une pharmacocinétique optimale *in vivo* ^{144,149,150}. Les premiers essais cliniques de phase I-II ont débuté en 1998. Deux essais ont été menés en parallèle. Le premier concernait des patients présentant une LMC en phase chronique, résistants à l'interféron α (non répondeurs

ou échappant secondairement), traités par Imatinib avec escalade de dose : 83 patients ont été inclus, 54 d'entre eux ont reçu une dose quotidienne supérieure ou égale à 300 mg/jour ; 98 % de ces patients ont présenté une réponse hématologique complète dès le premier mois de traitement et durable pour 92 % d'entre eux (suivi moyen de 265 jours), 31 % une réponse cytogénétique majeure. La plupart des effets secondaires recensés (troubles digestifs, myalgies, anémie, thrombopénie, leucopénie) ont été modérés, dose-dépendants et réversibles spontanément ou après réduction temporaire de posologie ¹⁵¹. Le second essai a inclus 58 patients présentant soit une LMC en phase blastique (38 de phénotype myéloïde, 10 de phénotype lymphoïde), soit une leucémie aiguë lymphoblastique avec chromosome Ph⁺ (10 patients). Si le taux de réponse initiale (hématologique ou médullaire) est de près de 70 %, seuls 12 % d'entre eux, de phénotype myéloïde, restent en rémission (durée de traitement de 3 à 12 mois), l'échappement survenant le plus souvent au cours des trois premiers mois de traitement ¹⁵². Compte tenu de ces essais cliniques, la FDA (Food and Drug Administration) a approuvé en 2001 la mise sur le marché américain de l'Imatinib (Gleevec) pour traiter la LMC.

1.3.4 Jeunesse

L'activité remarquable de l'Imatinib dans la LMC a rapidement fait envisager son utilisation dans d'autres tumeurs présentant une protéine à activité tyrosine kinase anormalement exprimée. La découverte de son pouvoir inhibiteur de c-Kit (CD 117) a permis de l'approuver pour traiter les tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST pour gastro-intestinal stroma tumor) ¹⁵³. Ces tumeurs sont dues à une expression membranaire anormale de c-Kit aboutissant à la transformation tumorale.

Cependant, les tyrosines kinases cibles d'Imatinib peuvent être présentes dans les cellules tumorales dans deux situations différentes. Lorsque l'anomalie moléculaire intervient précocement ou de façon causale dans le processus d'oncogenèse (*BCR-ABL* pour les LMC par exemple), l'Imatinib semble actif pour le traitement de ces affections où la kinase activée est au centre du processus de

transformation. En revanche, l'efficacité de l'Imatinib est plus hypothétique si les kinases sont exprimées plus tardivement dans le processus de transformation (c-kit dans les cancers du poumon à petites cellules par exemple). Par ailleurs, l'hyper éosinophilie idiopathique est un désordre hématologique non tumoral caractérisé par une prolifération de polynucléaires éosinophiles responsables de lésions tissulaires viscérales. La présence d'un transcrite de fusion FIP1L1- PDGFR α a été mise en évidence dans une série de 11 patients, aboutissant à l'activation de PDGFR α , tyrosine kinase sensible à l'Imatinib ¹⁵⁴. De plus, le caractère antiangiogénique de l'Imatinib via PDGFR est également en exploration dans les sarcomes de Kaposi ¹⁵⁵.

Des études biochimiques récentes ont pu identifier d'autres cibles interagissant avec l'Imatinib. Parmi ces nouvelles cibles une enzyme oxydoréductase, NQO2, a été trouvée inhibée par des concentrations thérapeutiques de l'Imatinib ^{156,157}. Le rôle physiologique exact de cette enzyme demeure incertain, mais elle pourrait être impliquée dans la détoxification des xénobiotiques ¹⁵⁸. La NQO2 est fortement exprimé dans les cellules myéloïdes et sa répression par siRNA dans les cellules **BCR-ABL**⁺ (K562) diminue la prolifération de cette lignée, suggérant que l'inhibition de la NQO2 pourrait contribuer à l'effet antiprolifératif de l'Imatinib dans les cellules de LMC ¹⁵⁹. De même, une étude récente a démontré que l'inhibition de la kinase c-Kit par l'Imatinib est impliquée dans son effet proapoptotiques sur les cellules **BCR-ABL**⁺ mettant en évidence l'importance des effets "Off-target" de l'Imatinib dans son activité antitumorale ¹⁶⁰.

Enfin, son rôle dans l'immunité antitumorale est une autre voie en cours d'exploration. En effet, l'Imatinib permet d'obtenir *in vivo* des effets anti-tumoraux NK (pour Natural Killer cells) dépendants sur des tumeurs ne répondant pas à ce même traitement *in vitro*. Le mécanisme impliqué est une inhibition de c-Kit sur les cellules dendritiques, qui va entraîner une activation des cellules NK. Chez les patients porteurs de GIST, l'induction de la sécrétion d'IFN γ NK dépendante en réponse à l'Imatinib représente un facteur de bon pronostic, suggérant ainsi que les cellules NK participent à la réponse thérapeutique de l'Imatinib chez l'homme ¹⁶¹. Chez la souris, l'association d'Imatinib et d'IL2 induit l'expansion d'une population cellulaire unique de cellules immunitaires au sein des tumeurs. Ces cellules, appelées

Interféron producing killer DCs (IKDCs), en raison de leurs caractéristiques phénotypiques proches des cellules dendritiques myéloïdes et de leur capacité à produire de l'IFN γ . Les IKDCs ont la capacité de détruire différentes cibles cellulaires, quelle que soient l'expression du CMH classe I ou de ligands de NKG2D. Elles permettent également, au contact de cellules tumorales, l'activation du CMH de classe II et la production d'IFN γ . Il a été montré que les IKDCs, dans des modèles murins, permettent de significativement ralentir la croissance tumorale ¹⁶².

Toutes ces données laissent penser que l'Imatinib par ses effets "Off-target" pourrait ouvrir des nouvelles voies de thérapie en combinaison avec d'autres médicaments.

1.4 Résistance à l'Imatinib

1.4.1 Définition de la résistance à l'Imatinib

On peut distinguer deux formes de résistance : une résistance primaire et une résistance secondaire. Une résistance primaire à l'Imatinib se définit selon les critères suivants : absence de rémission hématologique après trois mois de traitement ; absence de réponse cytogénétique (plus de 95 % de cellules médullaires Ph⁺) après six mois d'Imatinib ; absence de réponse cytogénétique majeure (moins de 35 % de cellules médullaires Ph⁺) à 12 mois ; absence de réponse cytogénétique complète (RCC) au traitement à 18 mois. Une résistance secondaire à l'Imatinib correspond à la perte des réponses acquises par la thérapie. Il peut donc s'agir de la perte de la réponse hématologique associée à une progression de la LMC ; de la perte de la RCC et/ou d'une augmentation du nombre de mitoses médullaires Ph⁺ ; de l'acquisition d'anomalies additionnelles au caryotype dans les clones cellulaires Ph⁺ ; et enfin d'une augmentation du taux de transcrits **BCR-ABL** de plus de 0,5 log confirmée au cours de deux examens successifs à moins d'un mois d'intervalle ^{163,164}.

1.4.2 Mécanismes de la résistance à l'Imatinib

L'étude des mécanismes de la résistance à l'Imatinib a été menée principalement sur des lignées cellulaires rendues résistantes par des expositions à des doses croissantes d'Imatinib. Cette approche *in vitro* a été complétée par des études réalisées sur des prélèvements de cellules sanguines ou médullaires de patients atteints de LMC résistants ou ayant échappé au traitement par l'Imatinib. Plusieurs mécanismes impliqués dans la résistance au traitement par l'Imatinib ont été identifiés (Figure 12) ¹⁶⁵.

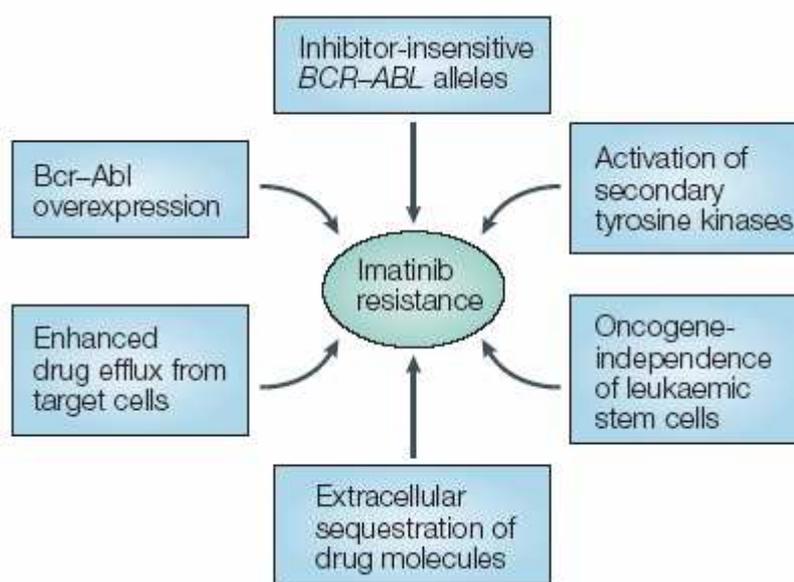


Figure 12 Les principaux mécanismes de résistance à l'Imatinib ¹⁶⁵.

1.4.2.1 Résistance dépendante de BCR-ABL

Des études initiales réalisées chez des patients en phase blastique de la LMC, et pour lesquels la réponse au traitement par l'Imatinib est transitoire, ont montré que l'activité tyrosine kinase de **BCR-ABL** est réactivée dans la plupart des cas. Malgré la présence d'altérations génétiques secondaires fréquemment acquises au cours de l'évolution de la LMC, ces observations démontrent que **BCR-ABL** reste une cible majeure dans les situations de résistance secondaire.

1. *Amplification de BCR-ABL* : Environ 10 % des résistances à l'Imatinib seraient associées à une augmentation de la production de la protéine de fusion,

typiquement par amplification du gène **BCR-ABL** ou par l'acquisition d'un second chromosome Philadelphie ^{166,167}.

2. *Mutations dans le domaine kinase de BCR-ABL* : Les mutations ponctuelles dans le domaine kinase de **BCR-ABL** constituent le mécanisme de résistance secondaire à l'Imatinib le plus fréquent (50 à 90 % des cas de résistance, selon les études) ^{148,166-168}. Pas moins de 40 mutations différentes ont été décrites. Les mutations sont retrouvées dans différentes régions de la tyrosine kinase (TK), mais il est possible de distinguer quatre régions fonctionnelles principales (Figures 13) :

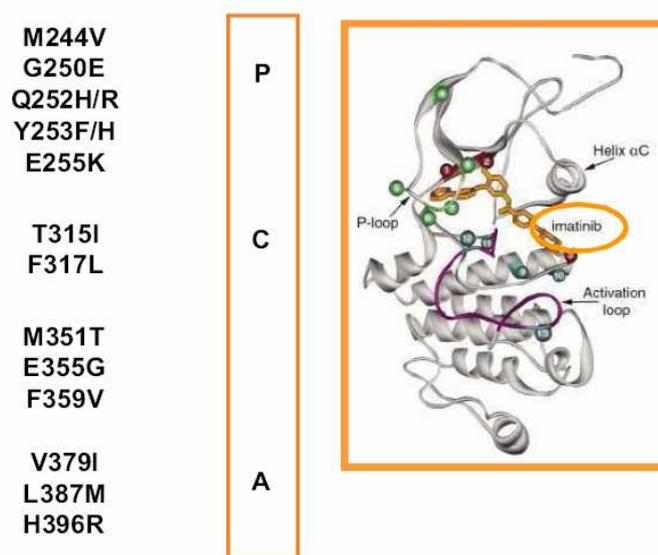


Figure 13 les principales mutations retrouvées dans les différentes boucles (P, C et A) de **BCR-ABL**.

- La région impliquée dans le site de fixation de l'ATP (boucle P). Les mutations dans cette région (acides aminés 244 à 255) sont les plus fréquemment retrouvées. Par comparaison avec la protéine native, les TK mutées dans cette région sont dix fois moins sensibles aux tests d'inhibition de la prolifération *in vitro* en présence d'Imatinib. Mise à part la mutation affectant la tyrosine 253, les mutations dans cette région déstabilisent la conformation inactive de c-ABL vers une conformation active impropre à la fixation de l'Imatinib ^{169,170}.
- La thréonine 315 (mutation T315I). Un second groupe de mutations concerne principalement la thréonine en position 315 qui forme un pont hydrogène avec l'Imatinib dans le site actif de c-ABL. On peut également considérer dans

ce groupe, mais dans une moindre mesure, la phénylalanine en position 317 qui interagit avec l'Imatinib par des liaisons hydrophobes. Alors que la mutation F317L présente *in vitro* une résistance modérée à l'Imatinib, la mutation T315I confère à la TK une grande résistance à l'Imatinib. Cette mutation est la plus fréquente chez les patients ayant échappé au traitement par Imatinib. Elle conduit à la perte de la liaison hydrogène avec l'Imatinib. De plus, la présence d'une isoleucine en position 315 représenterait un obstacle allostérique à la fixation de l'Imatinib dans sa cible ^{166,171}.

- La boucle C (mutation M351T). Bien que **BCR-ABL** soit activée de manière constitutive, le mécanisme d'autoinhibition de l'activité de la TK native est en partie maintenu malgré la fusion de BCR avec c-ABL. Or la méthionine 351, par son interaction avec la région SH2 de c-ABL, stabilise la TK sous une conformation d'auto-inhibition. Ainsi, la substitution de la méthionine 351 en thréonine déstabilise l'interaction avec le domaine SH2, abolit l'auto-inhibition partielle et déplace ainsi l'équilibre de conformation de la TK vers une forme active ¹⁷¹.
- La boucle A. Comprenant les acides aminés 379 à 402, la boucle A est une structure flexible qui régule l'activité de la TK. Sa conformation dépend de l'état de phosphorylation de la tyrosine 393. Lorsque celle-ci est phosphorylée, la conformation « ouverte » de la boucle A permet une grande accessibilité du site catalytique aux molécules d'ATP. Les mutations dans cette région affectent le changement de conformation de la boucle A en stabilisant la conformation active, impropre à la liaison de l'Imatinib. En général, les mutations dans la boucle A sont associées à une faible résistance à l'Imatinib *in vitro*, suggérant un bénéfice probable d'une augmentation de dose de l'Imatinib chez les patients mutés dans cette région.

Des mutations en dehors de ces régions ont également été retrouvées, dont certaines ne présentent pas d'effet sur la résistance *in vitro*, comme par exemple les mutations F311L ou F359V ¹⁷². Ces mutations ne sont probablement pas à l'origine de la résistance à l'Imatinib *in vivo*, ou alors seulement si elles sont associées à d'autres mécanismes moléculaires. Peu d'informations sont disponibles concernant la

présence de mutations en dehors du domaine TK puisque leur recherche est effectuée essentiellement dans le domaine TK de **BCR-ABL**. Une étude mentionne cependant l'absence de mutation dans les régions SH2 et SH3 chez 43 patients résistants à l'Imatinib ¹⁷³. *In vitro*, des mutations en dehors du site catalytique associées à une faible résistance à l'Imatinib ont été décrites, mais leurs conséquences cliniques restent inconnues ¹⁷⁴. Par ailleurs, il est possible que la présence de certaines mutations puisse conférer un avantage de prolifération au clone muté, comme cela a été démontré pour la mutation Y253F ¹⁷⁰. De plus, il est actuellement admis que les mutations dans le domaine TK de **BCR-ABL** peuvent être présentes dès le diagnostic de la LMC : le traitement par Imatinib peut sélectionner les clones résistants mutés en éliminant les cellules sensibles, et ainsi aggraver le pronostic de la maladie ^{175,176}.

Plusieurs observations semblent montrer que les mutations ne sont pas forcément le siège principal de la résistance ¹⁷⁷. La présence des mutations ne confère pas systématiquement un avantage de croissance aux cellules résistantes exposées à une pression de sélection par l'Imatinib. De même, Shebernou *et al.* ont démontré la présence d'une mutation **BCR-ABL** par une technique sensible chez 19 % de patients en réponse cytogénétique complète (RCC) : la totalité de ces mutations n'a donc pas été à l'origine d'une progression ¹⁷⁸. Cette observation démontre qu'à faible taux, la signification clinique de la présence de cellules mutées n'est certainement pas la même qu'à un taux élevé. Si la présence de mutations ne suffit pas à expliquer complètement la résistance à l'Imatinib, d'autres mécanismes, indépendants de **BCR-ABL**, doivent intervenir seuls ou en synergie. Ces mécanismes de résistance sont probablement prépondérants chez les patients réfractaires à l'Imatinib puisque deux tiers d'entre eux ne présentent pas de mutation.

1.4.2.2 Résistance indépendante de BCR-ABL

1. *La pompe d'efflux Pgp* : Par analogie avec d'autres modèles cancéreux, une augmentation de l'expression du gène MDR1 (déterminant la synthèse de la pompe d'efflux de la Pgp - glycoprotéine P) a été initialement décrit au sein d'une lignée cellulaire LAMA84R résistante à l'Imatinib ¹⁷⁹. Bien qu'ayant été confirmé dans

d'autres études, ce mécanisme de résistance ne semble pas être universel ¹⁸⁰. Cependant, la résistance liée à MDR1 est difficile à évaluer *in vivo* en raison de l'expression physiologique importante de ce gène dans les cellules sanguines ¹⁸¹.

2. *La séquestration extracellulaire de l'Imatinib* : L'étude *in vivo* de modèles murins a suggéré un mécanisme possible de résistance par modification de la biodisponibilité de l'Imatinib. L'acide glycoprotéine (AGP), protéine plasmatique, lie l'Imatinib, diminuant ainsi sa distribution tissulaire ^{182,183}. L'adjonction d'un inhibiteur compétitif tel que l'érythromycine a restauré l'effet anti-tumoral de l'Imatinib dans ce modèle murin ¹⁸². *In vivo*, la corrélation entre résistance à l'Imatinib et taux d'AGP n'a pas toujours été confirmée. Il est seulement possible de montrer une corrélation entre un taux élevé d'AGP et la résistance à l'Imatinib chez des patients en phase blastique de la maladie ¹⁸⁴.

3. *La concentration plasmatique de l'Imatinib* : En plus de l'accessibilité de l'Imatinib à sa cible, il est à noter que la résistance peut également être liée à une concentration plasmatique insuffisante d'Imatinib. Une récente étude de dosage plasmatique de l'Imatinib par HPLC démontre que certains patients traités à la dose de 400 mg/jour n'atteignent pas une concentration plasmatique efficace ¹⁸⁵. Cet examen biologique permet de dépister d'éventuelles interactions médicamenteuses susceptibles de diminuer la concentration plasmatique d'Imatinib, ou les défauts d'observance de certains patients. Il semble donc apparaître comme un des examens nécessaires en cas de réponse suboptimale ou de résistance à l'Imatinib.

4. *L'activation d'autres tyrosines kinases* : Un modèle de cellules K562, résistantes à l'Imatinib, mais présentant une diminution du taux d'expression du transcrit **BCR-ABL**, a permis de montrer que la résistance pouvait résulter de l'activation de la voie des Src kinases. L'augmentation de la phosphorylation de molécules telles que LYN (Lck/Yes-related novel tyrosine kinase), responsables de la signalisation en aval, permettrait de contourner l'inhibition de **BCR-ABL** par l'Imatinib dans ce modèle. De plus, le traitement par un inhibiteur de Src kinases affecte la prolifération de la lignée résistante mais n'a pas d'effet sur la lignée parentale ¹⁸⁶. *In vivo*, l'augmentation de l'activité de la Src-kinase LYN, observée chez certains patients en phase accélérée de LMC, est probablement liée à l'évolution de la maladie, mais

pourrait participer à la résistance à l'Imatinib. Le traitement de progéniteurs leucémiques résistants à l'Imatinib par des siRNA ciblant LYN permet de restaurer une activité apoptotique de ces cellules, suggérant une dépendance des voies de signalisation des Src kinases dans la prolifération de cellules Ph⁺ ¹⁸⁷.

5. *L'altération de la stabilité génétique et génomique*: Dans les cellules leucémiques, en plus de l'avantage de prolifération que confère **BCR-ABL**, il a été démontré que l'activité de ce gène de fusion peut être à l'origine d'une instabilité génétique en affectant les voies de réparation de l'ADN. L'activité TK de **BCR-ABL** augmente les niveaux d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) conduisant à l'accumulation de bases oxydées et de DSBs. Les lésions causées par des bases oxydées peuvent être réparées par les systèmes de réparation BER, MMR et NER. Des études ont montré que **BCR-ABL** pourrait exercer un effet négatif sur les systèmes BER et MMR, tout en stimulant le NER qui génère des mutations ponctuelles. Au total, l'inhibition de BER et de MMR dépendante de l'activité TK de **BCR-ABL**, et la stimulation du système mutagène (NER) pourrait conduire à des mutations ponctuelles dans le gène **BCR-ABL**, qui sont responsables de la résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase ^{120,188-191}. Klemm *et al* ont également montré le rôle de l'enzyme AID (Activation-Induced Deaminase) dans la progression de la LMC vers la crise blastique lymphoïde (LMC-CBL) et la génération de mutations de **BCR-ABL** qui confèrent une résistance à l'Imatinib ¹⁹². Les cellules exprimant AID comparées avec les cellules AID-nulle ou AID⁻, ont une excroissance sélective en présence de l'Imatinib et elles acquièrent des mutations dans le gène **BCR-ABL** ressemblant celles retrouvées fréquemment chez les patients résistants à l'Imatinib, y compris la mutation T315I.

Les DSBs sont réparées par les mécanismes de HRR, NHEJ et SSA. **BCR-ABL** stimule leur efficacité, mais elle compromet la fidélité des HRR et NHEJ. Dans ce scénario, **BCR-ABL** induit des mutations ponctuelles dans les produits de HRR et des aberrations chromosomiques telles que les translocations et des délétions partielles ^{188,193}. Cette instabilité génomique et génétique peut conduire, de façon séquentielle au cours de l'évolution de la maladie, à l'acquisition d'altérations secondaires. Ces altérations secondaires conduiraient à la perte de différenciation des

cellules leucémiques observée en phase blastique de la LMC, et pourraient être le support d'une résistance à l'Imatinib. Dans ce contexte, la résistance à l'Imatinib peut alors être liée à la dérégulation des voies de signalisation en amont ou en aval de **BCR-ABL**, affectant ainsi la prolifération, la survie, la différenciation et l'intégrité du génome.

6. *L'altération épigénétique* : en plus des altérations génétiques et génomiques discutées ci-dessus, des altérations épigénétiques touchant l'ADN et la chromatine sont capables de modifier l'expression des gènes et la stabilité de génome rencontré lors du développement de LMC ou de la résistance à l'Imatinib. Ces altérations épigénétiques sont aussi transmissibles lors de la mitose.

L'aberration de la méthylation de l'ADN présente le premier mécanisme décrit impliqué dans le développement de LMC. La méthylation de l'ADN se produit principalement dans des régions appelées îlots CpG. Ces îlots sont fréquents dans les régions promotrices des gènes, ainsi leur hyperméthylation réprime l'expression de gène. La méthylation de l'ADN est catalysée par les enzymes DNA méthyltransférases (DNMTs). Parmi les DNA méthyltransférases, la DNMT1 qui est une enzyme impliquée dans le maintien de l'information épigénétique, prend comme modèle le brin d'ADN hémi-méthylé lors de la réplication tandis que les enzymes DNMT3a et 3b peuvent agir sur un brin non méthylé et donc modifier l'information épigénétique ^{194,195}. L'expression des DNMTs dans les cellules de LMC chez les patients en phase chronique est similaire à celle des cellules normales. La progression de la maladie vers la phase blastique est associée à une augmentation significative des niveaux d'expression des DNMTs ¹⁹⁶. Cette activité élevée de DNMTs pourrait expliquer le profil hyperméthylé de certains gènes associé avec la progression de maladie ou la résistance à l'Imatinib. Gènes régulateurs de cycle cellulaire (P16INK4A et P14ARF), de l'apoptose (c-Abl et DAPK1 pour Death-Associated Protein Kinase1) ou de micro-RNA (miR-203) ont été trouvés hyperméthylés et associés avec le développement de LMC vers les phases avancées ¹⁹⁷⁻²⁰⁰. Des études récentes ont aussi démontré que l'hyperméthylation des certains gènes a corrélé avec une résistance à l'Imatinib. La résistance à l'Imatinib dans les LAL Ph⁺ pourrait être dépendante de la diminution de l'expression de PTEN du à une hyperméthylation de

son promoteur ²⁰¹. Une étude récente a aussi démontré que l'hyperméthylation des gènes sFRPs (Secreted Frizzled-Related Proteins), protéines régulant la voie Wnt, est corrélée avec une résistance cytogénétique primaire à l'Imatinib ²⁰².

Les modifications de la chromatine constituent un deuxième mécanisme épigénétique qui s'associe avec la méthylation de l'ADN dans l'évolution de LMC ou la résistance à l'Imatinib. Ce sont des modifications post-traductionnelles des histones. Les histones sont des grosses protéines qui possèdent un domaine globulaire carboxy-terminal formant le coeur du nucléosome et une queue amino-terminale exposée à la surface du nucléosome et sujette à diverses modifications post-traductionnelles ²⁰³. Ces modifications vont influencer l'état de compaction de la chromatine et donc modifier les niveaux d'expression des gènes. Il existe quatre types majeurs de modification des histones : l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation et l'ubiquitination ²⁰⁴. L'acétylation des histones est la modification post-traductionnelle la plus directement liée à l'état transcriptionnel de la région de l'ADN impliquée. L'acétylation de l'histone sur des lysines peut mener à la diminution des contacts avec l'ADN nucléosomique avec les nucléosomes voisins et avec certaines protéines régulatrices stabilisant la chromatine. Ces modifications produisent une chromatine plus flexible, où l'ADN est plus accessible. Deux familles d'enzymes influencent les niveaux d'acétylation des histones : les histones acétyltransférases (HATs) qui dissocient la chromatine et permettent l'activation de la transcription et les histones désacétylases (HDACs) qui ont un rôle contraire aux HATs, c'est-à-dire qu'elles enlèvent les groupements acétyles des histones, referment la chromatine et bloquent toute activité ²⁰⁵. Il faut aussi savoir qu'il existe une interdépendance entre l'acétylation des histones et la méthylation de l'ADN. En effet, l'ADN méthylé peut fixer des protéines appelées Methyl-CpG-binding Domain Proteins. Par la suite, ces protéines peuvent recruter d'autres protéines, telles que les HDACs, provoquant ainsi une compaction de la chromatine ^{206,207}.

1.4.2.3 Cellules souches leucémiques quiescentes

Dans l'étude IRIS (International Randomized Study of Interferon versus STI571), 90 à 95 % environ des patients ont en RT-PCR «et ce sur une durée indéfinie» une maladie résiduelle détectable, qui sert de réservoir pour une éventuelle nouvelle évolution de la maladie survenant en effet inéluctablement lorsque l'Imatinib est arrêté ²⁰⁸⁻²¹⁰. *In vitro*, il a été démontré qu'il existe un compartiment de progéniteurs primitifs (CD34⁺ et Ph⁺) quiescents qui reste insensible à l'Imatinib, et l'hypothèse actuelle est de considérer que ce compartiment entretient la persistance indéfinie de la maladie chez les patients traités par Imatinib ²¹¹. Ce phénomène est probablement multifactoriel et il a été démontré que ces cellules primitives Ph⁺ expriment des taux élevés de protéine **BCR-ABL**, des taux élevés de transcrit des pompes d'efflux d'Imatinib (PgP), des taux bas de transcrit des pompes d'influx d'Imatinib (OCT-1), et qu'elles peuvent contenir un nombre important de mutations **BCR-ABL** par rapport à des progéniteurs d'aval ²¹². Notons également que la persistance des cellules leucémiques peut aussi dépendre de stimuli exogènes : en effet, l'interaction des cellules avec le stroma médullaire et la matrice extracellulaire est perturbée dans le cas des cellules leucémiques. L'inhibition de **BCR-ABL** pourrait donc restaurer ces interactions avec le stroma médullaire, participant ainsi à la protection des cellules leucémiques contre l'apoptose et contribuant à la persistance de la maladie résiduelle. Il s'agit d'une question cruciale, car la compréhension de ces mécanismes devrait pouvoir permettre, à terme, l'éradication définitive de la tumeur.

1.5 Surmonter la résistance à l'Imatinib

La découverte de mécanismes de résistance à l'Imatinib a ouvert une course contre le temps pour développer des nouvelles thérapies afin de surmonter la résistance et éradiquer la maladie résiduelle.

Les mutations de **BCR-ABL** apparaissent comme le mécanisme le plus important pour la résistance acquise. Certaines de ces mutations déterminent un phénotype hautement résistant *in vitro* alors que d'autres peuvent être neutralisées

par l'augmentation des doses d'Imatinib. Certains essais cliniques ont montré de meilleures réponses hématologiques et cytogénétiques en augmentant les doses d'Imatinib à 800 mg/jour au lieu de 400 mg dans la LMC nouvellement diagnostiquée. Mais les réponses peuvent ne pas être durables. En général, ces doses de 800 mg sont tolérées de la même façon que 400 mg, mais dans certains cas, la toxicité est sévère et nécessite des diminutions de doses ^{213,214}. Cependant, cette stratégie n'est effective que chez les patients chez lesquels la résistance à l'Imatinib est soit primaire, dirigée par la surexpression du gène *BCR-ABL* ou par les mutations de *BCR-ABL* ne conférant seulement qu'une résistance partielle. Ceci dit, l'augmentation de la dose de l'Imatinib seul ne permet pas de résoudre tous les problèmes de la résistance.

Des nouvelles molécules à associer ou pas à l'Imatinib ont été développées. Certains de ces agents sont approuvés pour l'utilisation clinique et d'autres sont en cours d'évaluation clinique ou préclinique.

1.5.1 Les inhibiteurs de Tyrosine Kinase (ITKs) de seconde génération

On peut classer les ITKs de seconde génération en quatre catégories (Table 1 résume les principaux ITKs et leurs potentielles cibles):

1.5.1.1 Les ITKs de BCR-ABL ATP-Compétitifs

1. *Nilotinib (AMN107)* : C'est une petite molécule orale, dérivative de la même famille de l'Imatinib (Figure 14). Il inhibe l'activité TK de *BCR-ABL*, de PDGFR et de c-Kit mais il n'a aucun effet sur l'activité TK de Src ²¹⁵. *In vitro*, le Nilotinib a 10 à 50 fois plus d'activité inhibitrice que l'Imatinib sur *BCR-ABL* non muté et muté, à l'exception de T315I, E255V/K et Y253H ²¹⁵. Dans une phase I, le Nilotinib s'est révélé actif chez des patients atteints de LMC résistants à l'Imatinib, avec respectivement 72 et 48 % de réponses hématologiques et cytogénétiques dans les phases d'accélération et 38 et 27 % dans les phases blastiques. Dans trois études de phase II, le Nilotinib s'est révélé actif dans les trois phases de la LMC tant au plan hématologique que cytogénétique. Les toxicités sont en général modérées à type de

myélosuppression, de rashes et d'élévation de la bilirubine ²¹⁶⁻²¹⁹. Une résistance au Nilotinib a été supposée d'être due à une surexpression de **BCR-ABL**, de kinase Src ou de pompe d'efflux Pgp ²²⁰. En plus, le Nilotinib est inactif sur les cellules souches leucémiques quiescentes ²²¹.

ITK	ABL	ABL _{T315I}	c-Kit	PDGFR	SRC	Aurora	Autres
Imatinib	+	-	++	++	LCK	-	+
Nilotinib	++	-	+	+	-	-	-
Dasatinib	+++	-	++	++	+++	-	+++
Bosutinib	++	-	-	-	+++	-	+
INNO-406	++	-	-	++	LYN	-	NR
MK-0457	+	+	-	-	-	+++	NR
XL228	+++	+++	NR	NR	NR	+++	NR
PHA-739358	++	++	+	NR	+	+++	+
AP24534	+++	+++	NR	NR	NR	NR	NR
SGX393	+++	+++	-	-	LCK	-	+
DC-2036	+++	+++	NR	NR	++	NR	NR

Table 1 Les cibles potentielles de différents ITKs qui sont utilisés ou qui sont en évaluation clinique dans le traitement de LMC. +, inhibition faible ou modérée ; ++ inhibition modérée ou forte ; +++ inhibition très forte ; NR, non rapporté.

1.5.1.2 Les ITKs de SRC/ABL

1. *Dasatinib* (BMS-354825) : C'est un inhibiteur oral de tyrosine kinase multi cible. Outre ses propriétés inhibitrices d'ABL, **BCR-ABL**, c-KIT, PDGFR, qu'il partage avec l'Imatinib et le Nilotinib, il est également un inhibiteur puissant des kinases de

la famille Src qui sont activées lors des transformations lymphoblastiques de LMC ainsi qu'au cours des LAL Ph⁺. Il se lie aussi à d'autres Tyrosine et Serine/Thréonine kinase comme la famille TEC, MAPK et la récepteur à activité TK DDR1 (Discoidin Domain Receptor 1) ¹⁵⁷. Il est environ 400 fois plus fort que l'Imatinib, mais contrairement à ce dernier, le Dasatinib se lie aux conformations actives et inactives du domaine kinase de **BCR-ABL** et de Src (Figure 14). Il a montré son efficacité *in vitro*, et *in vivo* chez les souris sensibles ou résistantes à l'Imatinib ²²². Chez les malades résistants ou intolérants à l'Imatinib, on a pu observer dans les phases I et II, l'efficacité et la bonne tolérance du Dasatinib. Le Dasatinib a induit, respectivement une réponse cytogénétique durable majeur et complète chez 59% et 49% des patients en phase chronique. Cependant, les réponses hématologiques et cytogénétiques ont été moins durables dans les phases avancées. Parmi toutes les études de phase II, les réponses ont été identiques qu'il y ait ou pas des mutations, à l'exception du T315I. En général, les patients intolérants à l'Imatinib ont supporté des traitements significativement plus longs par le Dasatinib et sans toxicité. Le Dasatinib est généralement bien toléré mais des grades 3 ou 4 de la myélosuppression ont été fréquemment rapportés surtout dans les LMC avancées. Les toxicités non hématologiques sont en général modérées et réversibles ²²³⁻²²⁵. L'émergence ou la sélection de mutation T315I qui insensible au Dasatinib constitue le mécanisme de résistance le plus fréquent. D'autres mutations comme F317L et V299L confèrent aussi la résistance au Dasatinib mais cette dernières, contrairement au T315I, sont sensible à l'Imatinib et au Nilotinib ²²⁶. Bien que le Dasatinib réduise significativement les cellules CD34⁺ CD38⁻ Ph⁺ comparé à l'Imatinib, il n'élimine pas la fraction la plus primitive des cellules souches leucémiques quiescentes ²²⁷.

2. *Bosutinib (SKI-606)* : le Bosutinib a une activité antiproliférative sur les cellules portant **BCR-ABL** sensible ou résistant à l'Imatinib, y compris les mutants Y253F, E255K et D276G, mais pas le mutant T315I. Il se lie aux conformations inactives et intermédiaires du domaine kinase de **BCR-ABL**. Le Bosutinib induit modestement l'apoptose des progéniteurs Ph⁺ et il n'élimine pas les cellules souches leucémiques quiescentes ^{228,229}. Les études primaires de phase II ont montré son efficacité dans le traitement des patients échappés aux Dasatinib ou Nilotinib.

Contrairement au Dasatinib, le Bosutinib n'inhibe pas l'activité de c-Kit ou PDGFR et il est mieux toléré ²³⁰.

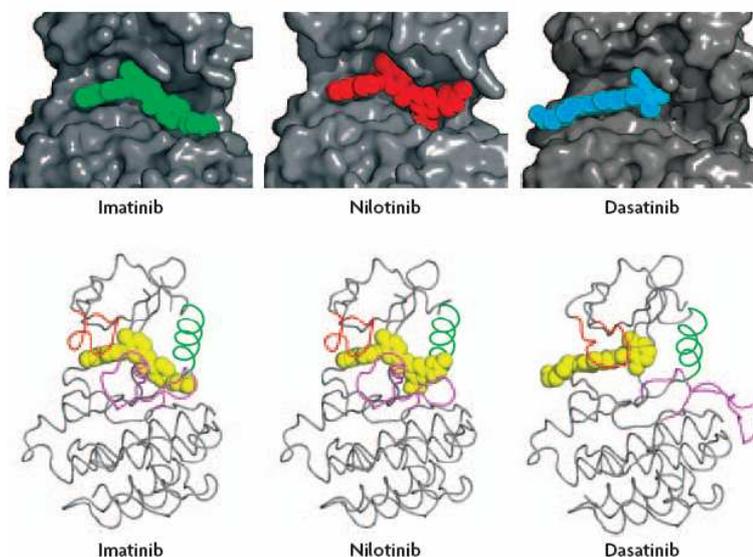


Figure 14 Structure tridimensionnelle de la kinase d'Abl associée à l'Imatinib (vert), Nilotinib (rouge) et Dasatinib (bleu). Les schémas en bas montrent les positions de boucle P (orange) et de boucle A (violet) dans la configuration inactive de kinase (les modes de liaison de l'Imatinib et du Nilotinib) puis dans la configuration active de kinase (mode de liaison du Dasatinib) ²³¹.

3. *INNO-406* : c'est un ITK d'Abl et LYN qui est 55 fois plus puissant que l'Imatinib sur les cellules **BCR-ABL**⁺. Il inhibe plusieurs mutants de **BCR-ABL**, y compris le mutant F317L, mais il n'a aucune activité sur le mutant T315I. Contrairement aux autres ITKs de seconde génération, l'*INNO-406* n'inhibe que la kinase LYN parmi la famille Src. Dans une étude de phase I, *INNO-406* a été bien toléré et il a induit une réponse cytogénétique complète chez 2 sur 7 patients résistant à l'Imatinib, et une réponse hématologique complète chez 2 sur 7 patients qui ont échappé au traitement par plusieurs ITKs ²³².

1.5.1.3 Les ITKs de T315I

La mutation T315I est l'origine de 4% à 19% de résistance à l'Imatinib et elle confère une résistance croisée aux plusieurs ITKs, y compris Nilotinib, Dasatinib et Bosutinib.

L'ON012380, un inhibiteur compétitif du substrat de **BCR-ABL**, a montré une activité inhibitrice *in vitro* et *in vivo* contre le **BCR-ABL** sauvage et muté, y compris le mutant T315I ²³³.

Les kinases Aurora sont des kinases impliquées dans la régulation de mitose et elles sont surexprimées dans plusieurs cancers. MK-0457 (VX-680) est un inhibiteur de la kinase Aurora qui cible aussi l'activité TK de **BCR-ABL**, FLT3 et Jak2 en induisant l'apoptose. Contrairement aux autres ITKs de Abl, le MK-0457 inhibe la mutant T315I. Dans une étude de phase I, une réponse cytogénétique majeure a été obtenue chez 3 sur 9 patients en phase avancée portant la mutation T315I ²³⁴. Des études de phase II sont en cours. Le PH-739358 est un autre inhibiteur de la kinase Aurora qui a aussi montré une activité antiproliférative et proapoptotique sur les cellules **BCR-ABL**⁺ non mutées et portant la mutation T315I. Des réponses hématologiques et cytogénétiques ont été obtenues chez les patients portant le mutant T315I, et les essais de phase II sont maintenant en cours ²³⁵.

Le SGX393 est un azaindol qui inhibe l'activité TK de **BCR-ABL** sauvage et le mutant T315I ainsi que d'autres mutants. Son efficacité a été montrée *in vivo* chez les souris portant le mutant T315I ²³⁶.

D'autres ITKs de T315I, comme XL228 et AP24534, sont maintenant dans des études de phase I.

1.5.1.4 Les ITKs allostériques

Cette catégorie d'ITKs a été récemment découverte par un criblage cytotoxique différentiel de 50000 composés hétérocycliques synthétisés combinatoirement contre le domaine kinase. Cette classe de composés agit par un mécanisme allostérique non ATP-compétitif impliquant une liaison à la poche myristate dans le lobe C de domaine kinase de **BCR-ABL**. Le GNF-2, le chef de file de cette classe, n'a aucune activité sur les kinases Kit, PDGFR et Src, par contre il inhibe le **BCR-ABL** sauvage et les mutants Y253F et E255V ²³⁷.

1.5.2 Nouvelles molécules à associer ou pas à l'Imatinib

Tôt dans les phases de mise au point de l'Imatinib, Thiesing et *al* ont démontré l'efficacité et la synergie de l'Imatinib en association avec des chimiothérapies classiques, comme la Daunorubicine, ainsi qu'avec des médicaments traditionnellement utilisés contre la LMC, comme l'Interféron alpha et l'Hydroxyurée. Ils ont conclu que la combinaison de l'Imatinib à la chimiothérapie classique était meilleure que l'Imatinib seul dans le traitement de LMC et elle pourrait prévenir la résistance due à la monothérapie²³⁸. Cette constatation précoce a stimulé la mise au point de différentes combinaisons de l'Imatinib aux inhibiteurs des voies en amont ou en aval de **BCR-ABL** pour surmonter la résistance aux ITKs. L'efficacité de traitement combiné à l'Imatinib sur les cellules résistantes met en évidence l'importance de ses effets "Off-target" dans son activité anti-tumorale. Cette stratégie a été aussi réussite avec les autres ITKs de seconde génération, mais la révolution est souvent revenue au son point de départ.

1.5.2.1 Homoharringtonine

L'Homoharringtonine Hémi-synthétique (HHT) est un alcaloïde présent à l'état de trace dans plusieurs espèces de conifères chinois rares et menacés, appartenant au genre *Cephalotaxus*. Quoique sous forme partiellement purifiée, l'HHT est largement utilisé en Chine dans le traitement des leucémies aiguës myéloblastiques (LAM). Cependant, cette surexploitation à des fins thérapeutiques, a conduit au quasi destruction de ce conifère et au développement d'une hémi-synthèse permettant de proposer en quantité illimitée, un produit dit "hémi-synthétique" conforme aux normes environnementales. L'HHT inhibe la synthèse protéique, induit l'apoptose et il est synergique ou additif en combinaison à l'Imatinib. Des réponses hématologiques complètes et cytogénétiques ont été obtenues chez les patients résistants à l'Imatinib et traités par l'HHT. Son association avec l'Imatinib a réduit le taux de transcrits **BCR-ABL** d'un log chez 50% de patients ayants une réponse cytogénétique majeure sous l'Imatinib. Des études récentes ont démontré que l'HHT induisait une réduction ou une disparition de mutant T315I

chez les patients qui ont développé cette mutation pendant le traitement par l'Imatinib. L'HHT est actuellement dans des études de phase II chez les patients résistants aux ITKs, y compris les mutants T315I²³⁹⁻²⁴².

1.5.2.2 Les inhibiteurs de HSP90

L'Hsp90 (Heat Shock Protein 90) est une protéine dite « chaperon » qui, lorsqu'elle est active, soutient et stabilise de nombreuses protéines comme Akt, c-Kit, FLT3 et **BCR-ABL**. La Geldanamycine et son dérivé 17-AAG (17-allylamino-17-demethoxygeldanamycine) se lient à l'Hsp90 et inhibent sa fonction « chaperon », menant ainsi à la diminution de la protéine **BCR-ABL** et induisant l'apoptose de cellules Ph⁺. De plus, ils inhibent la croissance de cellules portant les mutants E255K et T315I. En plus, le 17-AAG cible la pompe d'efflux de l'Imatinib (PgP) et pourrait inhiber l'efflux de l'Imatinib. Toutefois, l'amplification de **BCR-ABL** confère une résistance aux inhibiteurs de Hsp90, mais leur association avec l'Imatinib surmonte cette résistance²⁴³⁻²⁴⁵.

1.5.2.3 L'arsenic trioxyde

L'arsenic trioxyde (As₂O₃) induit l'apoptose de cellules **BCR-ABL**⁺ et diminue la prolifération des blastes de LMC en dégradant préférentiellement la protéine **BCR-ABL**. Son association avec l'Imatinib a induit l'apoptose des cellules résistantes à l'Imatinib portant une amplification de **BCR-ABL** ou des mutations M351T ou Y253F. Des études récentes ont montré que le traitement par l'arsenic peut stimuler la division active des cellules souches de la LMC, les cellules deviennent alors sensibles à l'Imatinib. Un essai de phase II sur un traitement combinant l'Imatinib à l'arsenic est actuellement en cours²⁴⁶⁻²⁴⁹.

1.5.2.4 Les inhibiteurs de protéasome

Les inhibiteurs de protéasome ciblent le cœur catalytique 20S du protéasome et suppriment la dégradation protéasomal de nombreuses protéines cellulaires.

L'inhibition de l'activité de NF- κ B pourrait être impliquée dans l'effet anti-tumoral de ces inhibiteurs. Le Bortezomib (PS-341, Velcade) est un inhibiteur de protéasome qui diminue la prolifération, induit l'arrêt de cycle cellulaire en phase G2/M et promeut l'apoptose des lignées cellulaires sensibles ou résistantes à l'Imatinib. Cependant, le traitement simultané de lignées cellulaires sensibles à l'Imatinib par l'association Bortezomib/Imatinib a produit une interaction antagonique sur l'inhibition de croissance, bien que l'exposition séquentielle de ces lignées aux faibles doses de Bortezomib suivi par l'Imatinib abouti à un effet additif. La synergie entre le Bortezomib et les inhibiteurs de HDACs et entre le Bortezomib et le Flavopiridol a été rapportée dans des études *in vitro* sur des lignées de LMC ²⁵⁰⁻²⁵².

1.5.2.5 Les inhibiteurs de CDK (Cyclin-Dependent Kinase)

Le Flavopiridol est un flavone semisynthétique qui peut inhiber plusieurs CDKs. Le traitement combinant l'Imatinib au Flavopiridol augmente le damage mitochondriale, active les caspases et l'apoptose dans les lignées cellulaires de LMC mais pas dans les lignées leucémiques **BCR-ABL** négatives. Cette association était aussi active sur une lignée résistante à l'Imatinib qui surexprime **BCR-ABL**. Une étude de phase I sur des leucémies **BCR-ABL**⁺, a montré que la combinaison Imatinib/Flavopiridol était tolérable et responsable de quatre réponses objectives, y compris deux réponses hématologiques complètes ²⁵³.

1.5.2.6 Les inhibiteurs DNMTs (DNA-Methyltransferase)

La méthylation d'ADN contribue au développement de la LMC et de la résistance à l'Imatinib en réprimant les gènes qui sont essentiels pour la différenciation et l'apoptose. La Decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine; SuperGen) est un agent hypométhylant d'ADN qui s'intègre dans l'ADN et forme des liens covalent irréversibles avec la DNMT. La synthèse d'ADN s'arrête au niveau de ces sites modifiés et les complexes ADN-DNMT sont finalement dégradés. La perte des complexes ADN-DNMT est associée à l'épuisement de niveaux de DNMT qui aboutit à une hypométhylation de l'ADN nouvellement synthétisé.

Des réponses hématologiques et cytogénétiques ont été observées dans une étude de 130 patients de LMC traités par la Decitabine aux doses de 50 à 100 mg/m² toutes les 12 heures pendant 5 jours. Cependant, une myélosuppression sévère dépendante de la dose a été observée. Dans une étude de phase I réalisée sur des leucémies réfractaires, un traitement prolongé d'une faible dose de Decitabine a été donné à 50 patients, y compris cinq patients de LMC. De ces cinq patients, deux ont eu une réponse hématologique complète et deux autres ont eu une réponse hématologique partielle. La combinaison de Decitabine à l'Imatinib a été révélée utile dans la LMC. Une étude *in vitro* a montré que cette combinaison avait une action additive ou synergique sur la croissance des cellules contenant **BCR-ABL** muté à M351T et Y253F. Cependant, l'association d'Imatinib/Decitabine était moins puissante que Decitabine seule dans l'inhibition de prolifération de cellules portant le mutant T315I. Cette thérapie combinée a été aussi réalisée dans une étude de phase II sur 28 patients de LMC en phase avancée, y compris 25 patients résistants à l'Imatinib. Des réponses hématologiques complètes, partielles et mineures ont été observés chez 32 %, 4 % et 7 % de patients, respectivement. Des réponses cytogénétiques majeures et mineures ont été observées dans 18 % et 11% de patients, respectivement. Cette étude a conclu que l'association de Decitabine avec l'Imatinib était bien tolérée et active dans le traitement de patients en phase avancée et résistants à l'Imatinib sans avoir de mutations de **BCR-ABL** ²⁵⁴⁻²⁵⁷.

1.5.2.7 Les inhibiteurs de HDAC (Histones désacétylases)

Les inhibiteurs de HDAC (IHD), comme SAHA (Suberoylanilide hydroxamic acid), induisent l'arrêt de cycle cellulaire et l'apoptose des cellules tumorales. SAHA incite l'expression de p27, un régulateur principal de cycle cellulaire, et diminue aussi l'expression protéique de **BCR-ABL**. Le traitement des lignées cellulaires de LMC par une combinaison de SAHA/Imatinib a induit plus d'apoptose qu'a été réalisé avec l'un ou l'autre agent seul. Cette combinaison a aussi produit un effet synergique sur l'apoptose des lignées résistantes à l'Imatinib surexprimant **BCR-ABL**. Le cotraitement Nilotinib/LBH589, un autre IHD, avait un effet synergique sur

l'apoptose des lignées K562 et LAMA84. LBH589 a aussi induit l'apoptose des lignées cellulaires résistantes à l'Imatinib qui expriment les mutants T315I et E255K. Récemment, une étude a montré que l'inhibition de HDAC par le Valproate augmente l'arrêt de prolifération et l'apoptose induits par l'Imatinib sur des lignées de LMC. De plus, le traitement par le Valproate a restauré la sensibilité à l'Imatinib dans des lignes de LMC résistantes à l'Imatinib et ainsi dans des cellules primaires résistantes à ce TKI ²⁵⁸⁻²⁶¹.

1.5.2.8 Les inhibiteurs de Farnesyl transférase

Des données génétiques et biochimiques ont montré que l'activation de la voie Ras joue un rôle central dans la transformation leucémogène de la protéine **BCR-ABL**. La fonction correcte de Ras est dépendante de la prénylation, qui est une modification post-traductionnelle, impliquant une addition de groupe de Farnesyl au résidu cystéine conservé dans le motif CAAX de protéine Ras. Cette modification est catalysée par les enzymes Farnesyl transférase (FT) et Geranylgeranyl transférase (GGT). Deux inhibiteurs de Farnesyl transférase (IFT) ont montré une activité anti-tumorale contre la LMC.

1. *Tipifarnib* : une étude de phase II incluant 22 patients de LMC a montré une activité modeste de ce médicament. Il a induit des réponses hématologiques complètes ou partielles chez 32 % de ces patients. Une réponse cytogénétique mineure a été aussi observée mais les réponses n'étaient pas durables ²⁶². Récemment, une étude de phase I a montré que la combinaison Tipifarnib/Imatinib était tolérée et active sur 26 patients résistants à l'Imatinib. 27% de ces patients ont présenté une réponse cytogénétique majeure. Une réponse cytogénétique partielle a été obtenue chez un patient portant la mutation T315I ²⁶³.

2. *Lonafarnib* : Lonafarnib, un autre IFT, est un inhibiteur puissant et sélectif de la croissance de cellules primaires de patients de LMC. Son efficacité a été démontrée dans un modèle murin de LMC en phase blastique ²⁶⁴. Lonafarnib a inhibé la prolifération de lignées cellulaires résistantes à l'Imatinib et a réduit la formation de colonie par des cellules primaires obtenues des patients résistants à l'Imatinib.

Cependant, les résultats d'une étude pilote testant Lonafarnib sur des patients de LMC résistants à l'Imatinib, ont été décourageants avec seulement 2 sur 13 patients réalisant une réponse clinique ^{265,266}. Un rapport récent a montré que Lonafarnib est capable de sensibiliser les progéniteurs leucémiques primitifs quiescents à l'effet de l'Imatinib ²⁶⁷.

Récemment, une étude a montré que le BMS-214662, un nouvel IFT, augmente l'effet cytotoxique d'Imatinib ou Dasatinib sur les cellules primaires CD34⁺ de LMC et réduit significativement les nombres de ces cellules, seul ou en association avec l'Imatinib ou Dasatinib. Cet effet était sélectif sur les cellules souches tumorales par rapport aux cellules souches normales qui ont été relativement épargnées. Le mécanisme d'action passe probablement par l'induction d'apoptose traduite par une augmentation de l'activité de caspase-3 ²⁶⁸.

1.5.2.9 Les inhibiteurs de MEK1/2

Plusieurs inhibiteurs MEK1/2 ont été développés, comme PD18435273 et U0126. PD184352 ou U0126, quand ils sont combinés à l'Imatinib, ont un effet apoptotique synergique sur les cellules de LMC ²⁶⁸. De plus, l'association de PD184352 avec l'Imatinib a efficacement induit la mort cellulaire d'une lignée cellulaire résistante à l'Imatinib et qui surexprime **BCR-ABL**. Le PD184352 a été récemment montré d'être synergique avec le Dasatinib pour surmonter la résistance à l'Imatinib, à l'exception de mutation T315I ²⁶⁹.

1.5.2.10 Les inhibiteurs de la voie PI3K/Akt/mTOR

La voie PI3K/Akt/mTOR est impliquée dans le rôle transformant de la protéine **BCR-ABL** en régulant la croissance, la prolifération, l'adhésion et la survie cellulaire. Le Rapamycin est un antibiotique macrolidique se lie à la molécule d'immunophiline FKBP12 en formant un complexe qui inhibe mTOR. Un dérivé de Rapamycin, RAD001 (Everolimus), a été récemment développé et il a montré une activité inhibitrice contre le complexe insensible au Rapamycin (mTORC2). Le traitement par le Rapamycin seul diminue la prolifération de Ba/F3-**BCR-ABL** aussi

INTRODUCTION

bien que les lymphoblastes B transformée par **BCR-ABL** et les cellules primaires de LMC. Le Rapamycin prolonge aussi la survie des souris transplantées par la moelle osseuse qui avait été transformée par **BCR-ABL**. L'effet inhibiteur *in vitro* de Rapamycin sur la croissance de cellules primaires de LMC est du à l'arrêt de cycle cellulaire en phase G1 suivi par l'induction de l'apoptose. De plus, la combinaison Imatinib/Rapamycin a surmonté la résistance à l'Imatinib dans une lignée surexprimant **BCR-ABL**. Cependant, les rapports sur l'effet de cette combinaison sur des mutants **BCR-ABL** ont été contradictoires ²⁷⁰⁻²⁷². Récemment, la signalisation par la voie PI3K/Akt/mTOR a été démontrée comme un mécanisme compensatoire responsable de maintenir la viabilité de cellules naïves à l'Imatinib pendant la première exposition à cet ITK. Le traitement par l'Imatinib aboutit à l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR et cette activation est importante afin de maintenir la survie cellulaire pendant le premier développement de résistance à l'Imatinib ²⁷³. Des essais cliniques examinant la tolérance et l'efficacité de combiner l'Imatinib à l'Everolimus ou CCI-779, un autre inhibiteur de mTOR, sont actuellement en cours.

CHAPITRE II

Objectifs

CHAPITRE II

OBJECTIFS

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, l'Imatinib représente une véritable révolution dans la prise en charge de la LMC, et bien que la résistance soit minoritaire, son étude a permis une évolution considérable des connaissances sur les mécanismes de la leucémogénèse en révélant ainsi l'aspect hétérogène de cette maladie. Cependant, reste la notion essentielle que ce traitement, bien que ciblé, ne guérit pas la LMC dans certains cas. La résistance est due aux mécanismes dépendants ou indépendants de **BCR-ABL** et ainsi que à la persistance d'une maladie résiduelle. Des nouveaux ITKs et des approches d'associations, ont été développés pour surmonter la résistance à l'Imatinib, mais une partie de cette résistance demeure difficile à traiter et aboutit à une conséquence fatale. Mieux comprendre ces mécanismes de résistances a apparaît donc d'un intérêt majeur pour une meilleure prise en charge des patients atteints de LMC.

C'est dans ce contexte que notre travail base sur trois objectifs :

1. *Evaluation de l'instabilité génétique des progéniteurs leucémiques CD34⁺ de LMC afin d'analyser ses conséquences sur la réponse au traitement par l'Imatinib:*

La présence de mutations dans le site actif de la TK **BCR-ABL** est probablement liée à la physiopathogénie de la LMC, mais cela n'a pas été clairement démontré. Leur présence pourrait traduire une instabilité génétique de la cellule leucémique. Cette instabilité est certainement le siège de la progression de la maladie, ainsi que de la résistance au traitement par Imatinib.

Nous souhaitons, d'une part, établir une corrélation entre l'émergence des mutations et l'instabilité génétique chez des patients traités et résistants à l'Imatinib.

D'autre part, nous voulons évaluer les microremaniements génomiques (gains ou/et des pertes cryptiques) qui traduisent une instabilité génétique. Existe-t-il des régions récurrentes dont l'altération peut conduire à la dérégulation de l'activité de gènes importants pour la résistance ? En effet, il a été montré récemment des altérations cryptiques concernant certaines régions génomiques dont la présence est corrélée avec le stade d'évolution de la LMC. La caractérisation précise de ces régions

OBJECTIFS

peut aboutir à l'identification de gènes potentiellement impliqués dans les mécanismes de résistance/progression de la leucémie.

2. *Etudier le rôle de GILZ (Glucocorticoid-Induce Leucine Zipper) dans le développement de LMC et la résistance aux ITKs :*

Le gène GILZ a été isolé à partir d'une banque de soustraction d'ADN complémentaire (ADNc) de thymus, comme un gène de réponse à la Dexaméthasone, un glucocorticoïde synthétique. La protéine GILZ appartient à la famille des leucine zipper. Les leucines zippers sont le plus souvent des facteurs de transcription. Ces molécules sont constituées de deux hélices α anti-parallèles qui s'enroulent l'une autour de l'autre (sous forme d'un super enroulement gauche) de telle façon que des résidus leucines se retrouvent en face l'un de l'autre.

GILZ est une protéine ubiquitaire dont l'expression est induite par les glucocorticoïdes et l'interleukine 10 (IL10) dans les cellules hématopoïétiques. GILZ jouerait un rôle important dans l'activation des lymphocytes T et la mort cellulaire par AICD (Activation-Induced Cell Death). En effet, la surexpression de GILZ dans la lignée lymphoïde murine 3DO inhibe l'apoptose induite par le TCR via une diminution de l'expression de Fas/FasL. GILZ inhibe l'expression du couple IL2/IL2R induite par le TCR ainsi que l'activité de NF κ B en bloquant sa translocation au noyau et sa liaison à l'ADN par une interaction directe protéine-protéine GILZ/NF κ B. D'autre part, GILZ induit aussi l'apoptose de thymocytes en diminuant l'expression de Bcl_{XL}.

Dans les cellules dendritiques, GILZ inhibe l'expression de cytokines inflammatoires en réponse à des agents de maturation et favorise l'induction de tolérance en permettant la génération de lymphocytes T régulateurs.

En plus de la voie NF κ B, GILZ inhibe aussi la voie Ras/Raf et l'activité transcriptionnelle d'AP1 par une interaction directe. L'inhibition de la voie Ras/Raf par GILZ diminue la croissance de lignée cellulaire transformée par une protéine Ras constitutivement activée ²⁷⁴.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la combinaison de l'Imatinib aux inhibiteurs de la voie Ras constitue un moyen pour surmonter la résistance à l'Imatinib. De plus, des résultats récents montrent que des inhibiteurs

OBJECTIFS

des la voie NFκB sont capables de surmonter la résistance à cette drogue. Alors, GILZ, en inhibant les voies Ras/Raf, NFκB et AP-1, pourrait être un outil thérapeutique important afin de surmonter la résistance aux ITKs. Dans ce contexte, notre laboratoire a récemment isolé et caractérisé des clones de cellules de LMC résistants aux effets proapoptotiques de l'Imatinib et d'autres inhibiteurs de **BCR-ABL**. D'abord, nous regardons l'effet de l'activité TK de **BCR-ABL** sur l'expression de gène GILZ. Nous comparons ensuite, l'expression endogène de GILZ dans nos différents clones de LMC résistants à l'Imatinib et aux autres inhibiteurs de **BCR-ABL**. Puis, nous analysons l'effet de la surexpression de GILZ sur la prolifération et la viabilité de nos différentes lignées. Ce dernier nous amène après à étudier l'effet de GILZ sur l'expression de membres de la famille Bcl2, les principaux régulateurs de l'apoptose, qui sont en aval de la voie Ras/Raf et PI3K/Akt. En conséquence, Nous testons ensuite l'effet de la combinaison GILZ/Imatinib sur la résistance aux ITKs *in vitro* et *in vivo*. Nous validons après cette stratégie par l'utilisation séquentielle des corticoïdes (induisant l'expression de GILZ) et d'Imatinib sur des cellules souches leucémiques résistantes. Finalement, nous étudions le profil d'expression génique des lignées cellulaires surexprimant GILZ par des puces transcriptomiques.

3. *Evaluer l'impact de la méthylation du gène PHLPP1 (PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase gene 1) dans le développement et la réponse aux traitements de LMC :*

L'origine de ce travail est une étude récente qui a montré que l'activité TK de **BCR-ABL** réprime l'expression de la phosphatase PHLPP dont l'activité est de déphosphoryler la sérine 473 d'Akt favorisant son inactivation²⁷⁵. Dans un premier temps, nous comparons l'expression endogène de variant 1 de PHLPP (PHLPP1), dans nos différents clones de LMC sensibles ou résistants à l'Imatinib. Nous testons ensuite l'effet de la surexpression de PHLPP1 sur la viabilité de nos lignées *in vitro*. Enfin, nous analysons la méthylation de gène PHLPP1 par la méthode de MSP (Methylation-specific PCR) dans notre lignée résistante à l'Imatinib et ainsi dans les cellules CD34⁺ provenant des patients résistants ou répondeurs aux ITKs.

CHAPITRE III

Résultats

Partie I

Sami Joha; S Corm; FE Nicolini; G Etienne; F Guilhot; E Lippert; C Roumier; O Nibourel; N Grardel; V Maguer-Satta; T Idziorek; JP Kerckaert; JL Lai; C Preudhomme; C Roche-Lestienne. **“Characterization of the genetic instability in chronic myeloid leukaemia patients by acquired copy number alteration analysis of CD34⁺ cell populations”** *Under revision in Genes Chromosomes and Cancer.*

Ce premier travail a pour objectif d'évaluer la présence de microremaniements génétiques (traduisant une instabilité) au sein de **progéniteurs leucémiques CD34⁺** de patients traités par Imatinib par la technique **d'Hybridation Génomique Comparative Array (CGH)** en utilisant l'ADN **des cellules T** (non malignes) de chaque patient comme référence. Vingt-cinq patients résistants à l'Imatinib (dont 4 sont en phase accélérée et 4 en phase blastique) et 11 patients répondeurs ont été inclus dans notre étude. Pour chacun, les cellules CD34⁺ et les cellules T ont été positivement isolées par un tri magnétique à partir de prélèvements de moelle osseuse ou de sang.

Les résultats montrent une relation significative entre l'existence de microremaniements et la phase de maladie ($p=0.036$) ou la perte de réponse à l'Imatinib chez les patients diagnostiqués en phase chronique ($p=0.04$), suggérant que la résistance à l'Imatinib pourrait être corrélée aux altérations génétiques survenant précocement dans la physiopathologie de la maladie.

En utilisant la CGH-array à haute résolution, nous avons pu détecter des gains et des pertes cryptiques dont la plupart sont dans les cellules CD34⁺ Ph⁺. Ces microremaniements comprenaient 22 pertes et 6 gains. Ces régions peuvent contenir un ou plusieurs gènes impliqués dans la progression de la LMC et / ou le

RÉSULTATS

développement de la résistance à l'Imatinib. Des pertes récurrentes ont été identifiées dans les régions 7p12.1-p14.1, 12p12.1-p13.31 et 13q14.2-q14.3.

113 gènes affectés ont été détectés dont la majorité sont impliqués dans le cancer (30 gènes), la régulation de l'apoptose (18 gènes), la prolifération cellulaire (34 gènes), la suppression de tumeur (12 gènes), la réparation de l'instabilité génomique (12 gènes), la différenciation cellulaire (12 gènes) ou des gènes codant pour des histones (3 gènes). Certains de ces gènes affectés sont localisés dans des régions connues pour être hypervariables (CNV) suggérant un rôle de ces régions dans le développement de la LMC ou la résistance à l'Imatinib. Nous avons mis en évidence la présence d'une anomalie acquise récurrente dans telle région localisée en 8p23.1 qui groupe les gènes de la famille de la Défensine B. Ce microremaniement n'est pas lié à la résistance à l'Imatinib car il est retrouvé dans les populations cellulaires CD34⁺ Ph⁺ et Ph⁻.

Ainsi la technique de CGH à haute résolution que nous avons utilisée a démontré une efficacité, une fiabilité et une sensibilité excellentes. En utilisant pour chaque patient l'ADN de ses propres cellules T normales comme ADN référence (pour éviter les variations dues aux polymorphismes CNV) il a été possible de détecter les anomalies acquises du nombre de copies (CNA).

Partie II

Sami Joha; D Hétuin; N Jouy; X Dezitter; V Dauphin; S Corm; FX Mahon; C Roche-Lestienne; C Preudhomme; B Quesnel; T Idziorek. **“GILZ overcomes resistance to BCR-ABL Tyrosine Kinase inhibitors by inhibiting the mTORC2 pathway”**
Under revision in Cancer Research.

Dans ce travail nous avons étudié le rôle de GILZ (Glucocorticoid-Induce Leucine Zipper) dans la résistance aux ITKs. Comme nous l'avons vu dans les rappels bibliographiques, la combinaison de l'Imatinib aux inhibiteurs des voies en amont ou en aval de **BCR-ABL** a montré une efficacité dans le traitement de maladie résistante. GILZ, en inhibant les voies Ras/Raf, NFκB et AP1, pourrait-il surmonter la résistance aux ITKs ?

Nos résultats montrent que l'expression de GILZ est diminuée dans les cellules résistantes aux ITKs et ainsi dans les cellules dormantes résiduelles. L'expression forcée de GILZ dans ces lignées restaure la sensibilité à l'Imatinib. GILZ augmente l'expression de Bim et synergise avec l'Imatinib pour diminuer l'expression de Mcl1 et induire l'apoptose. Nos résultats montrent, pour la première fois, que GILZ induit la transcription de Bim en inhibant la voie mTORC2/Akt^{Ser473} par une interaction directe GILZ/mTORC2. En revanche, dans les cellules dépourvues de **BCR-ABL**, GILZ conserve son activité inhibitrice de la voie Ras/Raf/ERK. Le traitement séquentiel par glucocorticoïde puis Imatinib induit, par le même mécanisme, l'apoptose de cellules souches de patients résistants.

Nos résultats indiquent que la modulation de l'expression de GILZ pourrait représenter une nouvelle stratégie thérapeutique pour cibler les cellules leucémiques résistantes ou résiduelles.

Partie III

Sami JOHA; T IDZIOREK; C ROCHE-LESTIENNE; C PREUDHOMME; B QUESNEL. “**Pleckstrin Homology Domain Leucine-rich Repeat Protein Phosphatase gene 1 is methylated in CML and its reexpression induce cell death in Imatinib resistant cells**” *Under revision in Leukemia Research.*

Notre précédent travail a montré l'importance de la régulation de la voie mTORC2 dans la résistance aux ITKs. Pour cette raison, dans ce troisième partie nous nous sommes intéressés à la régulation négative de la voie mTORC2/ Akt^{Ser473} par la phosphatase PHLPP. Une étude récente a aussi montré que l'activité de **BCR-ABL** réprime l'expression de PHLPP. Cette phosphatase déphosphoryle la serine 473 de l'Akt et inhibe ainsi son activité vers certains substrats comme FoxO3a. Notre objectif est d'étudier le statut de méthylation du variant 1 de la phosphatase PHLPP (PHLPP1) dans la LMC.

Les résultats montrent que la répression de l'expression de PHLPP1 contribue à la résistance à l'Imatinib dans les cellules **BCR-ABL**⁺. Cette répression a été due à une méthylation de son promoteur chez 3 sur 6 patients résistants à l'Imatinib, dont deux en phase blastique. En revanche, le promoteur de PHLPP1 n'a pas été méthylé chez trois patients répondeurs. Bien qu'il ne soit pas possible d'évaluer la fréquence de méthylation de PHLPP1 dans ce petit groupe de patients, il indique, pour la première fois, que la répression d'expression de PHLPP1 n'est pas exclusivement due à l'activité TK de **BCR-ABL**, mais aussi aux modifications épigénétiques.

CHAPITRE IV

Discussion

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est une transformation maligne d'une cellule souche hématopoïétique, caractérisée par une anomalie génétique acquise : la translocation t(9;22)(q34;q11) ou le chromosome Philadelphie (Ph) et son équivalent moléculaire, l'oncogène **BCR-ABL**. La protéine **BCR-ABL** est dotée d'une activité tyrosine kinase (TK) constitutive et responsable de l'activation de plusieurs voies de survie incluant PI3K/Akt/mTOR, Jak/Stat, NfκB ainsi que la voie Ras/Raf/ERK, et conduisant à une augmentation de la prolifération et à l'inhibition de l'apoptose des cellules leucémiques. La progression de la maladie vers la phase accélérée puis blastique s'accompagne d'anomalies génétiques additionnelles, marqueurs d'une instabilité génomique croissante. La responsabilité de **BCR-ABL** dans la genèse de cette instabilité génomique est fortement suspectée.

Dérivé des 2-phénylamino-pyrimidines, l'Imatinib inhibe l'activité tyrosine kinase de **BCR-ABL** ainsi que la prolifération des lignées cellulaires **BCR-ABL** positives et induit leur apoptose. L'Imatinib (Glivec®) est devenu le traitement de première intention des patients en phase chronique. Or une rémission complète cytogénétique n'est pas obtenue chez tous les patients et l'on observe fréquemment des rechutes chez les patients traités en phase avancée. La résistance à l'Imatinib est due aux mécanismes dépendants ou indépendants de **BCR-ABL** incluant, parmi d'autres, des mutations dans le domaine kinase de **BCR-ABL**, une amplification de **BCR-ABL** ou des altérations des voies de signalisation en aval de **BCR-ABL**.

Des nouveaux inhibiteurs de tyrosine kinases (ITKs) ou des associations avec l'Imatinib ont été développés afin de surmonter la résistance. Cependant, une résistance croisée et multiple demeure difficile à traiter et nécessite une meilleure compréhension de mécanismes de résistance afin d'éradiquer la maladie dans un avenir proche.

Comprendre le contexte dans lequel émerge la résistance à l'Imatinib, c'est comprendre les mécanismes physiopathogéniques de l'évolution de la maladie puisque dans le modèle LMC, le traitement par l'Imatinib cible l'anomalie moléculaire à l'origine de la maladie. En utilisant la technique d'hybridation

génomique comparative (CGH-array) à haute résolution, nous avons pu montrer une association significative entre les anomalies acquises du nombre de copies (CNA) et le stade d'évolution de maladie. Ces résultats concordent avec des études précédentes qui ont démontré la présence de régions chromosomiques présentant des délétions ou des gains par CGH-array accompagnant l'évolution de la LMC ²⁷⁶⁻²⁷⁸. Dans une de ces études, Hosaya *et al.* ont montré, chez 55 patients atteints de LMC, que la fréquence de CNA est plus élevée dans les phases avancées ²⁷⁶. Toutefois, à l'exception du gain 8p23, aucune similitude des régions touchées n'a été observée entre cette étude et la nôtre. Cette observation peut être liée au fait que les auteurs ont étudié les populations cellulaires totales au lieu du compartiment primitif en utilisant une technique de CGH moins sensible. Alors, contrairement à cette étude, nous avons évalué la présence de ces microremaniements génétiques au sein de progéniteurs leucémiques CD34⁺ et nous avons évité les variations dues aux polymorphismes (CNV) en utilisant pour chaque patient l'ADN des ses propres cellules T comme de référence. Brazma *et al* ont également rapporté que l'analyse de la fraction primitive permet d'identifier des régions affectées différentes de celles trouvées dans les cellules leucémiques totales ²⁷⁷. De même, nous avons décrit chez un patient une délétion de 56 Mb situé sur le chromosome 13 qui n'était pas détecté par le caryotype. Cette délétion a été confirmée par la technique de FISH mais uniquement au sein de noyaux, confirmant l'avantage d'analyser un compartiment cellulaire trié CD34⁺, sans étape de culture cellulaire au préalable. Nous avons également démontré un lien significatif entre le nombre de lésions génétiques et l'apparition de la perte de la réponse à l'Imatinib chez les patients diagnostiqués en phase chronique (PC). Ce résultat suggère que la perte de la réponse à l'Imatinib pourrait être liée à l'instabilité génétique survenant même en PC, et évoque une hétérogénéité des phases chroniques lorsque l'on considère le profil génétique. En revanche, nous n'avons pas trouvé de relation significative entre le nombre de CNAs et le statut mutationnel de **BCR-ABL**. Ce résultat est corroboré avec l'absence de corrélation significative entre le nombre de CNAs chez les patients résistants et le type de résistance (primaire ou secondaire), alors que l'apparition des mutations de **BCR-ABL** est plus fréquente en cas de résistance secondaire. Nous pouvons

supposer que les mécanismes d'émergence des mutations ne peuvent pas être explorés par la technique de CGH-array. Dans notre étude, les CNAs détectés par CGH, résulteraient d'une réparation infidèle des DSBs par les systèmes HRR et NHEJ induite par l'activité TK constitutive de **BCR-ABL** ¹⁸⁸. En revanche le modèle mutateur induit par **BCR-ABL** est probablement dû à une inactivation des systèmes de réparation fidèle (BER et MMR) ¹⁹⁰. Cependant, notre groupe de patients n'est pas assez large pour affirmer cette observation et elle doit être évaluée sur une cohorte plus importante.

Notre analyse a aussi permis de détecter des anomalies génétiques acquises au sein des régions CNV. Dans notre étude, nous avons détaillé ces régions afin de mettre en évidence un rôle éventuel des CNV dans le développement de LMC, car elles peuvent, par exemple influencer le niveau d'expression de gènes directement, ou indirectement par des effets de position chromosomiques ²⁷⁹. Ces régions peuvent également représenter des régions sensibles aux remaniements chromosomiques. Il est en effet intéressant de noter que les 2 régions impliquées dans la genèse du chromosome Ph sont situées dans des régions déjà décrites pour être hypervariables, suggérant un "hot spot" pour les aberrations génomiques. En ce qui concerne la progression de la LMC, nous avons trouvé dans notre étude plusieurs CNA/CNV incluant des gènes déjà décrits pour être impliqués dans le cancer, tels que *ABL*, *BCR*, *EGFR*, *STK11* et *GSTT1/2*. De même, le gain en nombre de copies du gène *PRAME* en 22q11 est observé chez les patients avec double chromosome Ph. Ce gène code pour une protéine nucléaire agissant comme un répresseur dominant de la signalisation du récepteur de l'acide rétinoïque (RAR). *PRAME* a été récemment trouvé surexprimée dans les phases avancées de LMC et son expression forcée inhibe la différenciation, l'arrêt de la croissance et l'apoptose induit par RAR ^{280,281}.

De plus, nous avons identifié, pour la première fois, une anomalie acquise récurrente commune aux cellules CD34⁺ Ph⁺ et Ph⁻ dans une région hypervariable du chromosome 8 qui regroupe les gènes du cluster de la Défensine B (8p23.1) ²⁸². Ce microremaniement n'est pas lié à la résistance à l'Imatinib car l'exclusion de cette anomalie de notre analyse statistique a permis de montrer des liens significatifs entre le nombre de CNA et la présence de **BCR-ABL** ou la phase de la maladie, mais il peut

en revanche être considéré comme un marqueur de l'instabilité des cellules CD34⁺. En effet, malgré l'absence de la clonalité des cellules CD34⁺ chez les patients répondeurs, ce CNA en 8p23.1 pourrait identifier une sous population clonale de cellules présentant une plus grande prédisposition que les cellules T à acquérir des altérations génétiques additionnelles. Et l'on peut se demander si une telle prédisposition à l'instabilité ne serait pas un évènement précurseur de l'acquisition de la fusion *BCR-ABL*. Zaccaria *et al* ont en effet récemment rapporté des données cytogénétiques de cinq patients de LMC qui présentaient au moment de leur diagnostic des anomalies cytogénétiques supplémentaires dans les cellules Ph⁺. Après traitement avec l'Imatinib, ces cinq patients ont obtenu une rémission cytogénétique complète mais présentant la persistance de ces anomalies additionnelles (évolution clonale Ph⁻)²⁸³. Ces observations peuvent témoigner que, au moins chez ces patients, la translocation Ph doit avoir été acquise secondairement au sein d'un sous-clone présentant une anomalie chromosomique, laquelle pouvant être considérée comme le résultat d'une instabilité génétique pré-existante. Cependant, cette hypothèse doit être confirmée par l'analyse en CGH des cellules CD34⁺ de donneurs sains, par exemple. Dans l'avenir, nous pensons que l'étude du rôle de ces CNAs spécifiquement acquis dans les régions CNVs au sein des cellules souches pourrait être d'une grande importance dans la compréhension des mécanismes de la leucémogénèse.

Notre étude montre l'importance de l'utilisation de la CGH-array dans la caractérisation des altérations génétiques et l'analyse de leurs conséquences sur la genèse de LMC et la progression de la maladie. Nous avons aussi mis en évidence que ces altérations acquises secondairement pourraient être le support d'une résistance à l'Imatinib. Cette résistance peut être liée à la dérégulation des voies de signalisation en amont ou en aval de *BCR-ABL*. Plusieurs études ont démontré un lien entre l'instabilité génomique et l'activation constitutive des voies Ras et PI3K. Trois mécanismes sont impliqués: l'augmentation des ROS comme une conséquence de la prolifération, la dérégulation de la réparation de l'ADN par des mécanismes encore mal connus et l'inhibition de l'apoptose qui permet l'accumulation d'anomalies génétiques⁷⁶. Rassool *et al.* ont récemment montré, dans un modèle

murin transgénique de leucémie myéloïde, que la voie Ras/ERK/Rac est impliquée dans la production accrue de ROS aboutissant ainsi à l'instabilité génomique et la progression de la maladie ²⁸⁴. Dans notre étude de CGH, deux patients résistants aux ITKs en phase avancée ont eu un gain dans le gène *Vav2* (9q34) qui code une protéine induisant l'activation de la voie Ras/ERK/Rac, pouvant suggérer un rôle de cette voie dans la propagation de l'instabilité génomique, la progression de LMC et la résistance à l'Imatinib ²⁸⁵. De plus, l'association de l'Imatinib aux inhibiteurs de la voie Ras a montré une certaine efficacité dans la restauration de son activité proapoptotique ^{263,265}. Pour cette raison, nous nous sommes intéressés à chercher une cible thérapeutique régulant négativement cette voie afin de freiner la progression de la maladie et surmonter la résistance à l'Imatinib.

Dans ce contexte, notre laboratoire a développé un modèle murin de LMC, appelé DA1-3b/M0 (M0) qui possède les caractères moléculaires et pathologiques de LMC sensible aux ITKs. A partir de ce modèle, nous avons récemment isolé et caractérisé des clones de LMC résistants aux effets proapoptotiques de l'Imatinib et d'autres inhibiteurs de **BCR-ABL** ⁹⁵. La longue exposition de cellules M0 d'abord aux doses progressivement augmentées d'Imatinib, et ensuite au Dasatinib, a résulté d'abord à une lignée résistante à l'Imatinib (DA1-3b/M1(M1)) et ensuite à une lignée résistante à l'Imatinib et au Dasatinib (DA1-3b/M2 - (M2)). La résistance à l'Imatinib dans la lignée M1 est due à la mutation E255K, et la résistance au Dasatinib dans la lignée M2 est due à une mutation supplémentaire T315I. Dans le même modèle, nous avons précédemment décrit une lignée de cellules dormantes (DA1-3b/d365 - (d365)) qui a persisté pendant un an chez la souris sans causer de symptômes et a développé une résistance à l'Imatinib indépendante de **BCR-ABL** ⁹⁸. Une étude de transcriptome sur les cellules dormantes (DA1-3b/d365) a révélé une diminution de l'expression de gène *GILZ* (Glucocorticoid-Induce Leucine Zipper). Ce gène code pour une protéine appartenant à la famille des leucines zippers qui sont le plus souvent des facteurs de transcription ²⁸⁶. *GILZ* inhibe la voie Ras/Raf, NFκB et AP1 par une interaction directe ²⁸⁷⁻²⁹¹. Elle peut être induite par les glucocorticoïdes (GC), Sonic Hedgehog et FoxO3a ²⁹²⁻²⁹⁴. Elle a été largement étudiée dans les cellules T, où

les deux fonctions pro- et anti-apoptotiques ont été rapportées ²⁹⁴⁻²⁹⁶. Cependant, son rôle dans la LMC n'a jamais encore été étudié.

Dans notre modèle murin de LMC, nous avons constaté que l'expression protéique de GILZ a été considérablement diminuée dans les cellules transformées par **BCR-ABL** et en particulier dans les cellules résistantes à l'Imatinib ou dans les cellules dormantes. Des travaux complémentaires nous a permis de montrer que la diminution de l'expression de GILZ n'est pas due à l'activité TK de **BCR-ABL** ou à l'activité du protéasome. Par une technique de RT-PCR nous avons aussi démontré la présence de l'ARN messenger de GILZ dans les lignées M0 et M1, suggérant que la régulation de l'expression de GILZ pourrait être dépendente des mécanismes interférant avec la stabilité de l'ARN messenger. Cependant, ce dernier résultat doit être confirmé par une étude de PCR quantitative (QR-PCR) sur nos lignées murine, humaine et sur des échantillons des patients résistants ou répondeurs aux ITKs. Des travaux sont aussi en cours pour étudier le rôle des mécanismes épigénétiques dans l'expression de GILZ chez les patients atteints de LMC et d'autres types de leucémies.

En rétablissant l'expression de GILZ dans les lignées résistantes et dormantes, nous avons pu restaurer la sensibilité à l'Imatinib. Ces résultats ont été confirmés dans un modèle humain de résistance à l'Imatinib indépendante de **BCR-ABL** (K562-r), indiquant que GILZ pourrait induire l'apoptose, même lorsque **BCR-ABL** reste pleinement active. En effet, GILZ a augmenté l'expression de *Bim* et a diminué l'expression de *Bcl-2* dans les deux modèles de résistance, murin et humain. Dans un modèle de cellules T, Labat *et al* ont montré un effet opposé de GILZ sur l'expression de *Bim* par une régulation négative de FoxO3a ²⁹⁴. En revanche, dans un modèle murin transgénique, Delfino *et al* ont montré que GILZ induit l'apoptose de thymocytes en diminuant l'expression de *Bcl-xL* ²⁹⁵. Ces travaux et le nôtre montrent que l'effet de GILZ sur la famille de *Bcl-2* dépend de modèle cellulaire et des conditions expérimentales. Dans notre modèle de **BCR-ABL**⁺, nous avons montré, pour la première fois, que GILZ a une régulation positive sur l'expression de *Bim*. *Bim* joue un rôle crucial dans la mort cellulaire induite par l'Imatinib ²⁹⁷. Elle appartient à la famille pro-apoptotique de *Bcl-2* qui contient uniquement une région

BH3 et antagoniste les protéines anti-apoptotiques de Bcl-2. Les médicaments mimant l'effet de *Bim* déclenchent l'apoptose médiée par les protéines Bax/Bak et pourraient surmonter la chimiorésistance en se liant étroitement aux protéines anti-apoptotiques de Bcl-2 ²⁹⁸. Le traitement par l'Imatinib dans les cellules surexprimant GILZ a diminué l'expression de Mcl-1 inversant ainsi le rapport des membres antiapoptotiques/proapoptotiques de la famille Bcl-2 et entraînant l'apoptose. En revanche, dans les cellules résistantes transfectées par le plasmide vide, les effets "Off-target" de l'Imatinib sont insuffisants pour provoquer l'apoptose, sans doute parce que la signalisation de **BCR-ABL** muté via CRKL et STAT5 est restée intacte. Toutefois, si cette voie de signalisation est bloquée, les effets "Off-target", par l'intermédiaire de c-KIT ou NQO2, par exemple, deviennent visibles et effectifs ^{156,157,160}. Nos données suggèrent que la surexpression de GILZ sensibilise les cellules résistantes aux ITKs aux effets "Off-target" de l'Imatinib mais pas du Dasatinib. Nous suggérons aussi que GILZ pourrait, par un effet direct ou indirect, faire interagir l'Imatinib avec des nouvelles cibles qui ne sont pas encore identifiées. Une étude par chromatographie d'affinité analysant les interactions Imatinib/Protéines sur les cellules surexprimant GILZ devrait répondre à cette hypothèse. Par ailleurs, l'apoptose induite par la Staurosporine, un inhibiteur de kinase à spectre large, et GILZ dans les cellules résistantes à l'Imatinib ou Dasatinib indique que d'autres voies pas inhibée par l'Imatinib pourraient également être en synergie avec GILZ. Ainsi, GILZ est un régulateur principal de l'apoptose dans les cellules **BCR-ABL**⁺.

GILZ possède de multiples fonctions en inhibant les voies Ras/Raf, NFκB et AP1. Notre étude montre, pour la première fois, que en plus de ses effets signalés précédemment, GILZ peut inhiber l'activité de la voie mTORC2/Akt^{Ser473} dans les cellules **BCR-ABL**⁺. En revanche, dans les cellules DA1 dépourvues de **BCR-ABL**, GILZ conserve une activité inhibitrice de la voie MEK/ERK comme déjà décrit par le groupe de Riccardi dans d'autres types cellulaires **BCR-ABL**⁻ ²⁸⁸. Par conséquent, la phosphorylation de FoxO3a (Ser253 et Thr32) et sa cible transcriptionnelle Bim, qui implique la voie Akt^{Ser473} et pas la voie ERK, ne sont pas été modifiées. Cependant, dans les cellules **BCR-ABL**⁺, GILZ inhibe la voie Akt^{Ser473}, mais pas la voie ERK, entraînant alors l'augmentation de l'expression transcriptionnelle et protéique de

Bim. Ayroldi *et al* ont récemment démontré que GILZ peut former un complexe avec Ras et Raf dont la formation dépend de l'état d'activation de Ras ²⁸⁸. Dans ce contexte, GILZ est plus abondante dans la configuration trimerique quand Ras est moins activée. Nous pouvons donc supposer que, dans les cellules **BCR-ABL**⁺, l'état constitutivement actif de Ras diminue l'affinité de GILZ pour Ras et favorise la formation du dimère Ras/Raf par rapport au trimère Ras/Raf/GILZ qui est probablement nécessaire pour l'inhibition de la voie ERK.

La protéine mTOR est une composante de la voie PTEN/PI3K/Akt qui est fréquemment dérégulée dans les cancers ⁵⁵. mTOR forme deux complexes exclusifs nommé mTORC1 et mTORC2. mTORC1 comprend mTOR, mLST8 et Raptor ; et mTORC2 comprend mTOR, mLST8, Rictor, mSin1 et Hsp70 ^{56,299}. Il a été récemment montré que le complexe TSC1/TSC2, qui inactive la voie mTORC1, est nécessaire pour l'activation de mTORC2 par une interaction directe ³⁰⁰. Dans le complexe mTORC2, l'absence de Rictor et mSin1 n'a aucun effet sur la phosphorylation de molécules en aval d'Akt, tels que GSK3, TSC2 et S6K, mais affecte la phosphorylation des FoxO1 et FoxO3a dont l'inhibition cause la mort de cellules leucémiques de LMC ^{58,60,80,301}. mTORC2 phosphoryle Akt directement sur la sérine 473, l'un des deux sites nécessaires à l'activation complète d'Akt en réponse aux facteurs de croissance. Cette constatation rend mTORC2 une cible thérapeutique potentielle dans la LMC résistant aux ITKs. Nous avons démontré, pour la première fois, que GILZ inhibe les fonctions de la voie mTORC2/Akt^{Ser473}, y compris la phosphorylation de FoxO3a et la répression de Bim, tout en laissant la voie mTORC1 inchangée. Nous avons montré, par la technique de l'immunoprécipitation, que GILZ inhibe mTORC2 par une interaction protéine-protéine. En utilisant le système de double hybride adapté aux cellules de mammifère, nous avons pu exclure l'interaction directe entre la protéine GILZ et la protéine Rictor, suggérant que l'interaction de GILZ au complexe mTORC2 implique d'autres composants de ce dernier tel que mSin1, Hsp70 ou le complexe TSC1/TSC2. Des travaux de mutagenèse sont également en cours pour déterminer quel domaine de GILZ est impliqué dans cette interaction.

Un résultat notable dans notre étude, c'est que l'interaction mTORC2-GILZ pourrait affecter la leucémogénèse. Nos expériences *in vitro*, indiquent que la

surexpression de GILZ restaure l'activité apoptotique de l'Imatinib sur les lignées résistantes. D'autre part, nos expériences *in vivo* sur les cellules M1 transfectées par GILZ ou le plasmide vide ont révélé que GILZ seul est capable d'induire un effet anti-leucémogène majeur qui était légèrement améliorée par le traitement par l'Imatinib. Ces résultats ressemblent à ceux obtenus par Ayroldi *et al* dans lesquels GILZ inhibe la transformation cellulaire et la tumorigenèse médiée par la protéine Ras ²⁸⁸. Cependant, des résultats complémentaires non publiés ont montré que le traitement combiné de l'Imatinib avec l'Everolimus, un inhibiteur de mTORC2, sur les cellules résistantes n'a pas produit les mêmes effets observés en surexprimant GILZ, suggérant que d'autres mécanismes sont aussi impliqués dans l'action de GILZ. Une étude utilisant l'immunoprécipitation de chromatine (CHIP) a démontré que GILZ fonctionne comme un répresseur transcriptionnel en liant au site de C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein) dans le promoteur du gène PPAR- γ 2 (Peroxisome-Proliferator-Activated Receptor- γ 2). La même étude a aussi démontré l'interaction entre GILZ et l'histone déacetylase 1 (HDAC1), ajoutant ainsi un autre élément de complexité au système ³⁰². Il semble donc que GILZ pourrait être impliquée dans des nombreuses interactions protéines/protéines, régulant ainsi des voies de signalisations et de transcriptions. Nous pouvons imaginer que GILZ, par sa structure de leucine zipper, pourrait changer le profil transcriptionnel par un effet direct ou indirect en interagissant avec des facteurs de transcription. Pour répondre à cette question deux approches ont été faites : une étude de transcriptome afin de regarder tous les gènes et les voies qui ont été dérégulés par GILZ, et une étude de double hybride dans la levure pour déterminer toutes les interactions potentielles de GILZ. Nos résultats préliminaires montrent que GILZ diminue fortement l'expression d'un gène impliqué dans la stabilité des ARN messagers de certaines cytokines dont le niveau d'expression a été validé par une puce à cytokines. De plus, les résultats de double hybride ont montré une nouvelle interaction entre GILZ et un facteur de transcription impliqué dans le développement de la leucémie. Des travaux sont actuellement en cours pour valider ces résultats et déterminer son implication dans le rôle transcriptionnel de GILZ. En outre, l'action anti-tumorale de GILZ *in vivo* sur les cellules résistantes à l'Imatinib ou Dasatinib suggère que l'augmentation de

l'expression de GILZ par des médicaments pourrait être utile pour traiter la maladie résistante.

Comme GILZ est induite par les glucocorticoïdes, nous les avons utilisés afin d'induire son expression dans nos lignées résistantes aux ITKs et ainsi dans les cellules CD34⁺ de patients résistants. Le traitement séquentiel par la Dexaméthasone puis par l'Imatinib a entraîné l'apoptose par le même mécanisme identifié dans le modèle murin. Bien que nous ne puissions pas tuer toutes les cellules comme nous l'avons fait à l'aide de la transformation par le plasmide GILZ, cette stratégie a induit l'apoptose dans les cellules de plusieurs types de résistance à l'Imatinib, dont la mutation T315I qui rend également les cellules résistantes au Dasatinib. Nos résultats indiquent également que la résistance aux ITKs de seconde génération pourrait encore être surmontée par l'Imatinib si GILZ peut être utilisé pour inhiber la voie mTORC2/Akt/FoxO3a/Bim. Dans le myélome multiple, l'apoptose induite par les glucocorticoïdes a été récemment démontrée être dépendante de GILZ, suggérant que le ciblage de GILZ pourrait avoir une large utilisation clinique. Dans les hémopathies myéloïdes, l'effet limité des glucocorticoïdes sur l'expression de GILZ ne serait probablement pas assez puissant pour obtenir d'importants résultats cliniques. Toutefois, de nouveaux médicaments augmentant l'expression de GILZ ou mimant l'interaction GILZ/mTORC2 devraient être explorés.

Il semble que la régulation négative de la voie mTORC2/Akt^{Ser473} pourrait participer à surmonter la résistance aux ITKs. Pour cette raison nous avons étudié l'effet de la phosphatase PHLPP sur la résistance à l'Imatinib. Cette protéine est la seule phosphatase du génome humain à posséder un domaine PH. Elle déphosphoryle la sérine 473 d'Akt et n'a que peu d'effet sur la phosphorylation de sa thréonine 308^{86,303,304}. Il a été récemment montré que l'expression de variants 1 et 2 de PHLPP est réduite dans les cellules **BCR-ABL**⁺ et que l'inhibition de **BCR-ABL** par un ITK ou siRNA conduit à la réexpression de PHLPP entraînant ainsi l'inhibition de la prolifération et la diminution de la formation de colonies de cellules progénitrices **BCR-ABL**⁺²⁷⁵. Nous avons montré que l'expression de PHLPP1 a été complètement éteinte dans la lignée résistante à l'Imatinib DA-3b/M1 (M1), et ainsi dans d'autres lignées cellulaires **BCR-ABL**⁺. La réexpression de PHLPP1 dans cette lignée restaure

la sensibilité à l'Imatinib. L'analyse par Western Blot a révélé que la sérine 473 d'Akt a été déphosphorylée dans les cellules transfectées par PHLPP1 et que l'expression de Bim a été augmentée. Concordant avec nos résultats précédents, le traitement combiné de l'Imatinib avec l'Everolimus, un inhibiteur de mTORC2, a restauré partiellement la sensibilité à l'Imatinib dans les cellules résistantes M1. Il semble donc que l'inactivation de PHLPP1, comme la répression de GILZ, pourrait contribuer à la résistance aux ITKs par une autre voie que mTORC2. La PHLPP déphosphoryle le motif hydrophobe de PKC (Protein Kinase C) entraînant ainsi sa dégradation ³⁰⁵. L'augmentation de PHLPP aboutit alors à une diminution de PKC dont l'activité a été rapportée d'être impliquée dans la résistance des cellules **BCR-ABL**⁺ à l'apoptose induite par le Taxol, un poison du fuseau ³⁰⁶. Nous pouvons suggérer que l'inactivation de la voie PKC par PHLPP1 pourrait participer à son rôle surmontant la résistance à l'Imatinib.

Si PHLPP1 contribue à la prolifération et à la résistance aux ITKs dans les cellules de LMC, il devrait être inactivé au moins chez certains patients atteints de la maladie. Dans la lignée murine M1, la protéine PHLPP1 n'est pas exprimée et son promoteur, qui comprend une grande région riche en GC, n'est pas méthylée lorsqu'il est analysé par la technique de MSP. Cela confirme les données antérieures montrant que l'activité TK de **BCR-ABL** réprime elle-même l'expression de PHLPP. Une étude récente a montré une dégradation de PHLPP dépendante de son état de phosphorylation et d'un système d'ubiquitination ³⁰⁷. Nous pouvons supposer que dans le modèle murin ce mécanisme est le responsable de la répression de PHLPP. Des travaux sont en cours pour étudier cette piste. Toutefois, nous avons détecté une méthylation du promoteur de gène PHLPP1 dans les cellules CD34⁺ de patients atteints de LMC et résistants à l'Imatinib. En revanche, aucune méthylation n'a été détectée chez les patients répondeurs à l'Imatinib. Bien qu'il ne soit pas possible d'évaluer la fréquence de méthylation de PHLPP1 dans ce petit groupe de patients, il indique, pour la première fois, que la répression d'expression de PHLPP1 n'est pas exclusivement due à l'activité TK de **BCR-ABL**, mais aussi aux modifications épigénétiques. On pourrait suggérer qu'à long terme, la répression continue d'expression de PHLPP1 par l'activité TK de **BCR-ABL** conduirait à une répression

permanente par la méthylation du promoteur, mais cela doit être exploré dans d'autres expériences.

Ce travail a permis de montrer que la méthylation de gène PHLPP1 peut participer à l'évolution de la maladie et la résistance au traitement ciblé. Il est donc possible que la différence de réponse aux traitements soit liée à des modifications épigénétiques qui sont potentiellement plus dommageables que les mutations au niveau des nucléotides, car leurs effets sur la structure de la chromatine du secteur peuvent se propager, ce qui affecte de multiples *loci* génétiques. Ces altérations pourraient concerner le contrôle du cycle cellulaire, la mort cellulaire, le métabolisme et la survenue de résistance à ces mêmes médicaments. L'analyse du méthylome dans un modèle de LMC nous permettra donc une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires responsables de la survenue de la LMC et peut-être la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques. Pour cette raison, nous avons traité nos lignées cellulaires murines résistantes aux ITKs avec du 5-Aza-2'-deoxycytidine (Decitabine), un agent déméthylant de l'ADN. Le profil d'expression génique des lignées cellulaires a été étudié par puces transcriptomiques. Les gènes, dont le niveau d'expression a été largement augmenté, ont été analysés pour déterminer le contenu de leur promoteur en îlots CpG puis séquencés pour confirmer la présence de cytosines méthylées. Deux nouveaux gènes ont été complètement méthylés dans nos lignées et ainsi dans la plupart des cellules CD34⁺ de patients résistants analysées par la technique de pyroséquenceur. Des travaux sont en cours afin de préciser leur rôle dans le processus de la leucémogénèse de LMC.

En conclusion notre travail de thèse a permis de montrer le rôle prépondérant joué par des modifications génétique et épigénétiques dans la progression de la maladie et le déclenchement de la résistance aux ITKs. Nous avons aussi montré que la protéine GILZ peut être considérée comme une cible thérapeutique de choix de part son rôle de régulateur négatif du pouvoir oncogénique de **BCR-ABL**.

CHAPITRE V

Bibliographie

- 1 Hanahan, D. & Weinberg, R.A., The hallmarks of cancer. *Cell* 100 (1), 57-70 (2000).
- 2 Angeli, F., Koumakis, G., Chen, M.C., Kumar, S., & Delinassios, J.G., Role of stromal fibroblasts in cancer: promoting or impeding? *Tumour Biol* 30 (3), 109-120 (2009).
- 3 Sund, M. & Kalluri, R., Tumor stroma derived biomarkers in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 28 (1-2), 177-183 (2009).
- 4 Colditz, G.A., Sellers, T.A., & Trapido, E., Epidemiology - identifying the causes and preventability of cancer? *Nat Rev Cancer* 6 (1), 75-83 (2006).
- 5 Iwasaki, H. & Suda, T., Cancer stem cells and their niche. *Cancer Sci* 100 (7), 1166-1172 (2009).
- 6 Mittal, S., Mifflin, R., & Powell, D.W., Cancer stem cells: the other face of Janus. *Am J Med Sci* 338 (2), 107-112 (2009).
- 7 Gangemi, R. *et al.*, Cancer stem cells: a new paradigm for understanding tumor growth and progression and drug resistance. *Curr Med Chem* 16 (14), 1688-1703 (2009).
- 8 Vardiman, J.W. *et al.*, The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114 (5), 937-951 (2009).
- 9 Burke, V.P. & Startzell, J.M., The leukemias. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 20 (4), 597-608 (2008).
- 10 Ansari, M. & Krajinovic, M., Pharmacogenomics of acute leukemia. *Pharmacogenomics* 8 (7), 817-834 (2007).
- 11 Heerema-McKenney, A. & Arber, D.A., Acute myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 23 (4), 633-654 (2009).
- 12 Ravandi, F. & O'Brien, S., Chronic lymphoid leukemias other than chronic lymphocytic leukemia: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 80 (12), 1660-1674 (2005).
- 13 Tefferi, A. & Vardiman, J.W., Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 22 (1), 14-22 (2008).

BIBLIOGRAPHIE

- 14 Faderl, S. *et al.*, The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 341 (3), 164-172 (1999).
- 15 Deininger, M.W., Goldman, J.M., & Melo, J.V., The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 96 (10), 3343-3356 (2000).
- 16 Wong, S. & Witte, O.N., The BCR-ABL story: bench to bedside and back. *Annu Rev Immunol* 22, 247-306 (2004).
- 17 Nowell, P.C., Discovery of the Philadelphia chromosome: a personal perspective. *J Clin Invest* 117 (8), 2033-2035 (2007).
- 18 Calabretta, B. & Perrotti, D., The biology of CML blast crisis. *Blood* 103 (11), 4010-4022 (2004).
- 19 Melo, J.V. & Barnes, D.J., Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat Rev Cancer* 7 (6), 441-453 (2007).
- 20 Radich, J.P., The Biology of CML blast crisis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 384-391 (2007).
- 21 Vardiman, J.W., Chronic myelogenous leukemia, BCR-ABL1+. *Am J Clin Pathol* 132 (2), 250-260 (2009).
- 22 Bartram, C.R. *et al.*, Translocation of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 306 (5940), 277-280 (1983).
- 23 Heisterkamp, N. *et al.*, Localization of the c-ab1 oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* 306 (5940), 239-242 (1983).
- 24 Groffen, J. *et al.*, Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* 36 (1), 93-99 (1984).
- 25 Van Etten, R.A., Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends Cell Biol* 9 (5), 179-186 (1999).
- 26 Taagepera, S. *et al.*, Nuclear-cytoplasmic shuttling of C-ABL tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (13), 7457-7462 (1998).
- 27 Hantschel, O. *et al.*, A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl. *Cell* 112 (6), 845-857 (2003).
- 28 Nagar, B. *et al.*, Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell* 112 (6), 859-871 (2003).
- 29 Wang, J.Y., Abl tyrosine kinase in signal transduction and cell-cycle regulation. *Curr Opin Genet Dev* 3 (1), 35-43 (1993).

BIBLIOGRAPHIE

- 30 Zhu, J. & Shore, S.K., c-ABL tyrosine kinase activity is regulated by association with a novel SH3-domain-binding protein. *Mol Cell Biol* 16 (12), 7054-7062 (1996).
- 31 Hantschel, O. & Superti-Furga, G., Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5 (1), 33-44 (2004).
- 32 Wang, J.Y., Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase. *Oncogene* 19 (49), 5643-5650 (2000).
- 33 Sawyers, C.L., McLaughlin, J., Goga, A., Havlik, M., & Witte, O., The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. *Cell* 77 (1), 121-131 (1994).
- 34 Yuan, Z.M. *et al.*, p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature* 399 (6738), 814-817 (1999).
- 35 Wetzler, M. *et al.*, Subcellular localization of Bcr, Abl, and Bcr-Abl proteins in normal and leukemic cells and correlation of expression with myeloid differentiation. *J Clin Invest* 92 (4), 1925-1939 (1993).
- 36 Wetzler, M. *et al.*, Cell cycle-related shifts in subcellular localization of BCR: association with mitotic chromosomes and with heterochromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (8), 3488-3492 (1995).
- 37 McWhirter, J.R., Galasso, D.L., & Wang, J.Y., A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol Cell Biol* 13 (12), 7587-7595 (1993).
- 38 Sawyers, C.L., McLaughlin, J., & Witte, O.N., Genetic requirement for Ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the Bcr-Abl oncogene. *J Exp Med* 181 (1), 307-313 (1995).
- 39 Goldman, J.M. & Melo, J.V., Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med* 349 (15), 1451-1464 (2003).
- 40 Marley, S.B. & Gordon, M.Y., Chronic myeloid leukaemia: stem cell derived but progenitor cell driven. *Clin Sci (Lond)* 109 (1), 13-25 (2005).
- 41 Pendergast, A.M. *et al.*, BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* 75 (1), 175-185 (1993).
- 42 Skorski, T. *et al.*, Negative regulation of p120GAP GTPase promoting activity by p210bcr/abl: implication for RAS-dependent Philadelphia chromosome positive cell growth. *J Exp Med* 179 (6), 1855-1865 (1994).
- 43 Puil, L. *et al.*, Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *EMBO J* 13 (4), 764-773 (1994).

BIBLIOGRAPHIE

- 44 Steelman, L.S. *et al.*, JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* 18 (2), 189-218 (2004).
- 45 Raitano, A.B., Halpern, J.R., Hambuch, T.M., & Sawyers, C.L., The Bcr-Abl leukemia oncogene activates Jun kinase and requires Jun for transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (25), 11746-11750 (1995).
- 46 Pages, G. *et al.*, Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (18), 8319-8323 (1993).
- 47 Lavoie, J.N., L'Allemain, G., Brunet, A., Muller, R., & Pouyssegur, J., Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem* 271 (34), 20608-20616 (1996).
- 48 Kaufmann, S.H. & Hengartner, M.O., Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol* 11 (12), 526-534 (2001).
- 49 Kim, H. *et al.*, Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol* 8 (12), 1348-1358 (2006).
- 50 Ow, Y.P., Green, D.R., Hao, Z., & Mak, T.W., Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (7), 532-542 (2008).
- 51 Balmano, K. & Cook, S.J., Tumour cell survival signalling by the ERK1/2 pathway. *Cell Death Differ* 16 (3), 368-377 (2009).
- 52 Sattler, M. *et al.*, The proto-oncogene product p120CBL and the adaptor proteins CRKL and c-CRK link c-ABL, p190BCR/ABL and p210BCR/ABL to the phosphatidylinositol-3' kinase pathway. *Oncogene* 12 (4), 839-846 (1996).
- 53 Skorski, T. *et al.*, Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. *Blood* 86 (2), 726-736 (1995).
- 54 Calabretta, B. & Skorski, T., BCR/ABL regulation of PI-3 kinase activity. *Leuk Lymphoma* 23 (5-6), 473-476 (1996).
- 55 Sabatini, D.M., mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer* 6 (9), 729-734 (2006).
- 56 Guertin, D.A. & Sabatini, D.M., Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* 12 (1), 9-22 (2007).
- 57 Sarbassov, D.D. *et al.*, Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* 14 (14), 1296-1302 (2004).

BIBLIOGRAPHIE

- 58 Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., & Sabatini, D.M., Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307 (5712), 1098-1101 (2005).
- 59 Yang, Q., Inoki, K., Ikenoue, T., & Guan, K.L., Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity. *Genes Dev* 20 (20), 2820-2832 (2006).
- 60 Frias, M.A. *et al.*, mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol* 16 (18), 1865-1870 (2006).
- 61 Kim, D.H. *et al.*, mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110 (2), 163-175 (2002).
- 62 Yonezawa, K., Tokunaga, C., Oshiro, N., & Yoshino, K., Raptor, a binding partner of target of rapamycin. *Biochem Biophys Res Commun* 313 (2), 437-441 (2004).
- 63 Hara, K. *et al.*, Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110 (2), 177-189 (2002).
- 64 Kim, D.H. *et al.*, GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell* 11 (4), 895-904 (2003).
- 65 Vander Haar, E., Lee, S.I., Bandhakavi, S., Griffin, T.J., & Kim, D.H., Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol* 9 (3), 316-323 (2007).
- 66 Wang, L., Harris, T.E., Roth, R.A., & Lawrence, J.C., Jr., PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *J Biol Chem* 282 (27), 20036-20044 (2007).
- 67 Wang, L., Harris, T.E., & Lawrence, J.C., Jr., Regulation of proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40) function by mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1)-mediated phosphorylation. *J Biol Chem* 283 (23), 15619-15627 (2008).
- 68 Averous, J. & Proud, C.G., When translation meets transformation: the mTOR story. *Oncogene* 25 (48), 6423-6435 (2006).
- 69 Bjornsti, M.A. & Houghton, P.J., The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4 (5), 335-348 (2004).
- 70 Inoki, K., Corradetti, M.N., & Guan, K.L., Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease. *Nat Genet* 37 (1), 19-24 (2005).
- 71 Hay, N. & Sonenberg, N., Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 18 (16), 1926-1945 (2004).

BIBLIOGRAPHIE

- 72 Lynch, M., Fitzgerald, C., Johnston, K.A., Wang, S., & Schmidt, E.V., Activated eIF4E-binding protein slows G1 progression and blocks transformation by c-myc without inhibiting cell growth. *J Biol Chem* 279 (5), 3327-3339 (2004).
- 73 Meyuhas, O., Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *Eur J Biochem* 267 (21), 6321-6330 (2000).
- 74 Pende, M. *et al.*, S6K1(-/-)/S6K2(-/-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. *Mol Cell Biol* 24 (8), 3112-3124 (2004).
- 75 Kim, J.H. *et al.*, Activation of the PI3K/mTOR pathway by BCR-ABL contributes to increased production of reactive oxygen species. *Blood* 105 (4), 1717-1723 (2005).
- 76 Sallmyr, A., Fan, J., & Rassool, F.V., Genomic instability in myeloid malignancies: increased reactive oxygen species (ROS), DNA double strand breaks (DSBs) and error-prone repair. *Cancer Lett* 270 (1), 1-9 (2008).
- 77 Datta, S.R. *et al.*, Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91 (2), 231-241 (1997).
- 78 Burgering, B.M. & Medema, R.H., Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty. *J Leukoc Biol* 73 (6), 689-701 (2003).
- 79 Huang, H. & Tindall, D.J., Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci* 120 (Pt 15), 2479-2487 (2007).
- 80 Hietakangas, V. & Cohen, S.M., Re-evaluating AKT regulation: role of TOR complex 2 in tissue growth. *Genes Dev* 21 (6), 632-637 (2007).
- 81 Oren, M., Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* 10 (4), 431-442 (2003).
- 82 Cantley, L.C. & Neel, B.G., New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (8), 4240-4245 (1999).
- 83 Eichhorn, P.J., Creighton, M.P., & Bernards, R., Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1795 (1), 1-15 (2009).
- 84 Neviani, P. *et al.*, The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein. *Cancer Cell* 8 (5), 355-368 (2005).

BIBLIOGRAPHIE

- 85 Neviani, P. *et al.*, FTY720, a new alternative for treating blast crisis chronic myelogenous leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia. *J Clin Invest* 117 (9), 2408-2421 (2007).
- 86 Gao, T., Furnari, F., & Newton, A.C., PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell* 18 (1), 13-24 (2005).
- 87 Darnell, J.E., Jr., Kerr, I.M., & Stark, G.R., Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264 (5164), 1415-1421 (1994).
- 88 Leonard, W.J. & O'Shea, J.J., Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 16, 293-322 (1998).
- 89 Xie, S. *et al.*, Involvement of Jak2 tyrosine phosphorylation in Bcr-Abl transformation. *Oncogene* 20 (43), 6188-6195 (2001).
- 90 Xie, S., Lin, H., Sun, T., & Arlinghaus, R.B., Jak2 is involved in c-Myc induction by Bcr-Abl. *Oncogene* 21 (47), 7137-7146 (2002).
- 91 Coppo, P. *et al.*, BCR-ABL activates STAT3 via JAK and MEK pathways in human cells. *Br J Haematol* 134 (2), 171-179 (2006).
- 92 Kisseleva, T., Bhattacharya, S., Braunstein, J., & Schindler, C.W., Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 285 (1-2), 1-24 (2002).
- 93 Horita, M. *et al.*, Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. *J Exp Med* 191 (6), 977-984 (2000).
- 94 Wang, Y. *et al.*, Adaptive secretion of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) mediates imatinib and nilotinib resistance in BCR/ABL+ progenitors via JAK-2/STAT-5 pathway activation. *Blood* 109 (5), 2147-2155 (2007).
- 95 Liu, J. *et al.*, BCR-ABL mutants spread resistance to non-mutated cells through a paracrine mechanism. *Leukemia* 22 (4), 791-799 (2008).
- 96 Kile, B.T. & Alexander, W.S., The suppressors of cytokine signalling (SOCS). *Cell Mol Life Sci* 58 (11), 1627-1635 (2001).
- 97 De Sepulveda, P. *et al.*, Socs1 binds to multiple signalling proteins and suppresses steel factor-dependent proliferation. *EMBO J* 18 (4), 904-915 (1999).

BIBLIOGRAPHIE

- 98 Saudemont, A. *et al.*, Dormant tumor cells develop cross-resistance to apoptosis induced by CTLs or imatinib mesylate via methylation of suppressor of cytokine signaling 1. *Cancer Res* 67 (9), 4491-4498 (2007).
- 99 Thomas, E.K., Cancelas, J.A., Zheng, Y., & Williams, D.A., Rac GTPases as key regulators of p210-BCR-ABL-dependent leukemogenesis. *Leukemia* 22 (5), 898-904 (2008).
- 100 Gotoh, A. *et al.*, Tyrosine phosphorylation and activation of focal adhesion kinase (p125FAK) by BCR-ABL oncoprotein. *Exp Hematol* 23 (11), 1153-1159 (1995).
- 101 Le, Y. *et al.*, FAK silencing inhibits leukemogenesis in BCR/ABL-transformed hematopoietic cells. *Am J Hematol* 84 (5), 273-278 (2009).
- 102 Bazzoni, G., Carlesso, N., Griffin, J.D., & Hemler, M.E., Bcr/Abl expression stimulates integrin function in hematopoietic cell lines. *J Clin Invest* 98 (2), 521-528 (1996).
- 103 Bhatia, R., McCarthy, J.B., & Verfaillie, C.M., Interferon-alpha restores normal beta 1 integrin-mediated inhibition of hematopoietic progenitor proliferation by the marrow microenvironment in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 87 (9), 3883-3891 (1996).
- 104 Verfaillie, C.M., Bhatia, R., Browne, P., & Key, N.S., Interferon-alpha restores beta1-integrin-dependent, collagen-mediated platelet aggregation in a patient with chronic myelogenous leukemia. *J Lab Clin Med* 131 (2), 163-169 (1998).
- 105 Geay, J.F. *et al.*, p210BCR-ABL inhibits SDF-1 chemotactic response via alteration of CXCR4 signaling and down-regulation of CXCR4 expression. *Cancer Res* 65 (7), 2676-2683 (2005).
- 106 Chen, Y.Y., Malik, M., Tomkowicz, B.E., Collman, R.G., & Ptasznik, A., BCR-ABL1 alters SDF-1alpha-mediated adhesive responses through the beta2 integrin LFA-1 in leukemia cells. *Blood* 111 (10), 5182-5186 (2008).
- 107 Thomas, E.K. *et al.*, Rac guanosine triphosphatases represent integrating molecular therapeutic targets for BCR-ABL-induced myeloproliferative disease. *Cancer Cell* 12 (5), 467-478 (2007).
- 108 Hayden, M.S. & Ghosh, S., Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18 (18), 2195-2224 (2004).
- 109 Reuther, J.Y., Reuther, G.W., Cortez, D., Pendergast, A.M., & Baldwin, A.S., Jr., A requirement for NF-kappaB activation in Bcr-Abl-mediated transformation. *Genes Dev* 12 (7), 968-981 (1998).

BIBLIOGRAPHIE

- 110 Cilloni, D. *et al.*, The NF-kappaB pathway blockade by the IKK inhibitor PS1145 can overcome imatinib resistance. *Leukemia* 20 (1), 61-67 (2006).
- 111 Kantarjian, H.M. *et al.*, Chronic myelogenous leukemia in blast crisis. Analysis of 242 patients. *Am J Med* 83 (3), 445-454 (1987).
- 112 Majlis, A. *et al.*, Significance of cytogenetic clonal evolution in chronic myelogenous leukemia. *J Clin Oncol* 14 (1), 196-203 (1996).
- 113 Hoeijmakers, J.H., Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411 (6835), 366-374 (2001).
- 114 Bakkenist, C.J. & Kastan, M.B., DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421 (6922), 499-506 (2003).
- 115 Dierov, J., Dierova, R., & Carroll, M., BCR/ABL translocates to the nucleus and disrupts an ATR-dependent intra-S phase checkpoint. *Cancer Cell* 5 (3), 275-285 (2004).
- 116 Durocher, D. & Jackson, S.P., DNA-PK, ATM and ATR as sensors of DNA damage: variations on a theme? *Curr Opin Cell Biol* 13 (2), 225-231 (2001).
- 117 Deutsch, E. *et al.*, BCR-ABL down-regulates the DNA repair protein DNA-PKcs. *Blood* 97 (7), 2084-2090 (2001).
- 118 Deutsch, E. *et al.*, Down-regulation of BRCA1 in BCR-ABL-expressing hematopoietic cells. *Blood* 101 (11), 4583-4588 (2003).
- 119 Maru, Y., Kobayashi, T., Tanaka, K., & Shibuya, M., BCR binds to the xeroderma pigmentosum group B protein. *Biochem Biophys Res Commun* 260 (2), 309-312 (1999).
- 120 Canitrot, Y. *et al.*, p210 BCR/ABL kinase regulates nucleotide excision repair (NER) and resistance to UV radiation. *Blood* 102 (7), 2632-2637 (2003).
- 121 Greider, C.W. & Blackburn, E.H., Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 43 (2 Pt 1), 405-413 (1985).
- 122 Drummond, M.W. *et al.*, Dysregulated expression of the major telomerase components in leukaemic stem cells. *Leukemia* 19 (3), 381-389 (2005).
- 123 Brummendorf, T.H. *et al.*, Prognostic implications of differences in telomere length between normal and malignant cells from patients with chronic myeloid leukemia measured by flow cytometry. *Blood* 95 (6), 1883-1890 (2000).
- 124 Ohyashiki, K. *et al.*, Telomere dynamics and genetic instability in disease progression of chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma* 40 (1-2), 49-56 (2000).

BIBLIOGRAPHIE

- 125 Ohyashiki, K. *et al.*, Telomerase activity and cytogenetic changes in chronic myeloid leukemia with disease progression. *Leukemia* 11 (2), 190-194 (1997).
- 126 Dai, Z. *et al.*, Oncogenic Abl and Src tyrosine kinases elicit the ubiquitin-dependent degradation of target proteins through a Ras-independent pathway. *Genes Dev* 12 (10), 1415-1424 (1998).
- 127 Dai, Z. & Pandergast, A.M., Abi-2, a novel SH3-containing protein interacts with the c-Abl tyrosine kinase and modulates c-Abl transforming activity. *Genes Dev* 9 (21), 2569-2582 (1995).
- 128 Sattler, M. *et al.*, BCR/ABL directly inhibits expression of SHIP, an SH2-containing polyinositol-5-phosphatase involved in the regulation of hematopoiesis. *Mol Cell Biol* 19 (11), 7473-7480 (1999).
- 129 LaMontagne, K.R., Jr., Flint, A.J., Franza, B.R., Jr., Pandergast, A.M., & Tonks, N.K., Protein tyrosine phosphatase 1B antagonizes signalling by oncoprotein tyrosine kinase p210 bcr-abl in vivo. *Mol Cell Biol* 18 (5), 2965-2975 (1998).
- 130 LaMontagne, K.R., Jr., Hannon, G., & Tonks, N.K., Protein tyrosine phosphatase PTP1B suppresses p210 bcr-abl-induced transformation of rat-1 fibroblasts and promotes differentiation of K562 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (24), 14094-14099 (1998).
- 131 Koyama, N. *et al.*, Inhibition of phosphotyrosine phosphatase 1B causes resistance in BCR-ABL-positive leukemia cells to the ABL kinase inhibitor STI571. *Clin Cancer Res* 12 (7 Pt 1), 2025-2031 (2006).
- 132 Andreu, E.J. *et al.*, BCR-ABL induces the expression of Skp2 through the PI3K pathway to promote p27Kip1 degradation and proliferation of chronic myelogenous leukemia cells. *Cancer Res* 65 (8), 3264-3272 (2005).
- 133 Giralt, S., Kantarjian, H., & Talpaz, M., Treatment of chronic myelogenous leukemia. *Semin Oncol* 22 (4), 396-404 (1995).
- 134 Kujawski, L.A. & Talpaz, M., The role of interferon-alpha in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Cytokine Growth Factor Rev* 18 (5-6), 459-471 (2007).
- 135 Radich, J.P., Olavarria, E., & Apperley, J.F., Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 18 (3), 685-702, x (2004).
- 136 Mauro, M.J. & Maziarz, R.T., Stem cell transplantation in patients with chronic myelogenous leukemia: when should it be used? *Mayo Clin Proc* 81 (3), 404-416 (2006).

BIBLIOGRAPHIE

- 137 Goldman, J. & Gordon, M., Why do chronic myelogenous leukemia stem cells survive allogeneic stem cell transplantation or imatinib: does it really matter? *Leuk Lymphoma* 47 (1), 1-7 (2006).
- 138 Olavarria, E., Autologous stem cell transplantation in chronic myeloid leukemia. *Semin Hematol* 44 (4), 252-258 (2007).
- 139 Lugo, T.G., Pendergast, A.M., Muller, A.J., & Witte, O.N., Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* 247 (4946), 1079-1082 (1990).
- 140 Okabe, M. & Uehara, M., New insight into oncoprotein-targeted antitumor effect: herbimycin A as an antagonist of protein tyrosine kinase against Ph1-positive leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 12 (1-2), 41-49 (1993).
- 141 Bhatia, R., Munthe, H.A., & Verfaillie, C.M., Tyrphostin AG957, a tyrosine kinase inhibitor with anti-BCR/ABL tyrosine kinase activity restores beta1 integrin-mediated adhesion and inhibitory signaling in chronic myelogenous leukemia hematopoietic progenitors. *Leukemia* 12 (11), 1708-1717 (1998).
- 142 Traxler, P.M. *et al.*, 4-(Phenylamino)pyrrolopyrimidines: potent and selective, ATP site directed inhibitors of the EGF-receptor protein tyrosine kinase. *J Med Chem* 39 (12), 2285-2292 (1996).
- 143 Buchdunger, E. *et al.*, Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res* 56 (1), 100-104 (1996).
- 144 Druker, B.J. *et al.*, Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 2 (5), 561-566 (1996).
- 145 Savage, D.G. & Antman, K.H., Imatinib mesylate--a new oral targeted therapy. *N Engl J Med* 346 (9), 683-693 (2002).
- 146 Schindler, T. *et al.*, Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* 289 (5486), 1938-1942 (2000).
- 147 Nagar, B. *et al.*, Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res* 62 (15), 4236-4243 (2002).
- 148 Shah, N.P. *et al.*, Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2 (2), 117-125 (2002).

BIBLIOGRAPHIE

- 149 Gambacorti-Passerini, C. *et al.*, Inhibition of the ABL kinase activity blocks the proliferation of BCR/ABL+ leukemic cells and induces apoptosis. *Blood Cells Mol Dis* 23 (3), 380-394 (1997).
- 150 Carroll, M. *et al.*, CGP 57148, a tyrosine kinase inhibitor, inhibits the growth of cells expressing BCR-ABL, TEL-ABL, and TEL-PDGFR fusion proteins. *Blood* 90 (12), 4947-4952 (1997).
- 151 Druker, B.J. *et al.*, Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 344 (14), 1031-1037 (2001).
- 152 Druker, B.J. *et al.*, Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 344 (14), 1038-1042 (2001).
- 153 Joensuu, H. *et al.*, Effect of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in a patient with a metastatic gastrointestinal stromal tumor. *N Engl J Med* 344 (14), 1052-1056 (2001).
- 154 Cools, J. *et al.*, A tyrosine kinase created by fusion of the PDGFRA and FIP1L1 genes as a therapeutic target of imatinib in idiopathic hypereosinophilic syndrome. *N Engl J Med* 348 (13), 1201-1214 (2003).
- 155 Koon, H.B. *et al.*, Imatinib-induced regression of AIDS-related Kaposi's sarcoma. *J Clin Oncol* 23 (5), 982-989 (2005).
- 156 Winger, J.A., Hantschel, O., Superti-Furga, G., & Kuriyan, J., The structure of the leukemia drug imatinib bound to human quinone reductase 2 (NQO2). *BMC Struct Biol* 9, 7 (2009).
- 157 Rix, U. *et al.*, Chemical proteomic profiles of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib reveal novel kinase and nonkinase targets. *Blood* 110 (12), 4055-4063 (2007).
- 158 Vella, F., Ferry, G., Delagrèze, P., & Boutin, J.A., NRH:quinone reductase 2: an enzyme of surprises and mysteries. *Biochem Pharmacol* 71 (1-2), 1-12 (2005).
- 159 Buryanovskyy, L. *et al.*, Crystal structure of quinone reductase 2 in complex with resveratrol. *Biochemistry* 43 (36), 11417-11426 (2004).
- 160 Belloc, F. *et al.*, The stem cell factor-c-KIT pathway must be inhibited to enable apoptosis induced by BCR-ABL inhibitors in chronic myelogenous leukemia cells. *Leukemia* 23 (4), 679-685 (2009).
- 161 Borg, C. *et al.*, Novel mode of action of c-kit tyrosine kinase inhibitors leading to NK cell-dependent antitumor effects. *J Clin Invest* 114 (3), 379-388 (2004).

BIBLIOGRAPHIE

- 162 Smyth, M.J., Imatinib mesylate--uncovering a fast track to adaptive immunity. *N Engl J Med* 354 (21), 2282-2284 (2006).
- 163 Baccarani, M. *et al.*, 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 (2006).
- 164 Hughes, T. *et al.*, 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 (2006).
- 165 Daub, H., Specht, K., & Ullrich, A., Strategies to overcome resistance to targeted protein kinase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 3 (12), 1001-1010 (2004).
- 166 Gorre, M.E. *et al.*, Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 293 (5531), 876-880 (2001).
- 167 Mahon, F.X. *et al.*, Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood* 96 (3), 1070-1079 (2000).
- 168 Al-Ali, H.K. *et al.*, High incidence of BCR-ABL kinase domain mutations and absence of mutations of the PDGFR and KIT activation loops in CML patients with secondary resistance to imatinib. *Hematol J* 5 (1), 55-60 (2004).
- 169 Branford, S. *et al.*, Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood* 102 (1), 276-283 (2003).
- 170 Roumiantsev, S. *et al.*, Clinical resistance to the kinase inhibitor STI-571 in chronic myeloid leukemia by mutation of Tyr-253 in the Abl kinase domain P-loop. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (16), 10700-10705 (2002).
- 171 Branford, S. *et al.*, High frequency of point mutations clustered within the adenosine triphosphate-binding region of BCR/ABL in patients with chronic myeloid leukemia or Ph-positive acute lymphoblastic leukemia who develop imatinib (STI571) resistance. *Blood* 99 (9), 3472-3475 (2002).
- 172 Corbin, A.S., La Rosee, P., Stoffregen, E.P., Druker, B.J., & Deininger, M.W., Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib. *Blood* 101 (11), 4611-4614 (2003).

BIBLIOGRAPHIE

- 173 Willis, S.G. *et al.*, High-sensitivity detection of BCR-ABL kinase domain mutations in imatinib-naive patients: correlation with clonal cytogenetic evolution but not response to therapy. *Blood* 106 (6), 2128-2137 (2005).
- 174 Azam, M., Latek, R.R., & Daley, G.Q., Mechanisms of autoinhibition and STI-571/imatinib resistance revealed by mutagenesis of BCR-ABL. *Cell* 112 (6), 831-843 (2003).
- 175 Roche-Lestienne, C. *et al.*, Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment. *Blood* 100 (3), 1014-1018 (2002).
- 176 Roche-Lestienne, C., Lai, J.L., Darre, S., Facon, T., & Preudhomme, C., A mutation conferring resistance to imatinib at the time of diagnosis of chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 348 (22), 2265-2266 (2003).
- 177 Khorashad, J.S. *et al.*, The presence of a BCR-ABL mutant allele in CML does not always explain clinical resistance to imatinib. *Leukemia* 20 (4), 658-663 (2006).
- 178 Sherbenou, D.W. *et al.*, Mutations of the BCR-ABL-kinase domain occur in a minority of patients with stable complete cytogenetic response to imatinib. *Leukemia* 21 (3), 489-493 (2007).
- 179 Mahon, F.X. *et al.*, MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood* 101 (6), 2368-2373 (2003).
- 180 Ferrao, P.T., Frost, M.J., Siah, S.P., & Ashman, L.K., Overexpression of P-glycoprotein in K562 cells does not confer resistance to the growth inhibitory effects of imatinib (STI571) in vitro. *Blood* 102 (13), 4499-4503 (2003).
- 181 Hatzieremia, S., Jordanides, N.E., Holyoake, T.L., Mountford, J.C., & Jorgensen, H.G., Inhibition of MDR1 does not sensitize primitive chronic myeloid leukemia CD34+ cells to imatinib. *Exp Hematol* 37 (6), 692-700 (2009).
- 182 Gambacorti-Passerini, C. *et al.*, Role of alpha1 acid glycoprotein in the in vivo resistance of human BCR-ABL(+) leukemic cells to the abl inhibitor STI571. *J Natl Cancer Inst* 92 (20), 1641-1650 (2000).
- 183 Gambacorti-Passerini, C. *et al.*, Alpha1 acid glycoprotein binds to imatinib (STI571) and substantially alters its pharmacokinetics in chronic myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res* 9 (2), 625-632 (2003).
- 184 Larghero, J. *et al.*, Relationship between elevated levels of the alpha 1 acid glycoprotein in chronic myelogenous leukemia in blast crisis and pharmacological

BIBLIOGRAPHIE

- resistance to imatinib (Gleevec) in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol* 66 (10), 1907-1913 (2003).
- 185 Titier, K. *et al.*, Quantification of imatinib in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ther Drug Monit* 27 (5), 634-640 (2005).
- 186 Donato, N.J. *et al.*, BCR-ABL independence and LYN kinase overexpression in chronic myelogenous leukemia cells selected for resistance to STI571. *Blood* 101 (2), 690-698 (2003).
- 187 Ptasznik, A., Nakata, Y., Kalota, A., Emerson, S.G., & Gewirtz, A.M., Short interfering RNA (siRNA) targeting the Lyn kinase induces apoptosis in primary, and drug-resistant, BCR-ABL1(+) leukemia cells. *Nat Med* 10 (11), 1187-1189 (2004).
- 188 Nowicki, M.O. *et al.*, BCR/ABL oncogenic kinase promotes unfaithful repair of the reactive oxygen species-dependent DNA double-strand breaks. *Blood* 104 (12), 3746-3753 (2004).
- 189 Koptyra, M. *et al.*, BCR/ABL kinase induces self-mutagenesis via reactive oxygen species to encode imatinib resistance. *Blood* 108 (1), 319-327 (2006).
- 190 Stoklosa, T. *et al.*, BCR/ABL inhibits mismatch repair to protect from apoptosis and induce point mutations. *Cancer Res* 68 (8), 2576-2580 (2008).
- 191 Slupianek, A. *et al.*, BCR/ABL regulates mammalian RecA homologs, resulting in drug resistance. *Mol Cell* 8 (4), 795-806 (2001).
- 192 Klemm, L. *et al.*, The B cell mutator AID promotes B lymphoid blast crisis and drug resistance in chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* 16 (3), 232-245 (2009).
- 193 Fernandes, M.S. *et al.*, BCR-ABL promotes the frequency of mutagenic single-strand annealing DNA repair. *Blood* 114 (9), 1813-1819 (2009).
- 194 Leonhardt, H., Page, A.W., Weier, H.U., & Bestor, T.H., A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* 71 (5), 865-873 (1992).
- 195 Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., & Li, E., DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99 (3), 247-257 (1999).
- 196 Mizuno, S. *et al.*, Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood* 97 (5), 1172-1179 (2001).

BIBLIOGRAPHIE

- 197 Kusy, S., Larsen, C.J., & Roche, J., p14ARF, p15INK4b and p16INK4a methylation status in chronic myelogenous leukemia. *Leuk Lymphoma* 45 (10), 1989-1994 (2004).
- 198 Qian, J. *et al.*, Aberrant methylation of the death-associated protein kinase 1 (DAPK1) CpG island in chronic myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 82 (2), 119-123 (2009).
- 199 Zeng, L., Hu, Y., & Li, B., Identification of TopBP1 as a c-Abl-interacting protein and a repressor for c-Abl expression. *J Biol Chem* 280 (32), 29374-29380 (2005).
- 200 Bueno, M.J. *et al.*, Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression. *Cancer Cell* 13 (6), 496-506 (2008).
- 201 Montiel-Duarte, C. *et al.*, Resistance to Imatinib Mesylate-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia is associated with PTEN down-regulation due to promoter hypermethylation. *Leuk Res* 32 (5), 709-716 (2008).
- 202 Pehlivan, M., Sercan, Z., & Sercan, H.O., sFRP1 promoter methylation is associated with persistent Philadelphia chromosome in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res* 33 (8), 1062-1067 (2009).
- 203 Uberbacher, E.C. & Bunick, G.J., X-ray structure of the nucleosome core particle. *J Biomol Struct Dyn* 2 (6), 1033-1055 (1985).
- 204 Berger, S.L., Histone modifications in transcriptional regulation. *Curr Opin Genet Dev* 12 (2), 142-148 (2002).
- 205 Kuo, M.H. & Allis, C.D., Roles of histone acetyltransferases and deacetylases in gene regulation. *Bioessays* 20 (8), 615-626 (1998).
- 206 Meehan, R.R., Lewis, J.D., McKay, S., Kleiner, E.L., & Bird, A.P., Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell* 58 (3), 499-507 (1989).
- 207 Nan, X. *et al.*, Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393 (6683), 386-389 (1998).
- 208 Hughes, T.P. *et al.*, Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 349 (15), 1423-1432 (2003).
- 209 O'Brien, S.G. *et al.*, Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 348 (11), 994-1004 (2003).
- 210 Hahn, E.A. *et al.*, Quality of life in patients with newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia on imatinib versus interferon alfa plus low-dose cytarabine: results from the IRIS Study. *J Clin Oncol* 21 (11), 2138-2146 (2003).

BIBLIOGRAPHIE

- 211 Graham, S.M. *et al.*, Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* 99 (1), 319-325 (2002).
- 212 Jiang, X. *et al.*, Chronic myeloid leukemia stem cells possess multiple unique features of resistance to BCR-ABL targeted therapies. *Leukemia* 21 (5), 926-935 (2007).
- 213 Kantarjian, H.M. *et al.*, Dose escalation of imatinib mesylate can overcome resistance to standard-dose therapy in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* 101 (2), 473-475 (2003).
- 214 Baccarani, M. *et al.*, Comparison of imatinib 400 mg and 800 mg daily in the front-line treatment of high-risk, Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia: a European LeukemiaNet Study. *Blood* 113 (19), 4497-4504 (2009).
- 215 Weisberg, E. *et al.*, Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell* 7 (2), 129-141 (2005).
- 216 Kantarjian, H.M. *et al.*, Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is effective in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase following imatinib resistance and intolerance. *Blood* 110 (10), 3540-3546 (2007).
- 217 le Coutre, P. *et al.*, Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is active in patients with imatinib-resistant or -intolerant accelerated-phase chronic myelogenous leukemia. *Blood* 111 (4), 1834-1839 (2008).
- 218 Rosti, G. *et al.*, Nilotinib for the frontline treatment of Ph+ chronic myeloid leukemia. *Blood* (2009).
- 219 Hughes, T. *et al.*, Impact of baseline BCR-ABL mutations on response to nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase. *J Clin Oncol* 27 (25), 4204-4210 (2009).
- 220 Mahon, F.X. *et al.*, Evidence that resistance to nilotinib may be due to BCR-ABL, Pgp, or Src kinase overexpression. *Cancer Res* 68 (23), 9809-9816 (2008).
- 221 Jorgensen, H.G., Allan, E.K., Jordanides, N.E., Mountford, J.C., & Holyoake, T.L., Nilotinib exerts equipotent antiproliferative effects to imatinib and does not induce apoptosis in CD34+ CML cells. *Blood* 109 (9), 4016-4019 (2007).
- 222 Shah, N.P. *et al.*, Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science* 305 (5682), 399-401 (2004).

BIBLIOGRAPHIE

- 223 Hochhaus, A. *et al.*, Dasatinib induces notable hematologic and cytogenetic responses in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of imatinib therapy. *Blood* 109 (6), 2303-2309 (2007).
- 224 Cortes, J. *et al.*, Dasatinib induces complete hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in blast crisis. *Blood* 109 (8), 3207-3213 (2007).
- 225 Ottmann, O. *et al.*, Dasatinib induces rapid hematologic and cytogenetic responses in adult patients with Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia with resistance or intolerance to imatinib: interim results of a phase 2 study. *Blood* 110 (7), 2309-2315 (2007).
- 226 Soverini, S. *et al.*, Presence or the emergence of a F317L BCR-ABL mutation may be associated with resistance to dasatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemia. *J Clin Oncol* 24 (33), e51-52 (2006).
- 227 Copland, M. *et al.*, Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction. *Blood* 107 (11), 4532-4539 (2006).
- 228 Puttini, M. *et al.*, In vitro and in vivo activity of SKI-606, a novel Src-Abl inhibitor, against imatinib-resistant Bcr-Abl+ neoplastic cells. *Cancer Res* 66 (23), 11314-11322 (2006).
- 229 Konig, H., Holyoake, T.L., & Bhatia, R., Effective and selective inhibition of chronic myeloid leukemia primitive hematopoietic progenitors by the dual Src/Abl kinase inhibitor SKI-606. *Blood* 111 (4), 2329-2338 (2008).
- 230 Redaelli, S. *et al.*, Activity of bosutinib, dasatinib, and nilotinib against 18 imatinib-resistant BCR/ABL mutants. *J Clin Oncol* 27 (3), 469-471 (2009).
- 231 Weisberg, E., Manley, P.W., Cowan-Jacob, S.W., Hochhaus, A., & Griffin, J.D., Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer* 7 (5), 345-356 (2007).
- 232 Kimura, S. *et al.*, NS-187, a potent and selective dual Bcr-Abl/Lyn tyrosine kinase inhibitor, is a novel agent for imatinib-resistant leukemia. *Blood* 106 (12), 3948-3954 (2005).
- 233 Gumireddy, K. *et al.*, A non-ATP-competitive inhibitor of BCR-ABL overrides imatinib resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (6), 1992-1997 (2005).

BIBLIOGRAPHIE

- 234 Giles, F.J. *et al.*, MK-0457, a novel kinase inhibitor, is active in patients with chronic myeloid leukemia or acute lymphocytic leukemia with the T315I BCR-ABL mutation. *Blood* 109 (2), 500-502 (2007).
- 235 Gontarewicz, A. *et al.*, Simultaneous targeting of Aurora kinases and Bcr-Abl kinase by the small molecule inhibitor PHA-739358 is effective against imatinib-resistant BCR-ABL mutations including T315I. *Blood* 111 (8), 4355-4364 (2008).
- 236 O'Hare, T. *et al.*, SGX393 inhibits the CML mutant Bcr-AblT315I and preempts in vitro resistance when combined with nilotinib or dasatinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (14), 5507-5512 (2008).
- 237 Adrian, F.J. *et al.*, Allosteric inhibitors of Bcr-abl-dependent cell proliferation. *Nat Chem Biol* 2 (2), 95-102 (2006).
- 238 Thiesing, J.T., Ohno-Jones, S., Kolibaba, K.S., & Druker, B.J., Efficacy of STI571, an abl tyrosine kinase inhibitor, in conjunction with other antileukemic agents against bcr-abl-positive cells. *Blood* 96 (9), 3195-3199 (2000).
- 239 Marin, D. *et al.*, Phase I/II trial of adding semisynthetic homoharringtonine in chronic myeloid leukemia patients who have achieved partial or complete cytogenetic response on imatinib. *Cancer* 103 (9), 1850-1855 (2005).
- 240 Quintas-Cardama, A. *et al.*, Phase I/II study of subcutaneous homoharringtonine in patients with chronic myeloid leukemia who have failed prior therapy. *Cancer* 109 (2), 248-255 (2007).
- 241 Legros, L. *et al.*, BCR-ABL(T315I) transcript disappearance in an imatinib-resistant CML patient treated with homoharringtonine: a new therapeutic challenge? *Leukemia* 21 (10), 2204-2206 (2007).
- 242 de Lavallade, H. *et al.*, Interferon-alpha or homoharringtonine as salvage treatment for chronic myeloid leukemia patients who acquire the T315I BCR-ABL mutation. *Blood* 110 (7), 2779-2780 (2007).
- 243 Nimmanapalli, R., O'Bryan, E., & Bhalla, K., Geldanamycin and its analogue 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin lowers Bcr-Abl levels and induces apoptosis and differentiation of Bcr-Abl-positive human leukemic blasts. *Cancer Res* 61 (5), 1799-1804 (2001).
- 244 Gorre, M.E., Ellwood-Yen, K., Chiosis, G., Rosen, N., & Sawyers, C.L., BCR-ABL point mutants isolated from patients with imatinib mesylate-resistant chronic myeloid leukemia remain sensitive to inhibitors of the BCR-ABL chaperone heat shock protein 90. *Blood* 100 (8), 3041-3044 (2002).

BIBLIOGRAPHIE

- 245 Radujkovic, A. *et al.*, Synergistic activity of imatinib and 17-AAG in imatinib-resistant CML cells overexpressing BCR-ABL--Inhibition of P-glycoprotein function by 17-AAG. *Leukemia* 19 (7), 1198-1206 (2005).
- 246 Puccetti, E. *et al.*, BCR-ABL mediates arsenic trioxide-induced apoptosis independently of its aberrant kinase activity. *Cancer Res* 60 (13), 3409-3413 (2000).
- 247 Perkins, C., Kim, C.N., Fang, G., & Bhalla, K.N., Arsenic induces apoptosis of multidrug-resistant human myeloid leukemia cells that express Bcr-Abl or overexpress MDR, MRP, Bcl-2, or Bcl-x(L). *Blood* 95 (3), 1014-1022 (2000).
- 248 Porosnicu, M. *et al.*, Co-treatment with As₂O₃ enhances selective cytotoxic effects of STI-571 against Bcr-Abl-positive acute leukemia cells. *Leukemia* 15 (5), 772-778 (2001).
- 249 Ito, K. *et al.*, PML targeting eradicates quiescent leukaemia-initiating cells. *Nature* 453 (7198), 1072-1078 (2008).
- 250 Yu, C. *et al.*, The proteasome inhibitor bortezomib interacts synergistically with histone deacetylase inhibitors to induce apoptosis in Bcr/Abl+ cells sensitive and resistant to STI571. *Blood* 102 (10), 3765-3774 (2003).
- 251 Gatto, S. *et al.*, The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth and induces apoptosis in Bcr/Abl-positive cell lines sensitive and resistant to imatinib mesylate. *Haematologica* 88 (8), 853-863 (2003).
- 252 Dai, Y., Rahmani, M., Pei, X.Y., Dent, P., & Grant, S., Bortezomib and flavopiridol interact synergistically to induce apoptosis in chronic myeloid leukemia cells resistant to imatinib mesylate through both Bcr/Abl-dependent and -independent mechanisms. *Blood* 104 (2), 509-518 (2004).
- 253 Yu, C., Krystal, G., Dent, P., & Grant, S., Flavopiridol potentiates STI571-induced mitochondrial damage and apoptosis in BCR-ABL-positive human leukemia cells. *Clin Cancer Res* 8 (9), 2976-2984 (2002).
- 254 Kantarjian, H.M. *et al.*, Results of decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine) therapy in 130 patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 98 (3), 522-528 (2003).
- 255 Issa, J.P. *et al.*, Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood* 103 (5), 1635-1640 (2004).
- 256 La Rosee, P. *et al.*, In vitro efficacy of combined treatment depends on the underlying mechanism of resistance in imatinib-resistant Bcr-Abl-positive cell lines. *Blood* 103 (1), 208-215 (2004).

BIBLIOGRAPHIE

- 257 Oki, Y. *et al.*, Phase II study of low-dose decitabine in combination with imatinib mesylate in patients with accelerated or myeloid blastic phase of chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 109 (5), 899-906 (2007).
- 258 Nimmanapalli, R., Fuino, L., Stobaugh, C., Richon, V., & Bhalla, K., Cotreatment with the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) enhances imatinib-induced apoptosis of Bcr-Abl-positive human acute leukemia cells. *Blood* 101 (8), 3236-3239 (2003).
- 259 Yu, C. *et al.*, Histone deacetylase inhibitors promote STI571-mediated apoptosis in STI571-sensitive and -resistant Bcr/Abl+ human myeloid leukemia cells. *Cancer Res* 63 (9), 2118-2126 (2003).
- 260 Fiskus, W. *et al.*, Combined effects of novel tyrosine kinase inhibitor AMN107 and histone deacetylase inhibitor LBH589 against Bcr-Abl-expressing human leukemia cells. *Blood* 108 (2), 645-652 (2006).
- 261 Morotti, A. *et al.*, Valproate enhances imatinib-induced growth arrest and apoptosis in chronic myeloid leukemia cells. *Cancer* 106 (5), 1188-1196 (2006).
- 262 Cortes, J. *et al.*, Efficacy of the farnesyl transferase inhibitor R115777 in chronic myeloid leukemia and other hematologic malignancies. *Blood* 101 (5), 1692-1697 (2003).
- 263 Cortes, J. *et al.*, Phase 1 study of tipifarnib in combination with imatinib for patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase after imatinib failure. *Cancer* 110 (9), 2000-2006 (2007).
- 264 Peters, D.G. *et al.*, Activity of the farnesyl protein transferase inhibitor SCH66336 against BCR/ABL-induced murine leukemia and primary cells from patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* 97 (5), 1404-1412 (2001).
- 265 Hoover, R.R., Mahon, F.X., Melo, J.V., & Daley, G.Q., Overcoming STI571 resistance with the farnesyl transferase inhibitor SCH66336. *Blood* 100 (3), 1068-1071 (2002).
- 266 Borthakur, G. *et al.*, Pilot study of lonafarnib, a farnesyl transferase inhibitor, in patients with chronic myeloid leukemia in the chronic or accelerated phase that is resistant or refractory to imatinib therapy. *Cancer* 106 (2), 346-352 (2006).
- 267 Jorgensen, H.G. *et al.*, Lonafarnib reduces the resistance of primitive quiescent CML cells to imatinib mesylate in vitro. *Leukemia* 19 (7), 1184-1191 (2005).
- 268 Yu, C. *et al.*, Pharmacologic mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase/mitogen-activated protein kinase inhibitors interact synergistically with

BIBLIOGRAPHIE

- STI571 to induce apoptosis in Bcr/Abl-expressing human leukemia cells. *Cancer Res* 62 (1), 188-199 (2002).
- 269 Nguyen, T.K., Rahmani, M., Harada, H., Dent, P., & Grant, S., MEK1/2 inhibitors sensitize Bcr/Abl+ human leukemia cells to the dual Abl/Src inhibitor BMS-354/825. *Blood* 109 (9), 4006-4015 (2007).
- 270 Dengler, J., von Bubnoff, N., Decker, T., Peschel, C., & Duyster, J., Combination of imatinib with rapamycin or RAD001 acts synergistically only in Bcr-Abl-positive cells with moderate resistance to imatinib. *Leukemia* 19 (10), 1835-1838 (2005).
- 271 Mayerhofer, M. *et al.*, Identification of mTOR as a novel bifunctional target in chronic myeloid leukemia: dissection of growth-inhibitory and VEGF-suppressive effects of rapamycin in leukemic cells. *FASEB J* 19 (8), 960-962 (2005).
- 272 Mohi, M.G. *et al.*, Combination of rapamycin and protein tyrosine kinase (PTK) inhibitors for the treatment of leukemias caused by oncogenic PTKs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (9), 3130-3135 (2004).
- 273 Burchert, A. *et al.*, Compensatory PI3-kinase/Akt/mTor activation regulates imatinib resistance development. *Leukemia* 19 (10), 1774-1782 (2005).
- 274 Ayroldi, E. & Riccardi, C., Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. *FASEB J* (2009).
- 275 Hirano, I. *et al.*, Depletion of Pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatases 1 and 2 by Bcr-Abl promotes chronic myelogenous leukemia cell proliferation through continuous phosphorylation of Akt isoforms. *J Biol Chem* 284 (33), 22155-22165 (2009).
- 276 Hosoya, N. *et al.*, Genomewide screening of DNA copy number changes in chronic myelogenous leukemia with the use of high-resolution array-based comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 45 (5), 482-494 (2006).
- 277 Brazma, D. *et al.*, Genomic profile of chronic myelogenous leukemia: Imbalances associated with disease progression. *Genes Chromosomes Cancer* 46 (11), 1039-1050 (2007).
- 278 Khorashad, J.S. *et al.*, Multiple sub-microscopic genomic lesions are a universal feature of chronic myeloid leukaemia at diagnosis. *Leukemia* 22 (9), 1806-1807 (2008).
- 279 Feuk, L., Marshall, C.R., Wintle, R.F., & Scherer, S.W., Structural variants: changing the landscape of chromosomes and design of disease studies. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 1, R57-66 (2006).

BIBLIOGRAPHIE

- 280 Radich, J.P. *et al.*, Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (8), 2794-2799 (2006).
- 281 Oehler, V.G. *et al.*, The preferentially expressed antigen in melanoma (PRAME) inhibits myeloid differentiation in normal hematopoietic and leukemic progenitor cells. *Blood* 114 (15), 3299-3308 (2009).
- 282 Hollox, E.J., Copy number variation of beta-defensins and relevance to disease. *Cytogenet Genome Res* 123 (1-4), 148-155 (2008).
- 283 Zaccaria, A. *et al.*, Persistence of chromosomal abnormalities additional to the Philadelphia chromosome after Philadelphia chromosome disappearance during imatinib therapy for chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 92 (4), 564-565 (2007).
- 284 RASSOOL F.^{1*}, T.G., NADER OMI²VAR³., NICOLA BRADY², MARIEKA PLA⁴., MARIELLE REBOUL⁴. N.L., CHRISTINE CHOMIENNE⁴, NICHOLAS SHAUN THOMAS³., & GHULAM MUFTI. R.A.P., GENETIC INSTABILITY AS AN AREA OF POTENTIAL THERAPEUTIC INTERVENTION. *MEDICINA (Buenos Aires)* 67 (Supl. II), 20-24 (2007).
- 285 Servitja, J.M., Marinissen, M.J., Sodhi, A., Bustelo, X.R., & Gutkind, J.S., Rac1 function is required for Src-induced transformation. Evidence of a role for Tiam1 and Vav2 in Rac activation by Src. *J Biol Chem* 278 (36), 34339-34346 (2003).
- 286 Baranger, A.M., Accessory factor-bZIP-DNA interactions. *Curr Opin Chem Biol* 2 (1), 18-23 (1998).
- 287 Ayroldi, E. *et al.*, Glucocorticoid-induced leucine zipper inhibits the Raf-extracellular signal-regulated kinase pathway by binding to Raf-1. *Mol Cell Biol* 22 (22), 7929-7941 (2002).
- 288 Ayroldi, E. *et al.*, GILZ mediates the antiproliferative activity of glucocorticoids by negative regulation of Ras signaling. *J Clin Invest* 117 (6), 1605-1615 (2007).
- 289 Ayroldi, E. *et al.*, Modulation of T-cell activation by the glucocorticoid-induced leucine zipper factor via inhibition of nuclear factor kappaB. *Blood* 98 (3), 743-753 (2001).
- 290 Mittelstadt, P.R. & Ashwell, J.D., Inhibition of AP-1 by the glucocorticoid-inducible protein GILZ. *J Biol Chem* 276 (31), 29603-29610 (2001).
- 291 Di Marco, B. *et al.*, Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ)/NF-kappaB interaction: role of GILZ homo-dimerization and C-terminal domain. *Nucleic Acids Res* 35 (2), 517-528 (2007).

BIBLIOGRAPHIE

- 292 D'Adamio, F. *et al.*, A new dexamethasone-induced gene of the leucine zipper family protects T lymphocytes from TCR/CD3-activated cell death. *Immunity* 7 (6), 803-812 (1997).
- 293 Ingram, W.J., Wicking, C.A., Grimmond, S.M., Forrest, A.R., & Wainwright, B.J., Novel genes regulated by Sonic Hedgehog in pluripotent mesenchymal cells. *Oncogene* 21 (53), 8196-8205 (2002).
- 294 Asselin-Labat, M.L. *et al.*, GILZ, a new target for the transcription factor FoxO3, protects T lymphocytes from interleukin-2 withdrawal-induced apoptosis. *Blood* 104 (1), 215-223 (2004).
- 295 Delfino, D.V., Agostini, M., Spinicelli, S., Vito, P., & Riccardi, C., Decrease of Bcl-xL and augmentation of thymocyte apoptosis in GILZ overexpressing transgenic mice. *Blood* 104 (13), 4134-4141 (2004).
- 296 Delfino, D.V., Agostini, M., Spinicelli, S., Vacca, C., & Riccardi, C., Inhibited cell death, NF-kappaB activity and increased IL-10 in TCR-triggered thymocytes of transgenic mice overexpressing the glucocorticoid-induced protein GILZ. *Int Immunopharmacol* 6 (7), 1126-1134 (2006).
- 297 Kuroda, J. *et al.*, Bim and Bad mediate imatinib-induced killing of Bcr/Abl+ leukemic cells, and resistance due to their loss is overcome by a BH3 mimetic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (40), 14907-14912 (2006).
- 298 Certo, M. *et al.*, Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell* 9 (5), 351-365 (2006).
- 299 Martin, J., Masri, J., Bernath, A., Nishimura, R.N., & Gera, J., Hsp70 associates with Rictor and is required for mTORC2 formation and activity. *Biochem Biophys Res Commun* 372 (4), 578-583 (2008).
- 300 Huang, J., Dibble, C.C., Matsuzaki, M., & Manning, B.D., The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. *Mol Cell Biol* 28 (12), 4104-4115 (2008).
- 301 Essafi, A. *et al.*, Direct transcriptional regulation of Bim by FoxO3a mediates STI571-induced apoptosis in Bcr-Abl-expressing cells. *Oncogene* 24 (14), 2317-2329 (2005).
- 302 Shi, X. *et al.*, A glucocorticoid-induced leucine-zipper protein, GILZ, inhibits adipogenesis of mesenchymal cells. *EMBO Rep* 4 (4), 374-380 (2003).
- 303 Brognard, J., Sieracki, E., Gao, T., & Newton, A.C., PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms. *Mol Cell* 25 (6), 917-931 (2007).

BIBLIOGRAPHIE

- 304 Brognard, J. & Newton, A.C., PHLiPPing the switch on Akt and protein kinase C signaling. *Trends Endocrinol Metab* 19 (6), 223-230 (2008).
- 305 Gao, T., Brognard, J., & Newton, A.C., The phosphatase PHLPP controls the cellular levels of protein kinase C. *J Biol Chem* 283 (10), 6300-6311 (2008).
- 306 Gustafson, W.C. *et al.*, Bcr-Abl regulates protein kinase C α (PKC α) transcription via an Elk1 site in the PKC α promoter. *J Biol Chem* 279 (10), 9400-9408 (2004).
- 307 Li, X., Liu, J., & Gao, T., β -TrCP-mediated ubiquitination and degradation of PHLPP1 is negatively regulated by Akt. *Mol Cell Biol* (2009).