Diagnostic moléculaire: la clé de tout traitement ciblé

Elisabeth Oppliger Leibundgut[a, b], Gabriela M. Baerlocher[a, b]

[a] Diagnostic moléculaire, Clinique universitaire d'hématologie et Laboratoire central d'hématologie de l'Hôpital de l'Isle de Berne
[b] Hématologie expérimentale, Département de recherche clinique de l'Université de Berne

Les analyses génétiques moléculaires permettent la mise en évidence, avec une grande sensibilité et une grande spécificité, de diverses altérations géniques, telles que des mutations ponctuelles, des délétions et des insertions de petite taille ou d'autres réarrangements structurels au sein des gènes. L'identification des aberrations pathogéniques sert d'une part à poser des diagnostics précis et d'autre part à établir des pronostics et à permettre de choisir un traitement ciblé [1, 2]. Dans certaines néoplasies hématologiques, les analyses moléculaires simplifient ou remplacent les algorithmes diagnostics. La mise en évidence d'une mutation *JAK2* V617F parle en faveur d'une néoplasie myéloproliférative. Chez les patients atteints d'une leucémie aiguë promyélocytaire, la présence d'une fusion génique *PML-RARA* prouve le diagnostic de leucémie myéloïde aiguë (LMA) M3.
Les suivis moléculaires ont par ailleurs pris une importance grandissante pendant et après la phase thérapeutique des maladies cancéreuses. Les aberrations génétiques détéctées au moment du diagnostic sont alors utilisés comme molécules cibles pour les contrôles d'évolution ultérieurs. La réponse au traitement peut être contrôlée et la thérapie peut être adaptée individuellement grâce à la technique très sensible de la PCR en temps réel (Real-time-PCR). La courbe d'évolution permet de détecter les récidives jusqu'à trois mois avant les premières manifestations cliniques et de reconnaître précocement les résistances pour changer le traitement en conséquence.

Méthodes

L'ADN ou l'ARN extrait d'échantillons de sang ou de moelle osseuse fournit le matériel de base nécessaire aux analyses de génétique moléculaire. Pour la détection de mutations avec de différentes méthodes PCR et le séquençage, on utilise l'ADN, alors que de nombreuses translocations réciproques sont mises en évidence par RT-PCR sur l'ARN en raison des points de rupture très hétérogènes au niveau du génome. La détection par PCR se fait à l'aide de la technique de PCR conventionnelle ou de PCR en temps réel sensible, qui permet une quantification des aberrations génétiques jusqu'à une dilution de 1:100 000 et s'utilise pour les contrôles d'évolution. Les mutations ponctuelles se détectent par PCR allèle spécifique, qui produit une amplification sélective pour l'allèle muté. Le séquençage de Sanger permet d'identifier et de caractériser les aberrations génétiques avec précision.

Elisabeth Oppliger Leibundgut

PML-RARA

L'acide rétinoïque all-trans (ATRA) chez les patients atteints de LMA M3 a été le premier traitement ciblé dans les néoplasies hématologiques. Initialement, ce médicament avait été administré sans qu'on en connaisse la molécule cible. Au début des années 1990, on a identifié la fusion génique entre le gène PML sur le chromosome 15 et le gène du récepteur a de l'acide rétinoïque (RARA) en tant que corrélat de la translocation t(15;17). A concentrations physiologiques, l'acide rétinoïque induit une activation du récepteur RA-α, ce qui entraîne une différenciation des cellules précurseurs immatures. Pour activer le récepteur RA-α bloqué par la fusion avec le PML, il est nécessaire d'administrer des doses pharmacologiques d'ATRA [3]. Les troubles de la crase associés à cette leucémie étant souvent gravissimes et potentiellement fatals, il est indispensable d'instaurer immédiatement le traitement, ce qui exige un dépistage rapide de la molécule cible PML-RARA. L'analyse est donc réalisée en urgence. Les différents transcrits sont mis en évidence par PCR multiplex. Le contrôle de l'évolution est essentiel parce que la persistance éventuelle de transcrits PML-RARA correspond à une forte probabilité de récidive.

Tyrosine-kinases activées

Les tyrosine-kinases, telles que l'ABL, le JAK2, le PDGFRA, le c-kit ou le FLT3, sont activées par des translocations et des mutations et induisent une prolifération cellulaire autonome incontrôlée. Elles peuvent être inhibées de façon ciblée par des inhibiteurs des tyrosine-kinases (TKI).

Leucémie myéloïde chronique – BCR-ABL1

La mise en évidence du gène de fusion *BCR-ABL1* en tant que corrélat moléculaire de la translocation de Philadelphie t(9;22) est effectuée par PCR multiplex. Celle-ci permet de déceler les transcrits fréquents et rares du *BCR-ABL1*. 5% des fusions *BCR-ABL1* cryptiques ne sont pas détectables par les techniques de cytogénétique, si bien qu'une analyse de génétique moléculaire s'impose devant toute leucocytose. Le contrôle d'évolution moléculaire sous traitement de TKI avec l'imatinib, le nilotinib ou le dasatinib (ou le bosutinib ou le ponatinib dans le cadre de certaines études cliniques) se fait tous les trois mois dans le sang périphérique.
Pour la quantification du *BCR-ABL1*, on a récemment introduit, dans un effort de standardisation, une échelle internationale (BCR-ABL IS%) [4, 5] sur laquelle la «ma-

Tableau 1
Aberrations moléculaires et traitements ciblés dans les néoplasies hématologiques.

Maladie	Aberration chromosomique	Gène de fusion ou mutation	Traitement ciblé
LPA, LMA M3	t(15;17)(q22;q21)	*PML-RARA*	ATRA (Vesanoid®)
LMC	t(9;22)(q34;q11)	*BCR-ABL1*	Imatinib (Glivec®) Nilotinib (Tasigna®), Dasatinib (Sprycel®), Bosutinib (Bosulif®, approuvés aux Etats-Unis dans le traitement de seconde ligne) Ponatinib (en phase d'expérimentation clinique)
MPN	–	*JAK2* V617F	Ruxolitinib (Jakafi®)
LEC	–	*FIP1L1-PDGFRA*	Imatinib (Glivec®)
Mastocytose	–	*KIT* D816V	Résistante à l'imatinib
LMA	–	*FLT3* ITD	Sorafénib (Nexavar®)

jor molecular response» (MMR) correspond à un équivalent de 0,1% de transcrits *BCR-ABL1*. Selon les recommandations européennes de 2009, la MMR doit être obtenue après 18 mois de traitement d'imatinib. Des données récentes montrent qu'une réponse moléculaire précoce après 3 (<10% de *BCR-ABL1*) ou 6 mois (<1% de *BCR-ABL1*) d'imatinib va de pair avec un meilleur pronostic en termes de survie sans progression et de survie globale [6]. Ces objectives restent encore à établir avec les nouveaux TKI plus puissants. Le contrôle de l'évolution moléculaire permet en outre la détection précoce de résistances, souvent causées par des mutations de la partie *ABL* du gène *BCR-ABL1* identifiables par le séquençage. Les éventuels changements de traitement se décident sur la base de la résistance *in vitro* [7, 8].

Néoplasies myéloprolifératives – JAK2 V617F

La mutation ponctuelle *JAK2*-V617F se retrouve chez 95% des patients atteints de polycythémie vraie et chez plus de 50% des patients avec thrombocythémie essentielle ou myélofibrose primaire (PMF). La mutation *JAK2* V617F est un marqueur clonal qui permet de distinguer une néoplasie myéloproliférative d'un phénomène réactionnel. L'analyse se fait par PCR allèle spécifique. Plusieurs inhibiteurs du JAK2 se trouvent en phase d'expérimentation clinique, mais ces substances manquent pour l'instant de spécificité pour la séquence mutée. L'inhibition simultanée du JAK2 non muté conduit à des cytopénies empêchant l'administration de doses optimales. Le ruxolitinib, qui est approuvé en Suisse dans la PMF, produit une réduction de la splénomégalie et une amélioration symptomatique indépendamment du statut mutationnel JAK2 [9]. Le contrôle de l'évolution des allèles *JAK2* mutés ne démontre cependant que peu de réponse moléculaire.

Leucémie éosinophile chronique – FIP1L1-PDGFRA

La fusion génique *FIP1L1-PDGFRA* peut être présente dans la leucémie éosinophile chronique (LEC). Cette translocation intrachromosomique située sur le chromosome 4 fait suite à une délétion de 800 kilobases non détectable par la cytogénétique conventionnelle. Comme il existe fréquemment plusieurs transcrits de fusion simultanés, on fait appel à la méthode de la «nested PCR», une réaction PCR à deux phases qui offre une meilleure sensibilité. Les patients porteurs de la fusion génique *FIP1L1-PDGFRA* présentent une bonne réponse à l'imatinib 100 mg/jour et atteignent une rémission complète durable. Comme dans la LMC, on observe parfois l'apparition d'une résistance sous imatinib. La cause a été identifiée sous la forme d'une mutation T674I dans le gène *PDGFRA*, qui correspond à la mutation T315I dans le gène *BCR-ABL1*. Les deux mutations, qui sont fortement résistantes à l'imatinib, au nilotinib et au dasatinib, répondent en revanche bien au nouveau TKI ponatinib [10]. On a récemment détecté des mutations ponctuelles activatrices dans le gène *PDGFRA* chez des patients atteints de LEC sans *FIP1L1-PDGFRA* [11].

Mastocytose – c-kit

La mutation D816V dans le gène *KIT* est propre à la mastocytose. La détection se fait sur un prélèvement de moelle osseuse, car le sang périphérique contient souvent trop peu de mastocytes. Pour éviter les faux négatifs, il faut recourir à une PCR en temps réel allèle spécifique. Un c-kit porteur de la mutation D816V est résistant à l'imatinib [12].

Leucémie myéloïde aiguë – FLT3 ITD

Les *FLT3* ITD (internal tandem duplications) sont des segments de gènes dédoublés de taille variable (3 à 400 paires de bases) dans les exons 14 et 15 du gène *FLT3*. Ils se retrouvent chez 25–30% de patients adultes atteints de leucémie myéloïde aiguë (LMA) et constituent donc les aberrations géniques les plus fréquentes à part des mutations *NPM1* dans la LMA. Il s'agit souvent d'aberrations secondaires accompagnées fréquemment d'un nombre de leucocytes très élevé. Des clones et des sous-clones avec *FLT3* ITD peuvent disparaître et réapparaître au cours de l'évolution de la maladie. Les *FLT3* ITD sont associés à un pronostic défavorable et à un fort taux de récidives; cette remarque vaut aussi si les *FLT3* ITD coexistent avec une mutation *NPM1* qui à elle seule constitue un facteur pronostic favorable [13, 14].
Les *FLT3* ITD se détectent lors du diagnostic et du suivi par PCR qualitative. Compte tenu de l'hétérogénéité des ITD, on ne dispose pas pour l'heure de méthode PCR en temps réel suffisamment sensible, car il faudrait pour cela composer une réaction PCR individuelle chez chaque patient. Il s'est avéré qu'une élévation des molécules *FLT3* mutées constitue un bon indicateur du risque de récidive. Le TKI sorafénib s'utilise en combinaison avec la chimiothérapie chez les patients réfractaires au traitement ou lors de rechutes. En monothérapie, il offre d'autre part une option thérapeutique chez les patients âgés n'entrant pas en ligne de compte pour une chimiothérapie à hautes doses [15, 16].

Perspectives

La nouvelle technique «Next Generation Sequencing» permet désormais de séquencer de manière simple et économique la totalité d'un exome ou d'un génome. On a déjà pu identifier une multitude de nouvelles mutations pouvant servir de marqueurs moléculaires pour le diagnostic, le pronostic et le suivi de maladies hématologiques. Elle a par ailleurs permis la découverte de nouveaux mécanismes pathogéniques extrêmement intéressants, comme les mutations du spliceosome dans les syndromes myélodysplasiques [17]. Ces nouveaux marqueurs vont servir de molécules cibles pour de nouveaux médicaments spécifiques et ne vont pas tarder à être utilisés dans le cadre du diagnostic moléculaire.

Correspondance:
Dr pharm. Elisabeth Oppliger Leibundgut
Clinique universitaire d'hématologie
Hôpital de l'Isle, Berne
Freiburgstrasse 4
CH-3010 Berne
Elisabeth.OppligerLeibundgut[at]insel.ch

La liste complète des références numérotées se trouve sous www.medicalforum.ch.