

PLACE DE LA CYTOGENETIQUES MOLECULAIRE ET DES THERAPIES CELLULAIRES EN HEMATO-ONCOLOGIE

PR KOFFI GUSTAVE

Professeur Titulaire d'hématologie clinique

guskof1@yahoo.fr

Problématique

Comme pour la quasi-totalité des pays du continent, on ne dispose que de données partielles sur le profil du cancer en Côte d'Ivoire. En 1994, il a été créé un registre du cancer basé sur la population d'Abidjan et ses environs. Malheureusement, ce registre est tombé en désuétude depuis 2005 pour diverses raisons dont l'arrêt du financement par le CIRC (centre international de recherche contre le cancer OMS de Lyon). La Côte d'Ivoire s'est dotée d'un plan stratégique de lutte contre le cancer en 2009 (Programme National de Lutte contre le Cancer). Ce pays s'est ouvert à des collaborations auprès d'agences internationales telles que l'OMS et l'AIEA (Agence Internationale de l'Energie Atomique).

L'OMS estime entre 15000 et 20000 le nombre de nouveaux cas de cancers par an. Selon les chiffres GLOBOCAN de 2008, l'incidence du cancer est de 83/100000 chez les hommes et 101,9/100000 chez les femmes. Les principaux cancers sont les cancers de la prostate, du foie, du poumon, les lymphomes non-Hodgkiniens chez les hommes et le cancer du col de l'utérus, du sein, du foie et de l'estomac chez la femme. Chez l'enfant, le cancer le plus fréquent est le lymphome de Burkitt (6/100000). L'épidémiologie des cancers en Afrique subsaharienne est dominée par les causes infectieuses : hépatite B et hépatite C pour le cancer du foie, papilloma virus pour le cancer du col, et virus Epstein-Barr pour le lymphome de Burkitt. Le tabagisme (20% de la population jeune) et l'alcoolisme en zone urbaine sont d'autres fléaux.

La mortalité est élevée. La survie à 5 ans tous cancers confondus est estimée à 20% : à titre indicatif, la survie en France est évaluée entre 60% et 90% pour les principaux cancers (87% pour le cancer du sein). Le taux de mortalité est de 70/100000 chez les hommes et de 74/100000 chez les femmes. A titre indicatif, ils sont en France respectivement de 133/100000 pour les hommes et de 73/100000 pour les femmes. Il est possible que ces chiffres soient sous-estimés. De plus, la mortalité par cancer est bien évidemment influencée par l'âge de la population, l'espérance de vie et la prévalence des décès de causes infectieuses. Les difficultés structurelles sont immenses : l'absence de couverture universelle, l'éloignement et les difficultés de transport représentent des obstacles importants en termes d'accès aux soins.

Le retard au diagnostic et consécutivement la prévalence des formes avancées limitent l'efficacité des soins notamment pour la chirurgie. Les causes du retard au diagnostic sont probablement multiples et intègrent des facteurs économiques, logistiques et culturels avec une place de la médecine traditionnelle (« tradithérapie »). Les plateaux techniques sont limités. Ainsi, la Côte d'Ivoire est dépourvue de centre de médecine nucléaire (pas de scintigraphie, pas de TEP). L'endoscopie est absente dans les zones rurales. L'anatomie pathologique est largement insuffisante : deux unités pour l'ensemble du pays, 8 pathologistes, 5000 spécimens par an et ce pour 23 millions d'habitants ! L'activité diagnostique est d'ailleurs souvent délocalisée par l'intermédiaire d'une sous-traitance Nord-Sud ou Sud-Sud avec le Maghreb ou l'Afrique du Sud. Au total, la confirmation histologique du cancer

n'est confirmée que dans 40% des cas avec des écarts importants et une très faible représentation des tumeurs où la biopsie représente un geste invasif complexe (confirmation des cancers du foie dans 6% des cas, et du cerveau dans 20% des cas).

La radiothérapie est absente en Côte d'Ivoire alors que 60% des patients seraient candidats à ce type de traitement. Un malade sur 12 pourra bénéficier de radiothérapie après transfert vers d'autres pays d'Afrique Noire (ex : le Ghana, bien mieux équipé), le Maghreb, ou l'Europe, avec des coûts élevés de prise en charge. Il est possible que la situation évolue avec un projet élaboré en coordination avec l'AEIA et la construction d'un centre de cancérologie à Abidjan.

L'accès aux médicaments est problématique. Si la plupart des médicaments conventionnels sont disponibles, ces produits sont payants. De plus, les médicaments ciblés sont quasiment impossibles à utiliser du fait de leur coût. Le traitement de la leucémie myéloïde chronique par le Glivec fait exception par l'intermédiaire du programme GIPAP mentionné plus haut. Toutefois, il convient de souligner plusieurs points relatifs à ce programme appliqué à l'Afrique de l'Ouest (Côte d'Ivoire, Congo, Sénégal) : l'aide a commencé avec un retard important en comparaison avec l'Afrique de l'Est (Afrique anglophone), la présentation de la LMC est souvent avancée (présence de signes généraux dans la majorité des cas, médiane de leucocytose à plus de 300000/mm³) et les résultats globaux sont relativement décevants par comparaison avec les études internationales (médiane de survie entre 48 et 60 mois). Cette moindre efficacité pourrait être liée à un déficit des plateaux techniques d'évaluation, à des problèmes d'observance, au stade avancé de la maladie (plus de 50% des patients présentent un indice de Sokal élevé) et à l'impossibilité de disposer des inhibiteurs de tyrosine kinase de deuxième génération (dasatinib, nilotinib).

Les techniques moléculaires prennent une place de plus en plus importante dans la stratégie diagnostique et surtout pronostique des hémopathies malignes. Si certains examens relèvent clairement de la recherche clinique, d'autres sont d'ores et déjà pris en compte dans la stratégie thérapeutique des cliniciens. Ces données, certes en perpétuelle évolution, doivent être prises en compte dès le stade du prélèvement afin d'optimiser la gestion de celui-ci.

I - Différentes techniques disponibles

La découverte quasi continue de nouveaux paramètres pronostiques conduit à utiliser un panel de techniques moléculaires de plus en plus étendu et sophistiqué. La technique moléculaire la plus simple est sans doute l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH). Les techniques d'amplification des acides nucléiques par réaction de PCR (Polymerase Chain Reaction) deviennent maintenant de pratique courante.

II – Les hémopathies malignes

II.1 Leucémies aiguës myéloïdes (LAM)

Les progrès thérapeutiques ont été extrêmement modestes au cours des 20 dernières années dans cette pathologie, principalement du fait de l'absence de développement de nouvelles molécules actives. Les quelques progrès réalisés, et ceux que l'on peut espérer pour le futur, découlent en fait d'une meilleure caractérisation du pronostic individuel de chaque patient. En pratique, il est aujourd'hui indispensable d'identifier dès le diagnostic les anomalies moléculaires associées à un pronostic favorable, permettant de ne plus proposer l'allogreffe de moelle osseuse en première

rémission complète. Outre la translocation t(15;17), qui constitue une réelle urgence thérapeutique, il est maintenant essentiel de mettre en évidence la translocation t(8;21) et l'inversion inv(16), ou les transcrits chimériques dérivés (ETO-AML1 et CBFβ-MYH11).

A côté de ces anomalies chromosomiques classiques, plusieurs anomalies géniques ont été récemment identifiées. La première est une duplication en tandem du gène FLT3 qui conduit à une activation constitutive de son activité tyrosine kinase. Associée à un pronostic péjoratif, cette anomalie est principalement observée dans les caryotypes normaux. Sa détection repose sur une analyse par PCR, puis analyse de fragments. La seconde anomalie plus récemment identifiée est le gène NPM1 également fréquemment mise en évidence chez des patients présentant un caryotype normal. Des données cliniques récentes suggèrent que la mise en évidence de ces mutations soit associée à un pronostic ne justifiant plus le recours systématique à l'allogreffe en première rémission complète.

Au final, le diagnostic de LAM impose aujourd'hui la recherche de facteurs pronostiques indispensables à une décision thérapeutique argumentée.

Outre le caryotype qui reste un examen pronostique de base, le recours à des techniques moléculaires doit être systématique, en tout cas pour les patients les plus jeunes, accessibles à une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (en pratique chez les patients de moins de 65 ans).

II.2 - Leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL)

A l'inverse des LAM, les LAL ont fait l'objet de progrès thérapeutiques extrêmement spectaculaires au cours des 30 dernières années, tout particulièrement chez l'enfant. Ces progrès sont essentiellement liés à 2 facteurs : d'une part la mise au point de protocoles de chimiothérapie combinant les différentes drogues actives dans une séquence particulière, et d'autre part la mise en évidence de groupes pronostiques très différents sur la base d'anomalies chromosomiques spécifiques. On peut ainsi estimer qu'aujourd'hui le pronostic global d'un enfant présentant une LAL est de l'ordre de 80 % de survie à 5 ans. Les résultats sont en revanche beaucoup plus décevants chez l'adulte.

Chez l'enfant, quatre anomalies chromosomiques spécifiques résument à elles seules le pronostic : l'hyper diploïdie, la translocation t(12;21), la translocation t(9;22), et les réarrangements du gène MLL. Alors que les deux premières sont associées à un pronostic excellent (de l'ordre de 90 % de survie à long terme), les deux dernières sont associées à un pronostic nettement plus péjoratif.

II.3 - Leucémie myéloïde chronique (LMC) et syndromes myéloprolifératifs chroniques (SMP)

Si la LMC est rare, le suivi de ces patients est devenu une des principales activités moléculaires des Laboratoires d'Hématologie. La raison de cette flambée d'examen est liée à l'extraordinaire efficacité de l'imatinib (Glivec®) dans le traitement de cette pathologie. Cet inhibiteur de l'activité tyrosine kinase d'ABL est devenu le traitement de référence des patients atteints de LMC, transformant cette pathologie en réelle maladie chronique (au sens non oncologique du terme), entraînant des remissions de très longue durée (sans qu'il soit encore possible de parler de guérisons). Le diagnostic et le suivi repose sur la cytogénétique moléculaire associant la cytogénétique conventionnelle à l'analyse moléculaire par la quantification par RQ-PCR des transcrits BCR-ABL. La prise en charge a dramatiquement été modifiée suite à l'arrivée d'inhibiteurs spécifiques de la fonction tyrosine kinase (ITK) de BCR-ABL, d'abord l'imatinib (GLIVEC®) puis le Dasatinib (SPRYCEL®) et le Nilotinib (TASIGNA®). Les marqueurs directs de réponse au traitement sont constitués des réponses cytologique, cytogénétique et moléculaire. Les suivis moléculaires et cytogénétiques permettent d'ajuster le traitement (augmentation de doses ; passage à un autre inhibiteur).

Plus récemment, une mutation spécifique touchant le gène JAK2 a été rapportée dans un nombre significatif de cas de syndromes myéloprolifératifs, essentiellement dans les polyglobulies de Vaquez (PV), dans les thrombocytemies essentielles (TE), et à un moindre degré dans les splénomégalies myéloïdes (SM). Ces mutations affectent toujours le même codon V617F, et peuvent donc être recherchées aisément par une RQ-PCR spécifique. Compte tenu de la fréquence extrême de cette mutation dans les cas de PV (de l'ordre de 95 à 98 %), cette analyse par RQ-PCR est devenue un test

diagnostique majeur en cas d'érythrocytose, de même que dans les cas de thrombocytose isolées. A coté du JAK2, d'autres anomalies moléculaires ont été identifiées en 2006 pour la mutation MPLW515L/K, et la mutation CALR (Calréticuline) en 2013 dans les autres syndromes myéloprolifératifs BCR/ABL négatifs.

II.4 - Lymphomes malins

Le diagnostic des lymphomes malins repose avant tout sur l'examen anatomo-pathologique de biopsies tumorales. Néanmoins, la description de nombreuses anomalies chromosomiques, plus ou moins spécifiques de sous-types lymphomateux, a suscité des demandes d'analyses moléculaires, essentiellement dans les cas de diagnostics difficiles.

Le principal problème rencontré vis-à-vis de ces demandes est constitué par la nature du matériel tumoral proposé. Ainsi, dans la plupart des cas, le matériel disponible consiste en des biopsies tumorales fixées dans le formol et incluses en paraffine. Ce matériel est loin d'être optimal pour les analyses moléculaires, que ce soit par FISH ou par techniques de PCR.

Néanmoins, les prélèvements congelés représentent un matériel utilisable pour les 2 techniques. Une autre bonne solution est la réalisation d'empreintes permettant l'application de techniques de FISH.

Les demandes les plus fréquentes concernent les suspicions de lymphome du manteau, caractérisés par la présence quasi constante (mais non absolue) de la translocation t(11;14), ou de son corollaire moléculaire, l'hyper expression de cycline D1. Les autres indications sont principalement la recherche d'une translocation impliquant le gène MYC (8q24) dans les cas de lymphomes de Burkitt. Cette recherche repose sur la cytogénétique ou sur la FISH interphasique.

Enfin, les demandes de recherche de t(14;18) dans les lymphomes folliculaires sont rares, cette translocation n'étant nullement spécifique de ce type de lymphome. Elle peut se faire par FISH ou par PCR multiplexe (une technique fondée sur l'amplification simultanée de plusieurs amplicons). L'absence de démonstration formelle d'utilité de la recherche de cette translocation moléculaire dans le suivi des patients ne justifie pas sa recherche en pratique clinique, en dehors d'essais thérapeutiques.

L'intérêt majeur de la biologie moléculaire dans le cadre des lymphomes demeure la recherche de clonalité. Le diagnostic d'un processus lymphomateux est le plus souvent réalisé par l'examen morphologique standard associé à un large panel d'anticorps monoclonaux. Ce diagnostic demeure dans certains cas difficile. Dans ces cas, le diagnostic de certitude passe par la mise en évidence d'une **monoclonalité des réarrangements des immunoglobulines (BCR) et du récepteur des cellules T (TCR)** par biologie moléculaire en amplifiant par PCR la région très polymorphe jonctionnelle propre à chaque lymphocyte.

D'autres lymphomes sont caractérisés par la présence du gène ALK sur le chromosome 2 dans les lymphomes anaplasiques à grandes cellules ALK positifs. Leur mise en évidence peut être nécessaire pour le typage précis d'un lymphome mais permet aussi de détecter au diagnostic la maladie minime sanguine et/ou médullaire et de suivre la maladie résiduelle après traitement. Dans les lymphomes anaplasiques à grandes cellules ALK positifs notamment, la détection d'une dissémination sanguine et/ou médullaire au diagnostic a une valeur pronostique péjorative.

II.5 - Leucémie lymphoïde chronique (LLC) et myélome

La démonstration récente de l'impact pronostique de certaines caractéristiques chromosomiques et moléculaires justifie l'analyse de certaines d'entre elles. Toute la difficulté aujourd'hui est de définir quelles sont celles qui doivent être recherchées de manière plus ou moins systématique en dehors d'essais thérapeutiques. En l'absence de consensus, le minimum est sans doute de rechercher une del(17p) par FISH au diagnostic des patients présentant une LLC de stade B ou C. La recherche d'autres anomalies chromosomiques comme la del(11q) ou la trisomie 12 sont beaucoup plus discutables. De

même, l'évaluation du statut mutationnel du gène IGH, même s'il différencie 2 classes pronostiques, ne se justifie pas en routine compte tenu des aspects techniques.

Dans le myélome, la démonstration de l'impact pronostique fort de certaines anomalies chromosomiques justifie une analyse par FISH au diagnostic (15). Celle-ci devrait se limiter (en l'état actuel des connaissances) à la recherche de la translocation t(4;14) et de la del(17p). Néanmoins, il faut avoir conscience des difficultés techniques de cette analyse, une reconnaissance ou un tri des plasmocytes étant absolument requis avant l'analyse FISH.

III. Thérapies Cellulaires

Pour de nombreuses tumeurs, la relation dose-efficacité de la chimiothérapie est bien démontrée, mais utiliser ces médicaments à très fortes doses expose l'organisme à des toxicités limitant leurs administrations dont la plus fréquente est la toxicité hématologique ; celle-ci peut être palliée par la transplantation de cellules souches hématopoïétiques (TCSH) récoltées à partir des cellules souches du sang périphérique (CSSP) d'un donneur ou dans sa moelle osseuse pour repeupler celle du receveur. La TCS peut être soit allogénique cela implique la TCSH d'un individu chez un autre, elle est dite syngénique lorsque le donneur est un jumeau identique ; soit autogénique lorsque les cellules souches utilisées sont celles du patient lui-même.

Dans le cas d'une allogreffe, les indications sont :

Maladies malignes : Leucémies, lymphomes, myélomes, Syndrome myélodysplasique. Neuroblastome.

Maladies non malignes : Aplasies médullaires constitutionnelles (maladie de Fanconi) ou Acquisées, Déficit immunitaires combinés sévères, Hémoglobinopathies (thalassémie, drépanocytose), Déficit enzymatique portant sur le tissu hématopoïétique (maladie de Gaucher,...).

Pour une autogreffe, les indications sont :

Hémopathies malignes (environ 85%) , Leucémies, lymphomes, myélomes, Maladie de Hodgkin, Myélodysplasies. Certaines tumeurs solides (sein, ovaires, testicules, poumons, système nerveux,...).

On identifie un donneur compatible en comparant les antigènes d'histocompatibilité ; ce sont des antigènes présents sur quasi toutes les cellules et propres à un individu, ce qui permet de le différencier des autres individus de la même espèce à l'exception des jumeaux monozygotes qui présentent toujours un génotype HLA identique. Ce système majeur d'histocompatibilité joue un rôle prédominant en matière d'immunité d'allogreffe et dépend d'une région chromosomique unique.

Cette région comporte à la fois des gènes générateurs d'antigènes responsables de la formation d'anticorps et d'autres responsables de la stimulation de réactions à médiation cellulaire (ex. : lymphocytes T). Le système humain d'histocompatibilité (HLA : Human Leucocyte Antigen) comprend les antigènes de classe I (HLA A, B et C) et de classe II (HLA D).

Pour une greffe de moelle, il faut que le donneur et le receveur soient HLA identiques, c'est-à-dire en pratique que les 6 antigènes (3 venant du père et 3 de la mère) HLA A, B et DR (approximation du locus HLA D) soient identiques. Des greffes partiellement incompatibles peuvent être réalisées sous certaines conditions.

Le donneur peut être aussi soit le frère ou la sœur du receveur présentant un génotype HLA identique, un chromosome étant apporté par chaque parent, la probabilité que le frère ou la sœur ait un génotype

identique est de 25%. Environ 30 % des patients susceptibles d'être greffés ont un donneur 'idéal' (jumeau monozygote ou frère histocompatible). Sinon, le donneur est choisi sur base d'un phénotype HLA identique, par exemple, un parent donneur pour son enfant et inversement ou un donneur non apparenté. En matière de greffe non apparentée, le recours aux CSH de sang placentaire devient de plus en plus fréquent.

Conclusion

En 2020, il n'est plus possible de prendre en charge convenablement des patients présentant une hémopathie maligne sans avoir recours à un minimum d'examens s'appuyant sur les techniques de biologie moléculaire considérées au sens large et incluant donc la FISH, principalement pour l'évaluation du pronostic. Cette nécessité a pour corollaire de connaître ces examens indispensables, afin d'orienter convenablement les prélèvements sanguins, médullaires ou tumoraux lors des prélèvements initiaux.

