

## Journées de Biologie Clinique

### Discours d'introduction par le nouveau président des JBC, Marc Delpach.

#### *1ère session : Immunologie-Infectiologie (modérateurs : Marc Delpach et Anne-Marie Fischer)*

##### **Immunothérapie des cancers, E. Tartour**

Idée déjà évoquée dès la fin du 19e siècle, beaucoup de nouvelles molécules ont été développées ces dernières années. La première stratégie visait à utiliser des effecteurs du système immunitaire (anticorps, CAR-T : *Chimeric Antigen Receptor T*) ou à le stimuler (IL-2, vaccins).

Une nouvelle approche a été de réduire l'effet des populations immuno-suppressives ou régulatrices (Treg, macrophages M2) par diminution des molécules inhibitrices telles que CTLA-4, PD1. Développement des anticorps anti CTLA-4 et surtout des anti-PD1 dont le nombre d'indications explose après la mise en évidence de résultats spectaculaires dans plusieurs types de cancers.

Au niveau clinique, il apparaît parfois une augmentation du volume tumoral suivie d'une diminution suite à ce type d'immunothérapie, cela s'explique par la création d'une inflammation et une infiltration de la tumeur par des cellules immunitaires. La levée des systèmes immuno-régulateurs entraîne logiquement des effets secondaires de type auto-immunité, plus fréquents avec les anti-CTLA-4.

Le coup important de ces traitements nécessite la recherche de biomarqueurs afin de choisir les patients éligibles à l'immunothérapie. L'expression de PDL1 par la tumeur semble être un bon candidat mais le manque de standardisation des tests pose problème.

L'étude du mécanisme d'action montre l'induction d'une prolifération des lymphocytes T dans le micro-environnement tumoral, cependant une réponse immunitaire pré-existante conditionne cette activation lymphocytaire et donc l'efficacité du traitement. Les tumeurs à fort taux de mutations qui stimulent plus le système immunitaire sont donc les plus sensibles aux anti-PD1.

Le ou les biomarqueurs devront prendre en compte les caractéristiques de la tumeur et de son micro-environnement.

D'autres cibles d'anticorps sont actuellement en développement, certaines associations d'anticorps sont à l'étude mais l'auto-immunité pourrait être potentialisée. Pour le cas des patients non répondeurs, les essais visent à créer une réponse immunitaire via des vaccins ou des cytokines avant de pouvoir utiliser une de ces nouvelles biothérapies.

##### **Résistance aux antibiotiques : une maladie émergente, P. Courvalin**

*Acinetobacter baumannii* est un bacille gram négatif aérobio responsable d'infections nosocomiales. Il s'agit d'un pathogène opportuniste dont la multirésistance s'explique par des mécanismes intrinsèques (faible perméabilité membranaire, pompes d'efflux, céphalosporinases) et des mécanismes acquis (transfert horizontal de gènes de résistance ou sur-expression des systèmes constitutionnels)

La résistance croisée se définit par un mécanisme conférant une résistance à toute une classe d'antibiotiques. Leur détection se fait en général par les molécules les moins actives puisqu'elles sont plus facilement touchées par cette résistance.

La résistance aux aminosides par méthylation de la petite sous unité du ribosome (diminution de l'affinité cible-antibiotique) est due au gène *ArmA*.

La co-résistance désigne l'association de plusieurs mécanismes de résistance de manière stable. Le gène *ArmA* est porté par un plasmide et fait partie d'un transposon composite (c'est à dire qu'il est encadré par 2 séquences d'insertions) sur lequel se trouve plusieurs autres gènes de résistance.

La résistance croisée étendue correspond à un seul mécanisme conférant une résistance à des antibiotiques de classes différentes. Par exemple, les pompes d'efflux sont un système énergie-dépendant permettant aux bactéries d'exporter des produits de leur catabolisme, voir des antibiotiques lorsque le mécanisme est sur-exprimé. Cette résistance a un coût biologique qui induit une perte de fitness pour la bactérie, néanmoins un système de senseur-promoteur régule l'expression des pompes d'efflux selon la présence du signal. De même, certaines mutations compensatoires compensent la perte de fitness et fixe la résistance.

Les inhibiteurs de pompes d'efflux sont peu spécifiques, leur action sur des cibles cellulaires est à l'origine de nombreux effets secondaires, donc non utilisables en thérapeutiques.

### **Génétique des populations et immunologie chez l'homme : une vision évolutive, L. Quintana-Murci**

Depuis la séquence complète du génome humain en 2001, des consortiums internationaux ont été créés pour caractériser la variabilité génétique de l'espèce humaine. La notion de séquence de référence du génome humain n'a aucun sens puisque chaque individu diffère de 10 000 mutations. Un humain peut porter jusqu'à 300 gènes dont la fonction est perturbée dont 100 mutations hétérozygotes associées à des maladies décrites.

Pour comprendre les forces influençant la diversité du génome humain (recombinaison, mutations, forces démographiques), il est intéressant de se baser sur les maladies infectieuses qui sont une cause majeure de mortalité et donc de sélection naturelle puisque l'immunité présente un phénotype très variable selon les individus.

L'étude de la sélection naturelle permet d'en distinguer plusieurs types :

- sélection purificatrice : fait disparaître les mutations délétères, sur les gènes ne pouvant pas se permettre d'accumuler les mutations (mutations associées à des maladies sévères)
- sélection positive : conserve une mutation protégeant d'une infection (ex : paludisme)

Le comportement des gènes de l'immunité innée soumis à une pression de sélection permet de distinguer les senseurs/récepteurs microbien (ex : TLRs) ayant un rôle essentiel et non redondant qui évoluent selon un mode de sélection purificatrice.

Une mutation ayant augmenté en fréquence est un signe d'avantage évolutif. Certaines mutations sous sélection positive confèrent un risque plus important de maladies inflammatoires malgré une protection plus importante contre des infections bactériennes.

Ces travaux sur tous les gènes de l'immunité innée (1500 gènes étudiés sur 1000 génomes humains) ont démontré qu'ils acquièrent moins de diversité que le reste de l'immunité.

L'identification des mutations ayant donné un avantage sélectif a permis une datation entre 6000 et 13000 ans correspondant au passage à un mode de vie sédentaire.

De plus en plus de mutations sont trouvées dans les régions non codantes, essentielles à la régulation de l'expression génique. Il est par conséquent utile de comparer l'expression génique avant et après infection par eQTL mapping. Le génotype n'a pas d'impact à l'état basal mais en aura un si la cellule est stimulée (interaction gène/environnement).

La variabilité épigénétique est étudiée grâce au modèle de la méthylation de l'ADN qui est influencée par notre environnement. Une partie de cette méthylation est transférable. Les changements d'habitat ou de mode de vie ont un impact démontré sur la méthylation mais pas sur les mêmes gènes.

*2e session : Hématologie (modérateurs : Anne-Marie Fischer, Dominique Helley)*

**Syndromes myélodysplasiques : impact de la biologie, L. Adès**

Pathologie du sujet âgé, les SMD représentent 20% des causes d'anémies dans cette population. Les causes sont encore assez peu connues, même si certains facteurs favorisants ont été identifiés : expositions à des toxiques, chimiothérapie, maladie de Fanconi, ...

Au niveau physiopathologique, des mutations de la cellule souche, ainsi que des anomalies du stroma médullaire et une modification de la réponse immunitaire entraînent une hématopoïèse inefficace. Des mutations additionnelles conduisent à l'évolution vers une transformation leucémique.

Plusieurs scores mis au point pour établir un pronostic. L'IPSS sur lequel repose le traitement est basé sur des paramètres cliniques assez simples. L'IPSS-R tient compte en plus de la nouvelle classification cytogénétique.

Le traitement dépend du score IPSS, les formes peu graves reçoivent essentiellement de l'EPO et du lenalidomide en cas de délétion 5q-. Pour les formes sévères, le seul traitement curateur est l'allogreffe (avant 70 ans), la survie médiane étant de 2 ans même sous traitement

Le profil des mutations retrouvées est très hétérogène, les gènes touchés sont impliqués dans différentes voies : régulateur épigénétique, épissage, tyrosine kinase, transcription, ...

Certaines mutations ont un pronostic défavorable mais pouvant être corrigé avec le traitement adéquat, leur nombre agrave aussi le diagnostic. Les réponses à certains traitements diffèrent en fonction du profil cytogénétique.

Il faut noter que ces mutations sont aussi très fréquemment rencontrées chez des patients âgés ne présentant pas d'hémopathies, leur présence expose tout de même à un risque plus important de développer ces maladies.

Ces résultats posent la question de la place de la thérapie ciblée comme traitement futur de ces maladies, le développement de plusieurs molécules est en cours dont les très prometteurs inhibiteurs d'IDH2.

La cytologie reste la pierre angulaire du diagnostic, les aspects morphologiques sont parfois d'excellents indicateurs des mutations présentes (SF3B1 corrélé à 98% à la présence de sidéroblastes en couronne). La cytométrie en flux est une approche compliquée pour le diagnostic des SMD, elle peut néanmoins être utile pour les diagnostics douteux ou difficiles.

**Actualités du myélome, JP Fermand**

Trois entités se distinguent, la gammopathie monoclonale de signification indéterminée (MGUS), le myélome multiple symptomatique et enfin une situation intermédiaire, le myélome multiple indolent (MMI). La question est de savoir quels MGUS et myélomes indolents il faut traiter.

Les MGUS doivent être traités lorsqu'une pathologie est associée à l'immunoglobuline monoclonale : dépôts d'anticorps, activité auto-anticorps. Ces entités sont nommées Gammopathie Monoclonale de Signification Clinique.

Il est indispensable de pratiquer une protéinurie répétée devant toute gammapathie monoclonale à la recherche de chaines légères ou d'une albuminurie (néphropathie glomérulaire de l'amylose). Le dosage de la beta2-microglobuline est utile seulement lors du diagnostic pour le pronostic, il est inutile de répéter l'examen.

Les MMI à très haut risque de transformation doivent être traités, les critères sont une plasmocytose médullaire > 60%, des anomalies à l'IRM, un ratio CLL sériques > 100.

Le traitement du myélome symptomatique dépend de l'âge du malade.

Pour les patients âgés de plus de 65 ans, l'association du thalidomide (anti-angiogénique) au traitement de référence melphalan- prednison a amélioré la survie. Le bortezomib (inhibiteur du protéasome) a lui aussi prouvé son efficacité, il est préféré au thalidomide en cas d'insuffisance rénale. L'association dexaméthasone-lénalidomide (anologue du thalidomide) va devenir le traitement de référence du myélome

Pour les patients âgés de moins de 65 ans, un traitement plus intensif est permis par une autogreffe : recherche d'un effet-dose par augmentation de la dose du melphalan. La ré-injection de précurseurs hématologiques du sang périphérique permet de diminuer la durée d'aplasie. De nouveaux protocoles d'inductions sont apparus avec thalidomide, bortezomib, dexamethasone. L'association Bortezomib-thalidomide-dexaméthasone peut être utilisée en consolidation après l'autogreffe.

Les traitements d'entretien permettent de retarder la rechute mais pas d'améliorer la survie, ils ne sont pas utilisés en France.

D'autres molécules sont à l'étude : pomalidomide, autres inhibiteurs du protéasome (compétitifs, irréversibles), anticorps monoclonaux anti-plasmocytes (anti-CS1/Slam7, anti-CD38).

### **Cytogénétique et hématologie, I.Radford-Weiss**

Le diagnostic des hémopathies malignes est multidisciplinaire : caractère morphologique, caractéristiques immunologiques, caractéristiques génétiques (biologie moléculaire et cytogénétique). L'identification d'anomalies génétiques a une valeur d'aide au diagnostic, pronostique et thérapeutique. La cytogénétique conventionnelle (caryotype), moléculaire (FISH) et la biologie moléculaire sont de sensibilité différente mais complémentaire.

L'examen doit porter sur le clone pathologique : moelle osseuse, ganglions, rate, sang (si blastes > 20%) et doit être effectuée avant traitement. Les anomalies, recherchées sur au moins 20 mitoses peuvent porter sur le nombre ou la structure des chromosomes, un clone est défini par 2 ou 3 cellules (sur les 20) selon le type d'anomalie.

L'hybridation in situ ou FISH repose sur les propriétés de complémentarité de l'ADN, l'observation se fait au microscope à fluorescence après hybridation avec des sondes fluorescentes. Le choix du type de sonde (sonde de peinture, sonde centromérique, sonde locus spécifique,...) dépend de l'information recherchée.

Dans la pratique quotidienne la cytogénétique permet

- D'adapter le traitement : identification des répondeurs à l'ATRA dans les LAM3 avec t(15;17), SMD avec délétion 5q-, LMC et translocation t(9;22)
- De modifier un pronostic : pronostic sévère pour LLC avec délétion 17p-
- De poser un diagnostic lorsque la cytologie ne le permet pas : SMD, formes frontières de lymphomes, ...

Les nouvelles techniques de cytogénétique telles que la CGH (cooperative genomic hybridation) permettent d'avoir une vision globale et de visualiser des gains et pertes de matériel non visibles en cytogénétique classique. Néanmoins, elles ne détectent pas les anomalies équilibrées et nécessitent au moins 50% de cellules tumorales. Du côté de la biologie moléculaire, le NGS (Next Generation Sequencing) fait son apparition et promet de révolutionner les méthodes de diagnostic... Ces dernières années, le métier de cytogénéticien a évolué du ciseau au séquençage !

### **Quel bilan pour une thrombophilie en 2016 ? G. Meyer**

L'incidence de la maladie thromboembolique veineuse (MTEV) est d'environ 15 pour 10 000 habitants  
Les facteurs de risques peuvent être :

- Acquis : âge, antécédents de MTEV, cancers, chirurgie, immobilisation, traitements hormonaux, grossesse, SAPL, syndromes myéloprolifératifs
- Génétiques : déficit en antithrombine, PC, PS, facteur V Leiden, Facteur II G20210A, Groupe non O
- Mixtes : facteur VIII, XI, X élevées, hyperhomocystéinémie

Les facteurs de risques majeurs sont la chirurgie, les cancers et les traumatismes puisque retrouvés dans 50% des thromboses. Toutefois 20-30% des thromboses restent non expliquées par la clinique ou la biologie.

Un bilan de thrombophilie a pour but d'optimiser la durée du traitement ou d'estimer le risque dans la famille pour instituer une prophylaxie primaire.

Le cancer est un cas particulier : il faut traiter jusqu'à rémission ou durant la durée du traitement anticancéreux.

Dans les autres cas, il est recommandé d'interrompre le traitement au bout de 3 mois si le risque de récidive est faible (chirurgie, traumatismes).

Pour le reste, le discours dominant est « traitez-les tous » puisque le risque de récidive est élevé, alors que le traitement est efficace et très bien toléré.

Il faut choisir entre un traitement de 6 mois et un traitement à vie car si arrêt au bout de 2 ans, la courbe des récidives rejoint celle du placebo, mais dans un cas de traitement à vie, le risque cumulé d'hémorragie devient supérieur au risque cumulé de récidive de thrombose. De plus les hémorragies majeures tuent 3 fois plus que les récidives thromboemboliques...

En pratique, il faut sélectionner les malades à risques au moyen de scores prédictifs de récidives (DASH, Vienna, HERDOO2).

Les principales anomalies de coagulation peuvent aider à la prise de décision dans les cas difficiles (1er épisode, hommes jeunes, femmes sans facteur hormonal). Après 60 ans ou s'il existe une cause majeur de thrombose, il vaut mieux ne pas faire de recherche de thrombophilie.

Mathieu Fusaro