



ACADÉMIE NATIONALE DE PHARMACIE

SANTÉ PUBLIQUE - MÉDICAMENT - PRODUITS DE SANTÉ - BIOLOGIE - SANTÉ ENVIRONNEMENTALE

Fondée le 3 août 1803 sous le nom de Société de Pharmacie de Paris

Personnes morales de droit public placées sous la protection du Président de la République

« Intérêts et limites de l'étude de l'ADN/ARN en biologie médicale en 2017 »

Séance thématique

Sous le Haut-Patronage de Madame la Ministre des Affaires Sociales et de la Santé

Mercredi 15 mars 2017 à 14 h 00

Salle des Actes

Faculté de Pharmacie de Paris

Université Paris Descartes

4 avenue de l'Observatoire Paris 6

Programme

14 h 00 **Accueil par Claude VIGNERON**, *Président de l'Académie nationale de Pharmacie*

14 h 05 **Introduction générale**

Frédéric ÉBERLÉ, *membre de l'Académie nationale de Pharmacie*

14 h 15 « **Le typage moléculaire des leucémies et lymphomes** »

Pr Marie-Christine BÉNÉ, *Laboratoire d'hématologie, CHU Nantes*

Le développement de la biologie moléculaire en hématologie a permis l'identification de nombreuses anomalies associées de façon étroite à des pathologies spécifiques. Le plus grand succès est sans doute celui de la translocation t(15;17) conduisant au gène de fusion PML-RARA accessible à une thérapie ciblée double et maintenant bien comprise, à base d'acide tout-trans rétinoïque et d'arsenic, permettant une quasi guérison des leucémies aiguës promyélocytaires (LAM3). Juste derrière, ou au coude à coude, se trouve le chromosome Philadelphie, la translocation t(9;22) conduisant au transcrit de fusion BCR-ABL. On se trouve ici devant la cohorte impressionnante de patients atteints de leucémie myéloïde chronique, dont le pronostic et l'espérance de vie se sont vus transformés par l'avènement des inhibiteurs de tyrosine kinase. Dans les leucémies aiguës lymphoblastiques qui présentent la même anomalie (Phi+) ou des remaniements moléculaires proches (Phi-like), l'exploration de ces caractéristiques peut également renverser le pronostic.

La situation est plus complexe pour les autres leucémies aiguës myéloïdes (LAM) où la valeur pronostique des mutations de la nucléophosmine (NPM1) et de FLT3 (*fems*-like receptor tyrosine kinase) est variable en fonction de leur association. Plus récemment, d'autres anomalies sont entrées dans l'arsenal diagnostique, soit pour leur poids pronostique conduisant à envisager une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, soit en raison du développement de thérapies ciblées. Les dernières recommandations de l'European LeukemiaNet et de l'Organisation Mondiale de la Santé les prennent en compte.

Dans le domaine des lymphomes, la caractérisation de la cellule d'origine (COO) porte un poids pronostique amenant à guider le traitement selon que l'on a affaire à un lymphome de cellules folliculaires (GC) ou activées (ABC). Cette caractérisation repose sur des signatures protéiques accessibles en anatomopathologie ou sur des signatures moléculaires. Par ailleurs, les lymphomes B sont porteurs d'anomalies moléculaires associées à leur type immunophénotypique/cytogénétique, avec là encore des facteurs pronostiques et des cibles théranostiques.

L'ensemble de ces aspects sera évoqué et illustré.

14 h 45 « *Indications de la détection de l'ADN fœtal dans le diagnostic prénatal* »

Pr Damien SANLAVILLE, *Service de génétique, Centre de biologie et de Pathologie Est, Lyon*

Depuis les années 70, le **diagnostic prénatal** s'est développé en France, conduisant à la création fin des années 90 à la constitution des centres de diagnostic prénataux (CPDPN) et le développement de la médecine fœtale.

Dans ce cadre, différents types d'examen peuvent être proposés aux couples dans un but étiologique. Parmi ces examens, les tests génétiques occupent une grande place, en particulier la réalisation d'un **caryotype fœtal** dans le cadre du programme de dépistage de la trisomie 21. Afin de réaliser les examens génétiques, de cytogénétique ou de génétique moléculaire, il faut réaliser un **prélèvement invasif** comme une ponction de villosités choriales (choriocentèse) ou de liquide amniotique (amniocentèse). Néanmoins plusieurs complications sont liées à ces gestes invasifs, dont le risque de **fausse couche** estimée entre 0,5 et 1 %.

En France, ces dernières années, environ 700 000 femmes effectuent un test de dépistage de la trisomie 21 et environ 45 000 caryotypes fœtaux sont réalisés sur les 800 000 grossesses annuelles.

En 1997, Lo *et al*, ont identifié, dans le sang maternel de l'**ADN fœtal libre circulant**. À partir de ces découvertes, ont été développés plusieurs tests génétiques. Ces tests ont pour principal avantage, outre le fait qu'ils ne soient pas invasifs, d'éliminer le risque de fausses couches suite au prélèvement.

Les premiers tests développés sont des tests **diagnostics** basés sur la recherche d'une séquence génomique absente du génome maternel comme séquences d'ADN spécifiques du gène *SRY* pour le diagnostic de **sexes fœtal** ou du gène *RHD* pour les femmes **rhésus négatif**.

Par la suite se sont développés des tests de **dépistage** en particulier grâce à la mise au point des techniques de séquençage massif en parallèle (NSG, Next Generation Sequencing). Le test le plus médiatisé est sans aucun doute le DPNI pour la **trisomie 21**. Le terme DPNI sous-entend dépistage prénatal non invasif de la trisomie 21. Il s'agit toutefois d'un mauvais terme, car le test de dépistage combiné du premier trimestre est également un test non invasif. Le terme anglo-saxon est « cell-free DNA (cfDNA) based non-invasive prenatal testing » résumé souvent par NIPT (Non Invasive Prenatal test). La haute autorité de Santé recommande le terme de « test ADN libre circulant dans le sang maternel dans le dépistage de la trisomie 21 fœtale ». De nombreux articles scientifiques ont validé l'intérêt et l'efficacité de ce test. À titre d'exemple, la valeur prédictive positive (VPP) du test combiné du premier trimestre est de 4 % (données de l'Agence de la biomédecine) alors que la VPP du DPNI pour une population à risque de trisomie 21 fœtale est d'environ 90% (Taylor-Phillips *et al*, 2016). Par ailleurs, ce test est devenu disponible en France il y a environ 3 ans et son coût ne cesse de baisser. La Haute Autorité de santé va très prochainement publier des recommandations sur l'utilisation de ces tests pour le dépistage de la trisomie 21.

Outre la trisomie 21, ces tests non invasifs permettent de rechercher bien d'autres anomalies chromosomiques, dont des anomalies des gonosomes. Actuellement certaines publications montrent même que, sur ce type de prélèvement, il est possible d'obtenir des informations équivalentes à celle obtenue sur un caryotype fœtal après prélèvement invasif.

Ces tests non invasifs peuvent également identifier des **variations nucléotidiques** dans un **gène** et il est maintenant possible de proposer un test non invasif pour un le diagnostic prénatal d'une pathologie moléculaire comme l'**achondroplasie** ou encore la mucoviscidose.

Nul doute que les progrès technologiques associés à la forte demande parentale et sociétale, en plus de l'aspect mercantile, vont augmenter dans les années à venir l'utilisation de ces tests non invasifs en période prénatale. Il sera nécessaire de rester vigilant au niveau **éthique** afin que ces tests restent prescrits dans un contexte médical et soient donc encadrés.

Lo, Y.M., Corbetta, N., Chamberlain, P.F., Rai, V., Sargent, I.L., Redman, C.W., and Wainscoat, J.S. (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* 350, 485–487.

Taylor-Phillips S, Freeman K, Geppert J, Agbepi A, Uthman OA, Madan J, et al. Accuracy of non-invasive prenatal testing using cell-free DNA for detection of Down, Edwards and Patau syndromes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* 2016;6(1):e010002.

15 h 15 « *L'exploration du génome viral en pratique hospitalière* »

Pr Astrid VABRET, *Professeur des Universités ; Praticien Hospitalier PU-PH, CHU de Caen ; Université de Caen Normandie*

En pratique hospitalière, les laboratoires de virologie ont comme objet d'étude les virus dits « d'intérêt médical », c'est-à-dire les virus responsables des infections / maladies chez les patients pris en charge en milieu de soins. Jusque dans les années 1980, ces virus étaient détectés en utilisant des techniques dites conventionnelles, constituées essentiellement de la culture cellulaire et la détection antigénique. Les laboratoires de virologie ont ensuite connu un essor remarquable à la fois du fait de l'émergence du virus de l'immunodéficience humaine (HIV) et de l'utilisation des techniques de biologie moléculaire permettant la détection des génomes viraux. Ces techniques ont d'abord été utilisées comme « techniques maisons », puis l'industrie du réactif a développé et mis à disposition un nombre grandissant de trousse de plus en plus performantes en termes de sensibilité, spécificité, et en termes de robustesse (automation, contrôles de qualité). En parallèle avec l'amélioration des techniques utilisées en pratique de routine

dans les laboratoires, on note une grande avancée des connaissances sur la physiopathologie des infections virales (sites de multiplication virale, tropisme, voies d'excrétion, modes de transmission).

Actuellement, les tests de biologie moléculaire représentent la majorité des tests réalisés (60 à 70% de l'activité) en routine. Ils permettent le diagnostic virologique des infections aiguës (techniques qualitatives), le suivi des infections chroniques ou des infections latentes / récurrentes (techniques quantitatives), la recherche et la caractérisation des virus circulants et des virus mutants résistants apparaissant sous pression thérapeutique (génotypage, séquençage). Tous ces tests de biologie moléculaire ont connu des améliorations constantes permettant des rendus de résultats de plus en plus rapides (automatisation de l'ensemble des étapes, y compris l'extraction des acides nucléiques, tests « *sample to result* »), précis (techniques dites multiplex permettant un diagnostic infectieux syndromique), et réalisables sur un nombre important de matrices (échantillons cliniques). Ainsi, après une séparation historique entre les laboratoires de virologie et bactériologie, la tendance actuelle est la réunification avec mutualisation de ces 2 disciplines microbiologiques, dont les activités hospitalières sont désormais *quasi* équivalentes dans la plupart des hôpitaux hospitalo-universitaires. En effet, la patientèle des laboratoires de virologie s'est considérablement élargie au fur et à mesure de l'amélioration des soins : une grande partie des examens sont réalisés chez des patients immunodéprimés, dans l'incapacité transitoire ou définitive de contrôler la réplication ou la réactivation des virus les infectant de façon aiguë ou chronique. Il faut souligner que la plupart de ces examens de biologie moléculaire sont encore hors nomenclature et sont à la charge des hôpitaux, limitant ainsi leur diffusion vers le secteur privé. L'automatisation permet désormais de simplifier de façon importante les habilitations techniques, cependant la limite de tout ce progrès technologique est sans doute d'une part l'interprétation biologique, et d'autre part les questions soulevées par l'abondance des données. Un des exemples les flagrants est l'importance des codétectations virales dans certaines situations cliniques, comme les infections respiratoires aiguës, et notre incapacité actuelle de différencier coinfections et infections séquentielles. Les mêmes problèmes d'interprétation se posent avec l'arrivée du séquençage de génomes complets, ou le séquençage profond. Enfin, l'exploration du génome viral en pratique hospitalière s'oriente vers la mise en place de plateformes de métagenomique virale, devant permettre le développement d'une médecine dite personnalisée, et également la recherche d'agent pathogène sans *a priori* pour les situations cliniques d'allure infectieuse restant inexplicée.

15 h 45 « *L'épidémiologie moléculaire en laboratoire de recherche en bactériologie : l'exemple de Escherichia coli* »

Pr **Érick DENAMUR**, *INSERM UMR_S1137 ; Universités Paris Diderot et Paris Nord*

Escherichia coli est une espèce bactérienne versatile qui est à la fois un commensal du tube digestif des vertébrés, une bactérie retrouvée dans l'eau et les sédiments et un redoutable pathogène intestinal (responsable de diarrhées) et extra-intestinal (responsable d'infections urinaires, de septicémies, de suppurations profondes et de méningites chez le nouveau-né). Cette bactérie autrefois sensible à tous les antibiotiques devient de plus en plus résistante.

L'épidémiologie moléculaire classique, et plus récemment l'utilisation du séquençage des génomes à haut débit, a montré une extrême diversité génétique des souches de l'espèce permettant une adaptation aux différentes niches. Ainsi, le génome d'un *E. coli* a un nombre de gènes variable entre 4 200 à 5 400 et le « pan-génome », soit l'ensemble des gènes de l'espèce, est de 20 000 gènes environ, autant que l'espèce humaine. De plus, il existe une adaptation importante par mutation/sélection des souches au sein d'un individu hôte.

E. coli est un exemple de la plasticité génomique des bactéries leur permettant de s'adapter constamment à un environnement toujours changeant.

16 h 15 Conclusions

16 h 35 Clôture par **Claude VIGNERON**, *Président de l'Académie nationale de Pharmacie*