

La mutation du gène BRAF dans les leucémies à tricholeucocytes : un marqueur diagnostique de clonalité et une cible thérapeutique pour des patients réfractaires aux traitements classiques



M. Becker, L. Rigollet, M. Kasbarian, D. Ahmed Chaouch, K. Camilli, S. El Moutassim
Département de Génétique Constitutionnelle et d'Oncologie Moléculaire.
Laboratoire Biomnis, Lyon, France

INTRODUCTION

La leucémie à tricholeucocytes (HCL) est une entité clinico-biologique de la classe des syndromes lymphoprolifératifs B (SLPB). Elle est caractérisée le plus souvent par une pancytopenie et une splénomégalie avec le passage dans le sang des cellules d'aspect bien caractéristique. Le diagnostic est souvent confirmé par la cytométrie en flux avec des marqueurs de membrane spécifiques. Récemment, des auteurs ont démontré la présence d'une mutation BRAF V600E dans ce syndrome lympho-

prolifératif. Selon certains auteurs, ce marqueur serait exceptionnellement retrouvé dans d'autres SLPB moins bien définis comme les lymphomes spléniques de la zone marginale et les LNH inclassables incluant les leucémies à tricholeucocytes variant. C'est ainsi que nous avons recherché la mutation de l'exon 15 V600E du gène BRAF pour 34 patients classés sur des critères de cytologie et de cytométrie selon l'OMS de 2008.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Sélection des patients

Trente huit échantillons provenant de 34 patients (sang ou moelle) ont été adressés au laboratoire pour une suspicion d'hémopathie lymphoïde.

Les patients ont été classés en leucémie à tricholeucocytes selon les critères cytologiques et immunologiques de l'OMS 2008.

Techniques de biologie moléculaire

L'extraction d'ADN a été réalisée à partir du sang périphérique ou de la moelle osseuse en utilisant la trousse QIAmp DNA blood mini kit selon les instructions du fournisseur (Qiagen).

Méthode de séquençage de l'exon 15 du gène BRAF par méthode de Sanger avec l'utilisation des amorces sens 5'-TACCTAAACTCTTCATACATAATGCTTGC-3' et anti sens 5'-GTAAGTCAGCATCTCTCAGGG-3' permettant l'amplification d'un fragment de 256pb par PCR. Le produit de PCR est visualisé sur un gel d'agarose à 3% purifié et séquençé avec l'utilisation d'un séquenceur capillaire ABI 3500 (Applied Biosystems).

PCR temps réel

La technique de discrimination allélique est basée sur l'utilisation d'un couple d'amorce et de deux sondes spécifiques de l'allèle sauvage et allèle muté marqués par des fluochromes différents. L'analyse est réalisée sur un light cyclier 480 (Roche).

RÉSULTATS

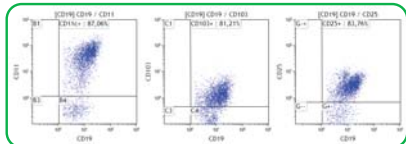
Après analyse cytologique et immunologique, 32 patients ont été classés en hémopathie lymphoïde B selon un score de Matutes de 0, 1 ou 2.

Deux patients avaient une prolifération clonale complexe et 2 échantillons ne présentaient pas d'anomalie clonale.

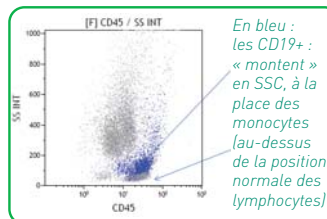
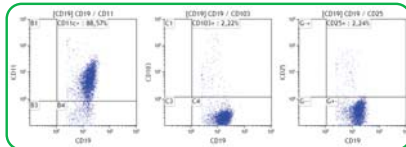
1. Dans le groupe classés HCL (24 patients), 16 patients ont présenté une mutation dans l'exon 15 du gène BRAF (c.1799T>A, V600E).

La mutation BRAF n'a pas été détectée chez 8 patients dont 2 en maladie résiduelle (pas d'échantillons au diagnostic) tant par technique PCR temps réel que par le séquençage.

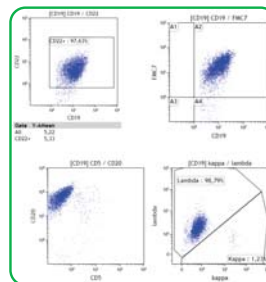
Tricholeucémie typique : SSC fort, CD103+ CD25+ CD11c+



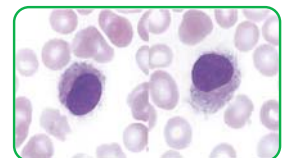
Lymphocytes villeux : SSC élevé, CD11c+ mais CD25- CD103-



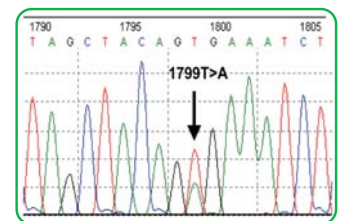
Tricholeucémie (moins important)



Expression forte des marqueurs pan-B : CD22, CD20, FMC7 et la chaîne légère (ici lambda)



Cytologie: noyau rond sans nucléole, cytoplasme peu basophile avec des villosités sur toute la cellule



Séquençage de l'exon 15 du gène BRAF : mutation hétérozygote c.1799T>A

Ces échantillons présentaient un chiffre absolu de lymphocytes atypiques <2 x10⁹/L.

2. La mutation BRAF n'a pas été détectée :

- dans le groupe classée Lymphomes de la Zone marginale ou HCL (6 patients)
- Dans le groupe « inclassable » (5 échantillons issus de 2 patients) après une analyse cytologique et immunologique.

DISCUSSION

La mutation BRAF a été détectée dans tous les cas de leucémie à tricholeucocytes au diagnostic avec un chiffre absolu de cellules pathologiques élevées.

L'absence de détection de la mutation BRAF par la technique de PCR en temps réel dans les leucémies à tricholeucocytes avec des valeurs basses est lié au fait que l'allèle muté est dilué dans une grande quantité d'allèles sauvages. Il est

actuellement recommandé dans ces cas d'utiliser un peptide compétiteur qui bloque les allèles sauvages induisant indirectement un enrichissement des allèles mutés. Des auteurs ont démontré la grande sensibilité des techniques de séquençage nouvelle génération avec une sensibilité et une spécificité de 100% comparativement à une sensibilité de 10 à 20% pour les techniques utilisées dans notre étude.

CONCLUSION

La mutation BRAF semble être un marqueur moléculaire diagnostique des leucémies à tricholeucocytes à forte masse tumorale mais également une cible thérapeutique pour l'utilisation des inhibiteurs des tyrosines kinases. Il est important d'adapter les techniques pour les faibles masses tumorales ou les maladies résiduelles par les nouvelles techniques, telles les techniques du séquençage haut débit.