

Actualités dans les syndromes myélodysplasiques

Génétique des syndromes myélodysplasiques
et apports des techniques pangénomiques

Mathieu Wémeau

Génétique des syndromes myélodysplasiques

Hématopoïèse inefficace,
anomalies clonales de
cellules souches
hématopoïétiques

Caryotype médullaire :

- anomalies dans 50% des SMD (80 % des SMD II^{aires})
- majorité d'anomalies chromosomiques déséquilibrées

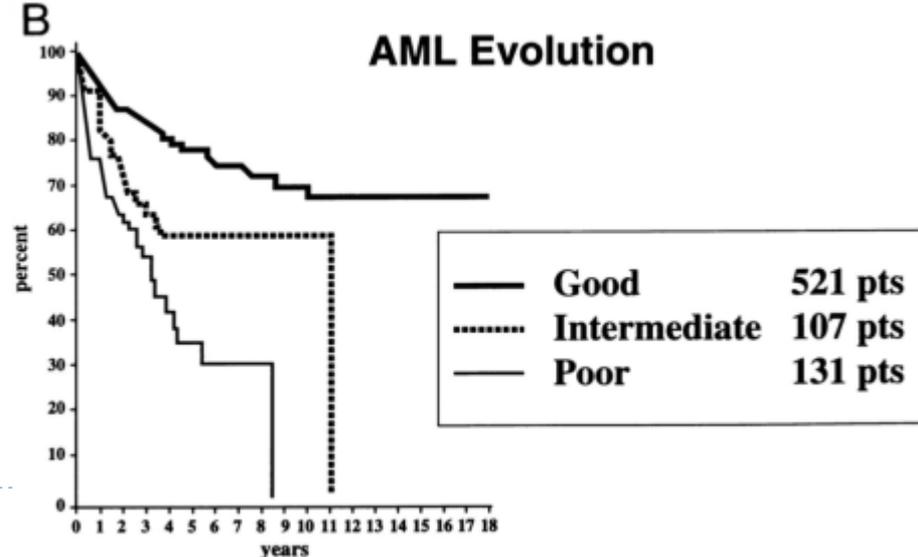
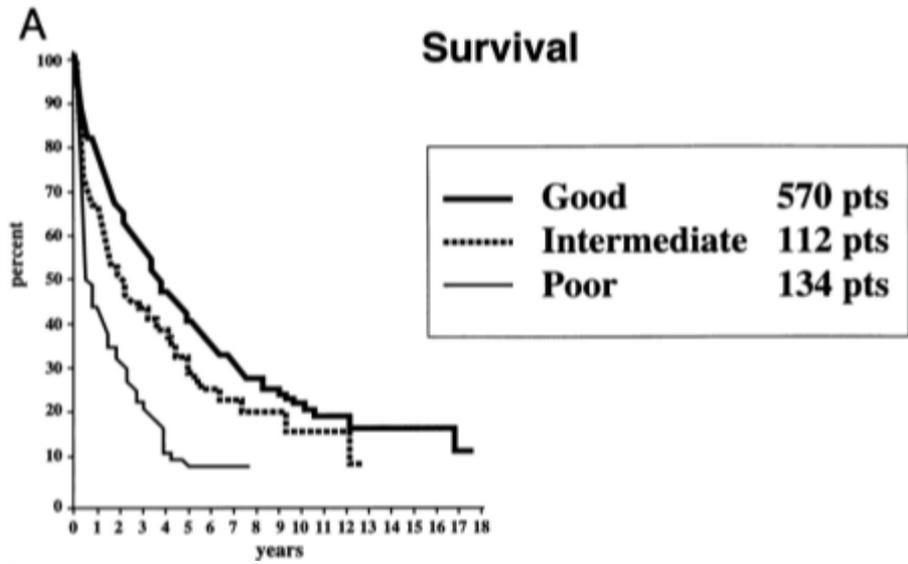
	Cytogénétique conventionnelle
Anomalies détectées	Anomalies chromosomiques numériques et structurales
Sensibilité	≈1 cellule sur 20
Résolution	10 mégabases
Matériel	Cellules en culture 24-48h
Limites	- Nécessité de cellules en métaphase - Mise en évidence du (des) clone(s) dominant(s)
Coût	432 € (B800N + B800HN)



Principales anomalies cytogénétiques

816 SMD de novo
Greenberg et al, Blood 1997

Favorable	Intermédiaire	Défavorable
Normal -Y del (5q) del (20q)	autres	Complexe (≥ 3 anomalies) Anomalies du 7



International Scoring System for Evaluating Prognosis in Myelodysplastic Syndromes

By Peter Greenberg, Christopher Cox, Michelle M. LeBeau, Pierre Fenaux, Pierre Morel, Guillermo Sanz, Miguel Sanz, Teresa Vallespi, Terry Hamblin, David Oscier, Kazuma Ohyashiki, Keisuke Toyama, Carlo Aul, Ghulam Mufti, and John Bennett

	0	0,5	1	1,5
Cytopénies	0 ou 1	2 ou 3	-	-
Caryotype	Bon	Intermédiaire	Défavorable	-
Blastes	0-4%	5-10%	-	11-20%

Survie médiane

bas risque (0)	: 5,7 ans
intermédiaire 1 (0,5-1)	: 3,5 ans
intermédiaire 2 (1,5-2)	: 1,2 ans
haut risque (3-3,5)	: 0,4 an

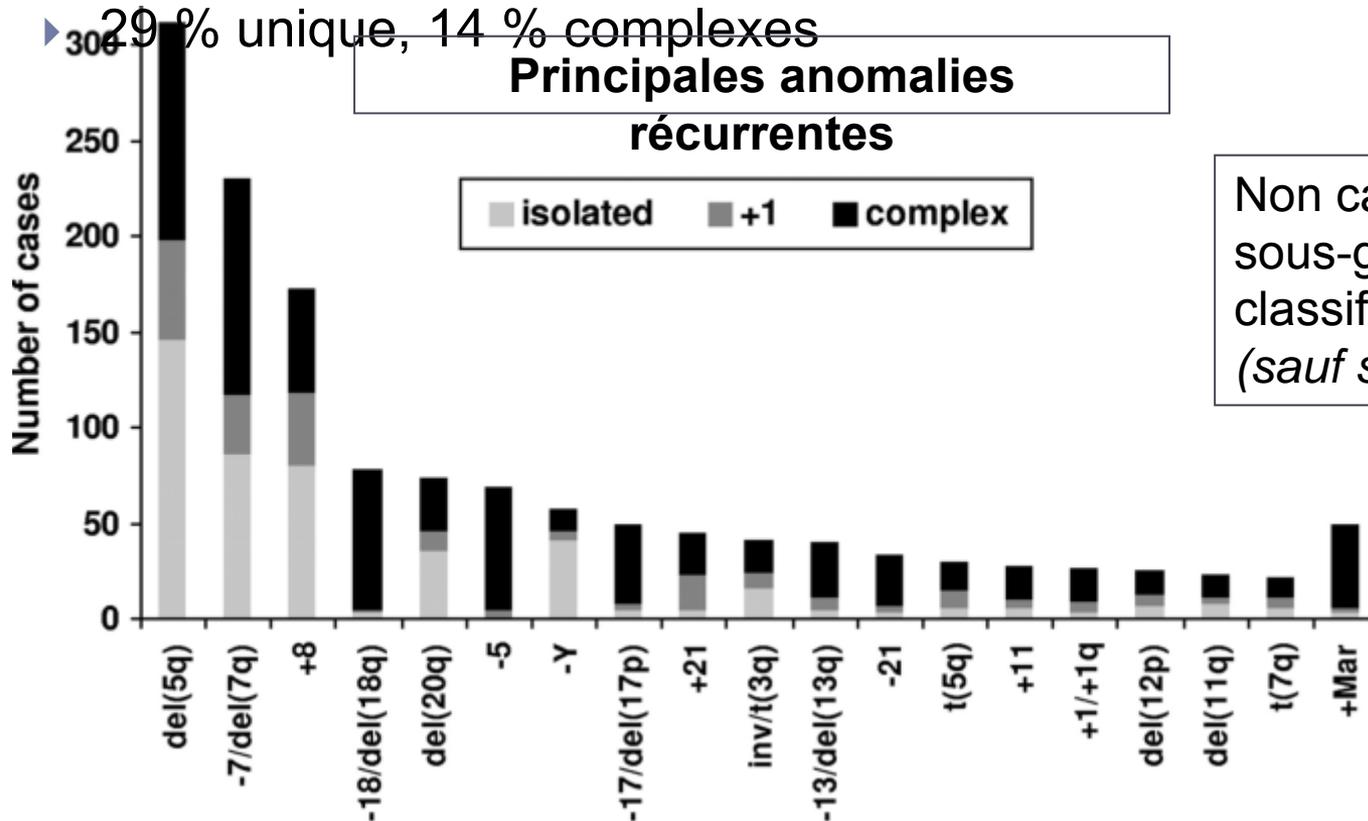
Autres anomalies récurrentes

New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients

- ▶ 52 % patients présentent une anomalie cytogénétique

*Haase et al,
Blood 2007*

- ▶ 29 % unique, 14 % complexes



Non caractéristiques d'un sous-groupe de la classification OMS des SMD (sauf syndrome 5q-)

Valeur **pronostique** des anomalies cytogénétiques

Bon pronostic
Survie \geq 32 mois

del(9q), NC
del (12p) NC
del(15q)/t(15q) NC
+21, NC
-Y (isolé ou NC)
del(5q) (isolée ou NC)
del(20q) (isolée ou NC)
-X, NC
Normal
+8, +1
t(1q) NC
t(7q) NC
t(11q) NC
- 21, NC

Pronostic intermédiaire
Survie 30 – 12 mois

del(11q), isolée ou NC
t(11q23), NC
+8, isolée ou NC
+ 19, NC
del(7q), isolée ou NC
3 anomalies
- 7, isolé ou NC

Pronostic défavorable
Survie < 12 mois

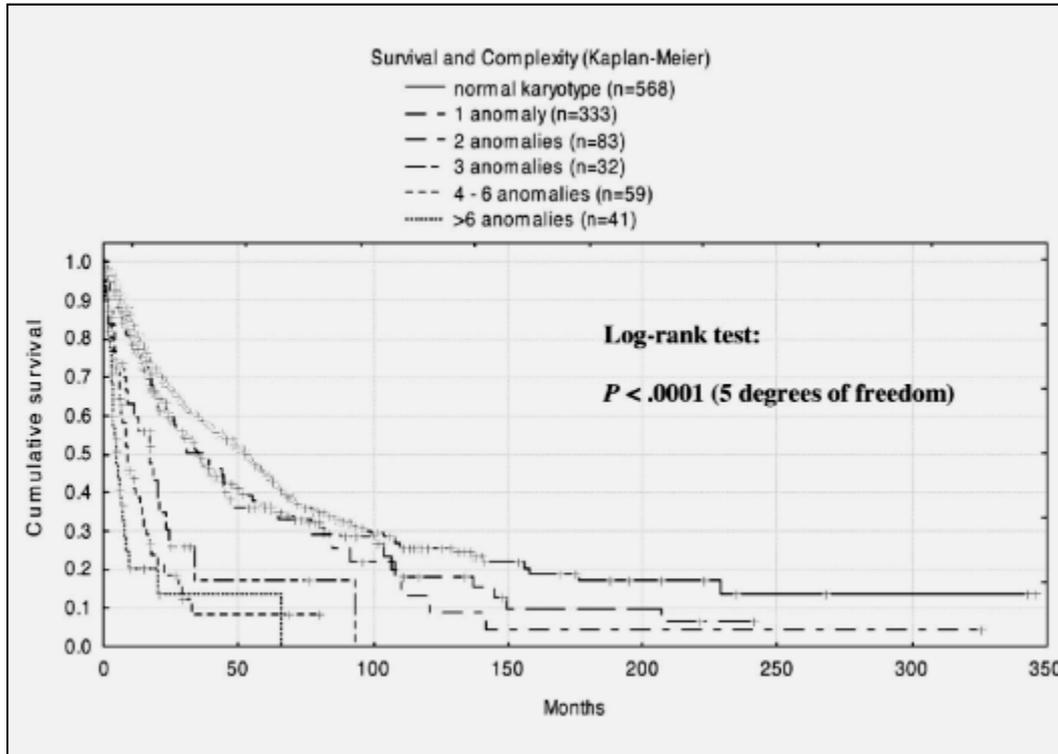
t(5q), NC
4 à 6 anomalies
> 6 anomalies

1237 patients en soins de support exclusifs (1964-2004)

NC : non complexe
+1 : 1 anomalie additionnelle

Haase et al, Blood 2007

Caryotypes complexes : pronostic corrélé au nombre d'anomalies



Survie médiane

Caryotype normal : 53 mois

Nombre d'anomalies

1 ou 2 : 35 - 38 mois

3 : 17 mois

4 à 6 : 9 mois

> 6 : 5 mois

Haase et al, Blood 2007

Valeur **diagnostique** des anomalies cytogénétiques

Classification OMS 2008 : anomalies typiques de SMD en présence de cytopénies, sans anomalies cytologiques caractéristiques

Unbalanced abnormalities	Balanced abnormalities
–7 or del(7q)	t(11;16)(q23;p13.3)
–5 or del(5q)	t(3;21)(q26.2;q22.1)
i(17q) or t(17p)	t(1;3)(p36.3;q21.1)
–13 or del(13q)	t(2;11)(p21;q23)
del(11q)	inv(3)(q21q26.2)
del(12p) or t(12p)	t(6;9)(p23;q34)
del(9q)	
idic(X)(q13)	
Complex karyotype (3 or more chromosomal abnormalities) involving one or more of the above abnormalities.	

***Vardiman et al, Blood
2009***

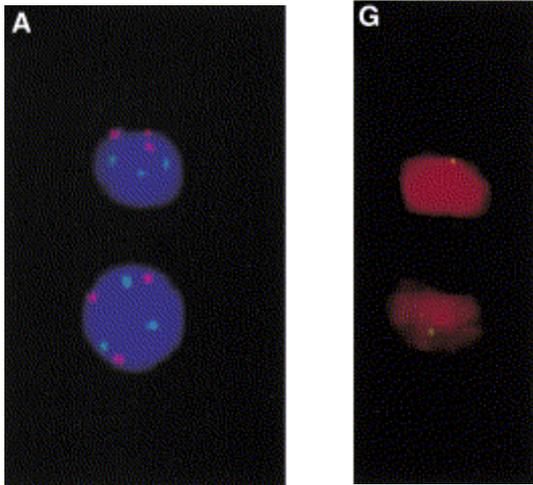
Actualités dans le syndromes myélodysplasiques
Génétique et apport des techniques pangénomiques

Place de la **FISH** dans les SMD



FISH dans les SMD

► Hybridation de sondes marquées sur des séquences spécifiques



Beyer, CGC 2004

	Cytogénétique conventionnelle	FISH
Anomalies détectées	Anomalies chromosomiques numériques et structurales	Anomalies numériques (chr 7q, 5q, 8, 17p, 20q,...) et structurales
Sensibilité	≈1 cellule sur 20	Jusqu'à 1 cellule sur 1000
Résolution	10 mégabases	200 -500 kilobases
Matériel	Cellules en culture	Noyaux métaphasiques ou interphasiques
Limites	- Nécessité de cellules en métaphases - Mise en évidence du (des) clone(s) dominant(s)	- Détection des seules anomalies recherchées - Temps de lecture - Seuil de positivité ≈ 10 % (monosomies)
Coût	432 €	2 sondes :270 € RESONANCE

Intérêt de la **FISH** dans les SMD

Etude rétrospective : 110 patients SMD. Yang et al, Leukemia

Research 2009

- Cytogénétique conventionnelle (CC) 42%
 - FISH (4 sondes : chrs 5/7/8/20) 40%
- anomalie diagnostiquée pour 50% des patients**

⇒ **CC anormale** (48) : 29% discordance
Pas de modification du groupe pronostique

⇒ **Echec CC** (8): 38 % d'anomalie en FISH

⇒ **CC normale** (54) : 9% FISH + (tris 8 : 3/5)

Principalement AREB ou CRDM

FISH + : 80 % (v.16%) augmentation % blastes

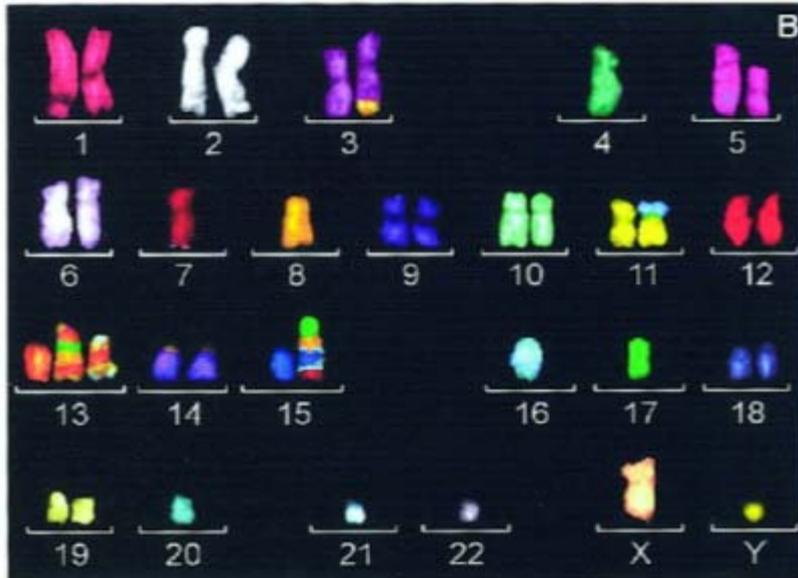
Intérêt de la FISH en cas de :

- échec CC
- CC normale si AREB ou CRDM



Reclassement de l'IPSS

Multiplex-FISH et Sky-FISH (spectral karyotyping)



Van Limbergen, *Genes, Chromosomes and Cancer* 2002

- ▶ **Intêret** : détection des réarrangements cryptiques interchromosomiques et compréhension des réarrangements complexes (*Xu W, Int J Lab Hemat 2010*)
 - ▶ **Limites** : cellules en métaphase; sensibilité plus faible; coût; pas de valeur pronostique (*Avet-Loiseau, Hématologie 2004*)
-



Actualités dans le syndromes myélodysplasiques
Génétique et apport des techniques pangénomiques

Apports des techniques pangénomiques

CGH-array

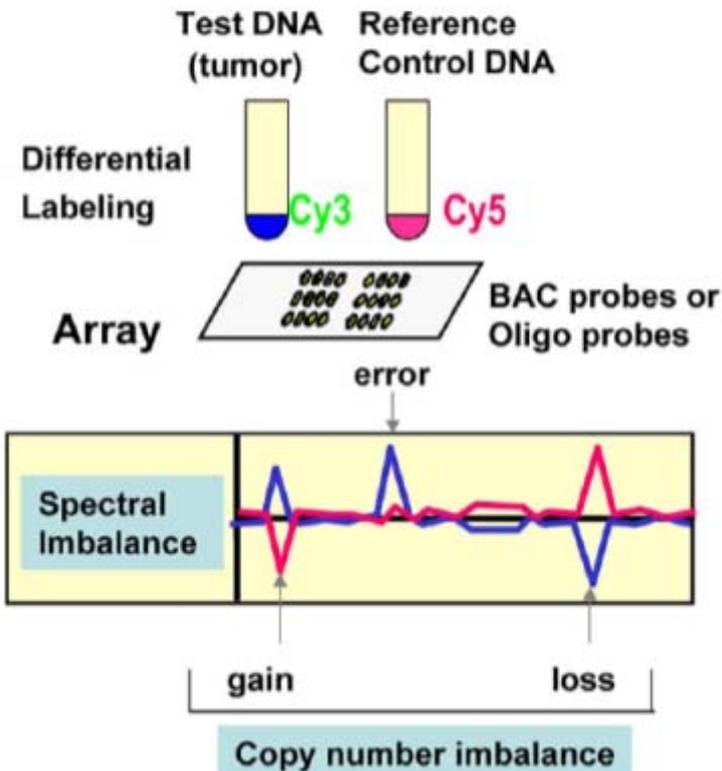
SNP-array



Principe des puces CGH (**CGH-array**)

CGH-A

- BAC CGH-A
- Oligo CGH-A



Hybridation génomique comparative entre ADN tumoral et ADN de référence, avec des sondes nucléotidiques disposées sur une puce.



Détection d'anomalies **numériques**
« cryptiques »
pangénomique avec une
très grande résolution.

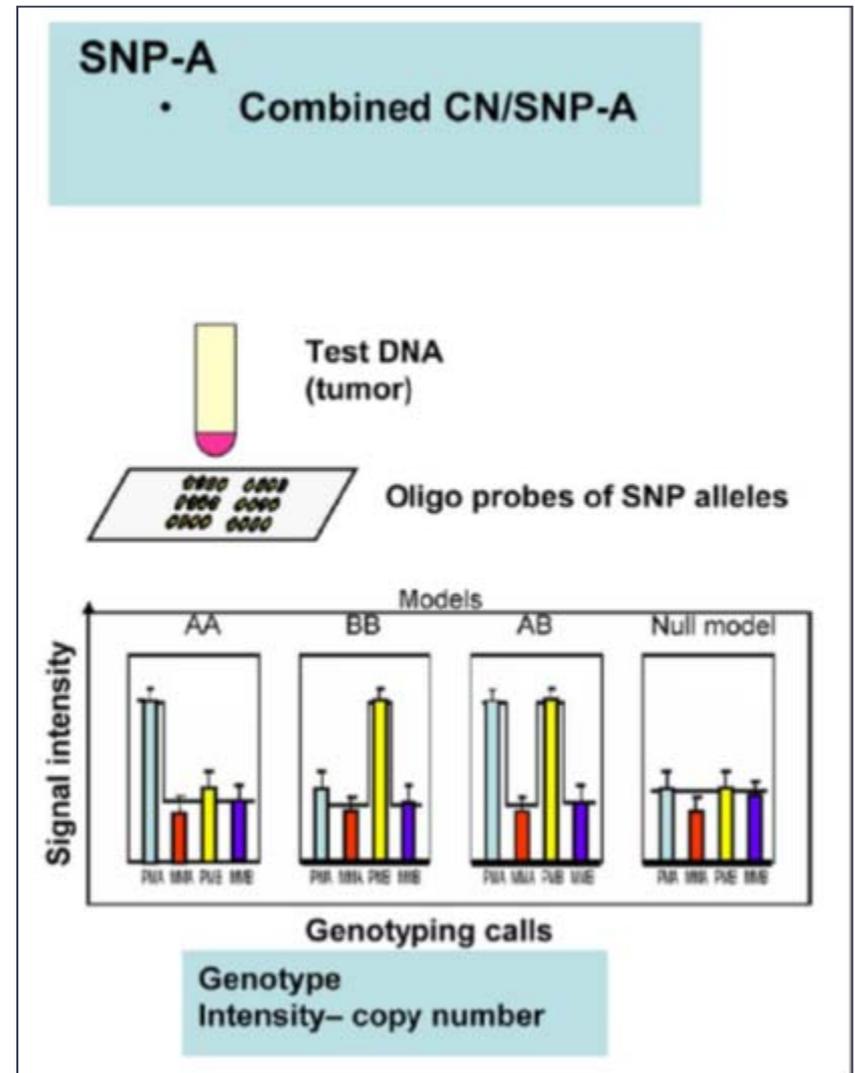
Maciejewski and Mufti, Blood 2008

Principes des **SNP-array**

- ▶ **Single Nucleotide Polymorphism** : variations de séquence retrouvées sur l'ensemble du génome.
- ▶ Hybridation de l'ADN du patient sur des sondes nucléotidiques représentant différents polymorphismes d'une même séquence.

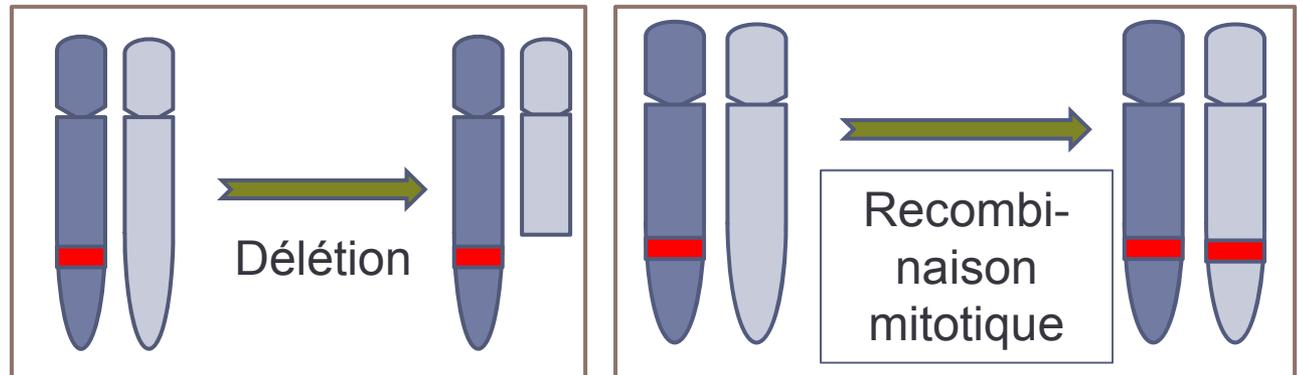
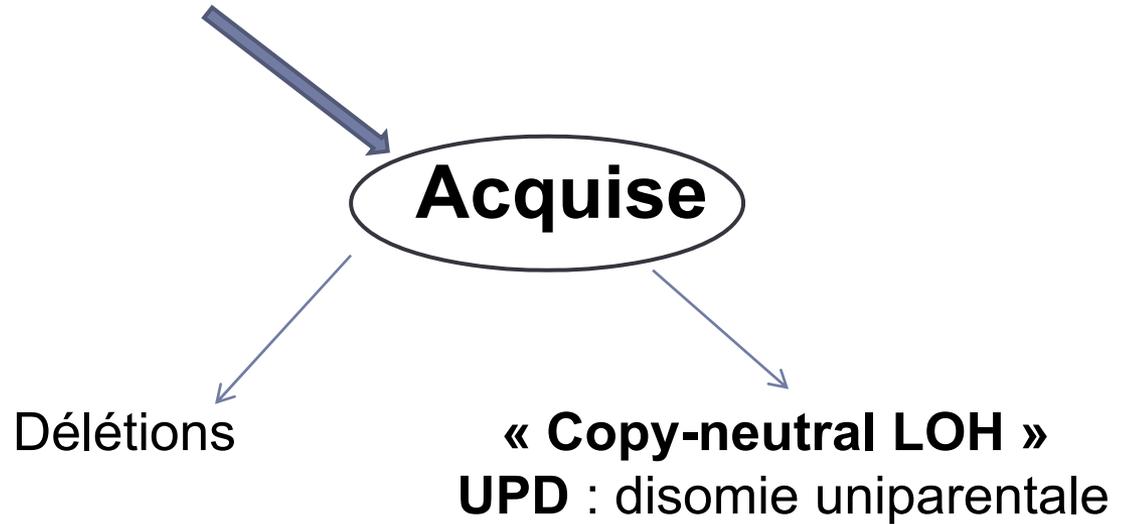
Permettent de détecter des variations du nombre de copies et les **pertes d'hétérozygotie (LOH)**

Maciejewski and Mufti, Blood 2008



LOH : loss of heterozygosity

Perte d'hétérozygotie entre 2 allèles



LOH : loss of heterozygosity

Perte d'hétérozygotie entre 2 allèles



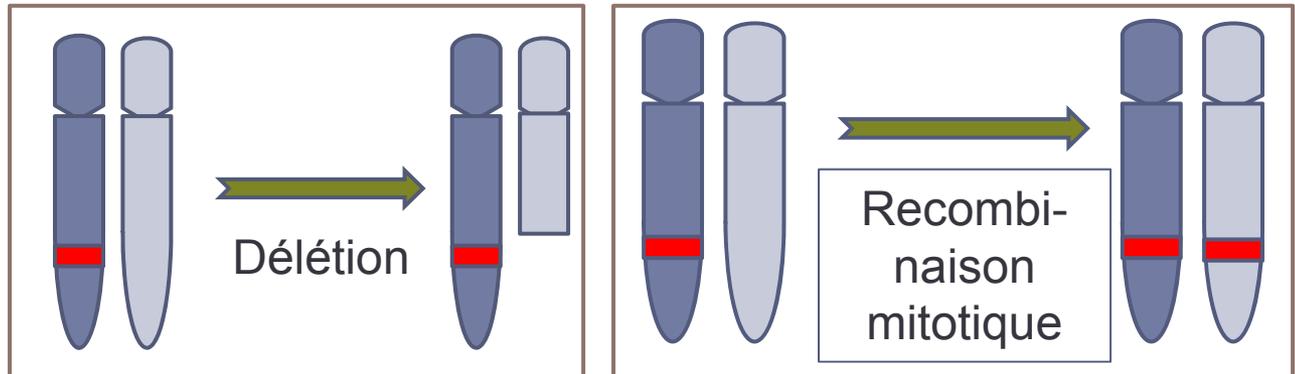
Autozygotie
(consanguin)

UPD

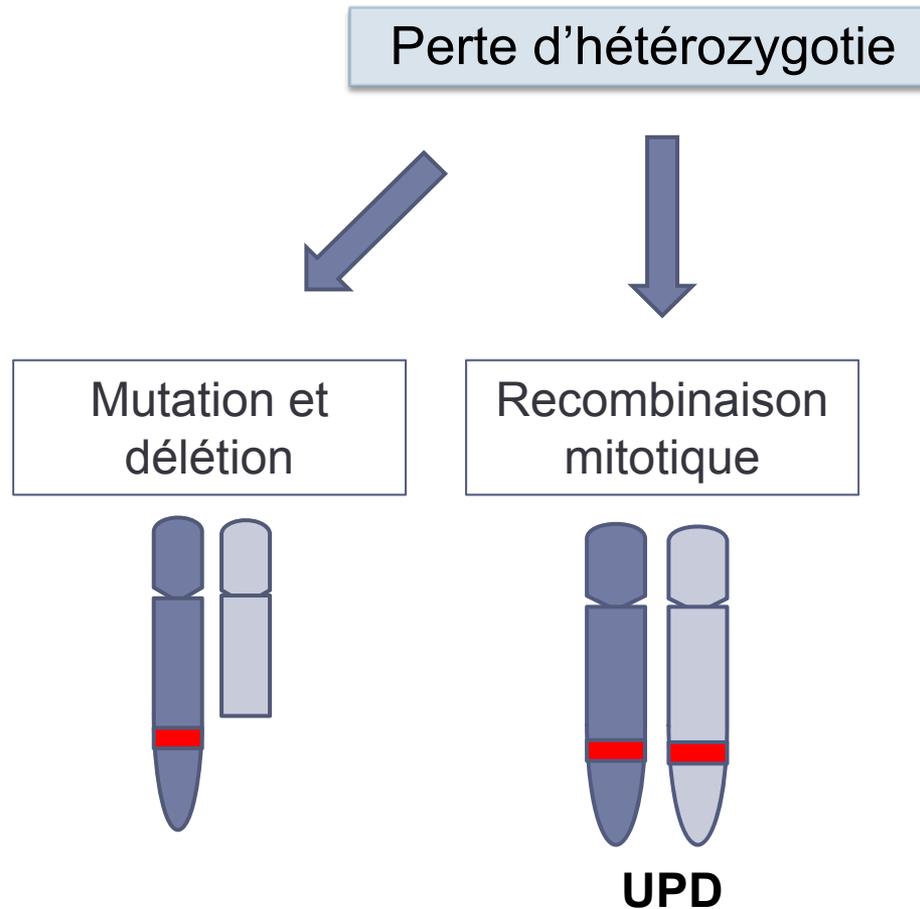
Délétions

« Copy-neutral LOH »
UPD : disomie uniparentale

Comparaison
nécessaire avec
l'ADN constitutionnel
(lymphocytes T)



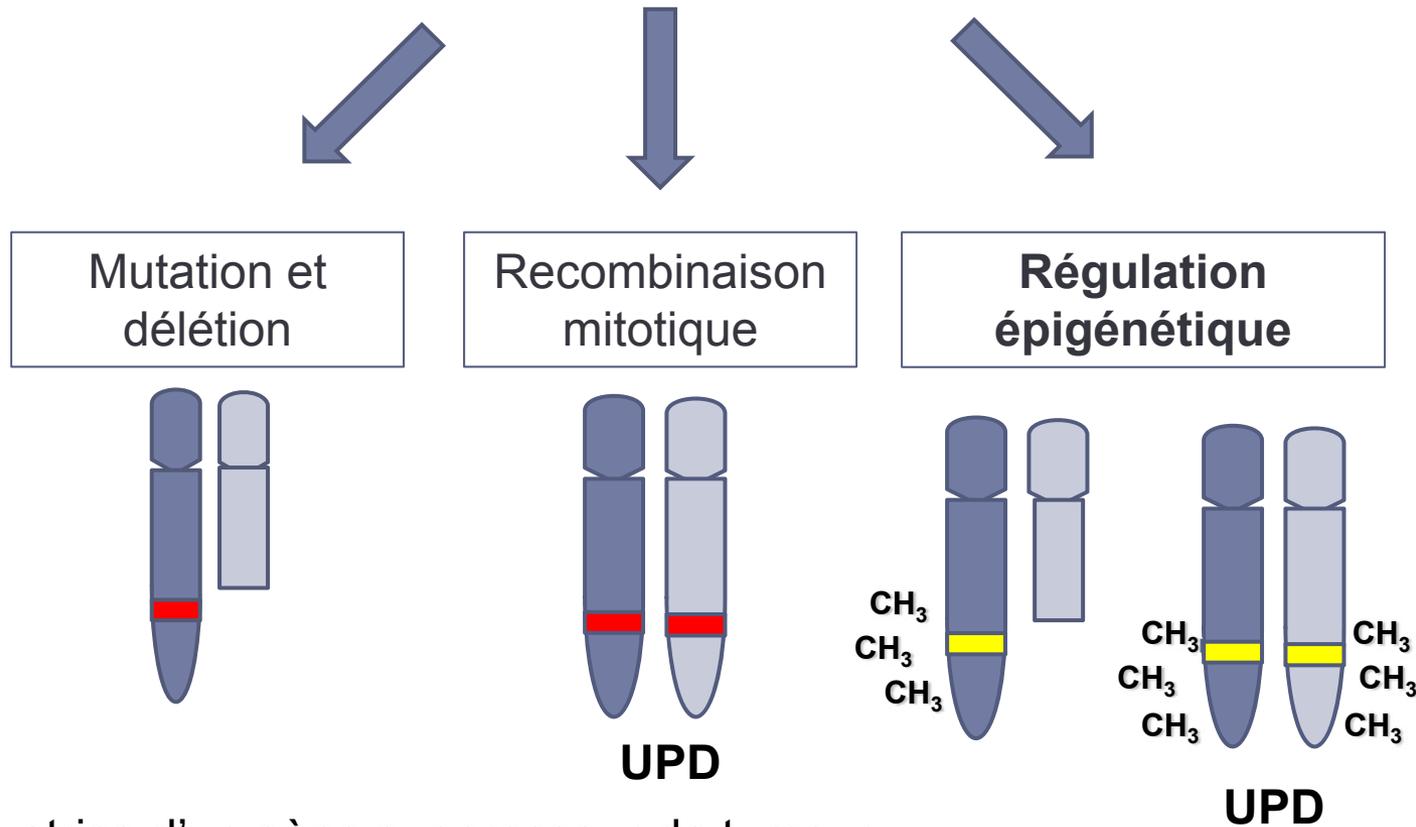
Physiopathologie : perte d'expression d'un gène



■ Mutation inactivatrice d'un gène suppresseur de tumeur

Physiopathologie : perte d'expression d'un gène

Perte d'hétérozygotie



 Mutation inactivatrice d'un gène suppresseur de tumeur

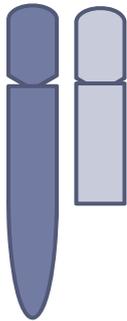
 Hyperméthylation d'un gène suppresseur de tumeur

Physiopathologie : perte d'expression d'un gène

Haploinsuffisance

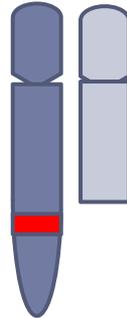
Perte d'hétérozygotie

Délétion/
monosomie

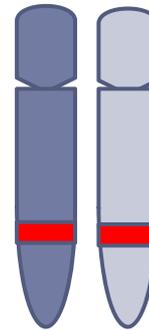


Synd 5q-

Mutation et
délétion

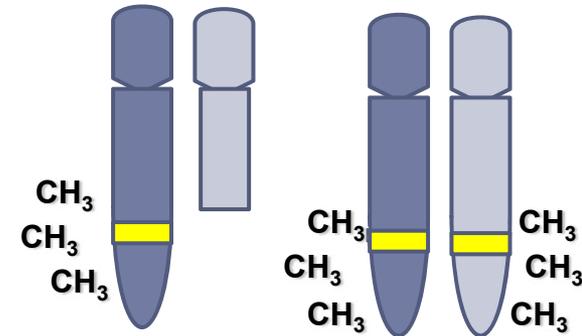


Recombinaison
mitotique



UPD

Régulation
épigénétique



UPD

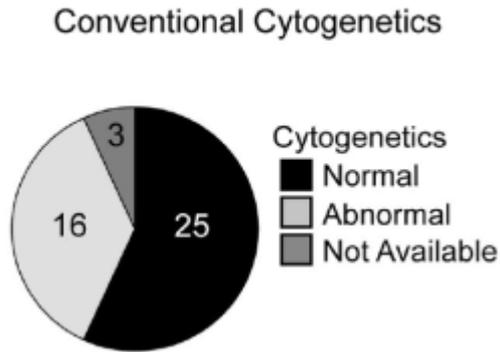
d'après M Fontenay

	Cytogénétique conventionnelle	FISH	CGH-array	SNP-array
Anomalies détectées	Anomalies chromosomiques numériques et structurales	Anomalies numériques (chr 7q, 5q, 8, 17p, 20q,...) et structurales	Variations du nombre de copies d'un gène, sur des régions cibles, ou sur l'ensemble du génome	Variation du nombre de copies et des disomies uniparentales
Sensibilité	≈1 cellule sur 20	Jusqu'à 1 cellule sur 1000	Inférieure à la cytogénétique conventionnelle anomalie présente dans ≈ 25% des cellules	
Résolution	10 mégabases	200 -500 kilobases	Jusqu'à 25 – 50 kilobases	
Matériel	Cellules en culture	Noyaux métaphasiques ou interphasiques	~1 µg ADN	
Limites	- cellules en métaphases - Mise en évidence du (des) clone(s) dominant(s)	- Détection des seules anomalies recherchées - Temps de lecture - Seuil de positivité ≈ 10 %	Disponibilité de la technique Expertise et temps Pas de détection des anomalies structurales équilibrées	

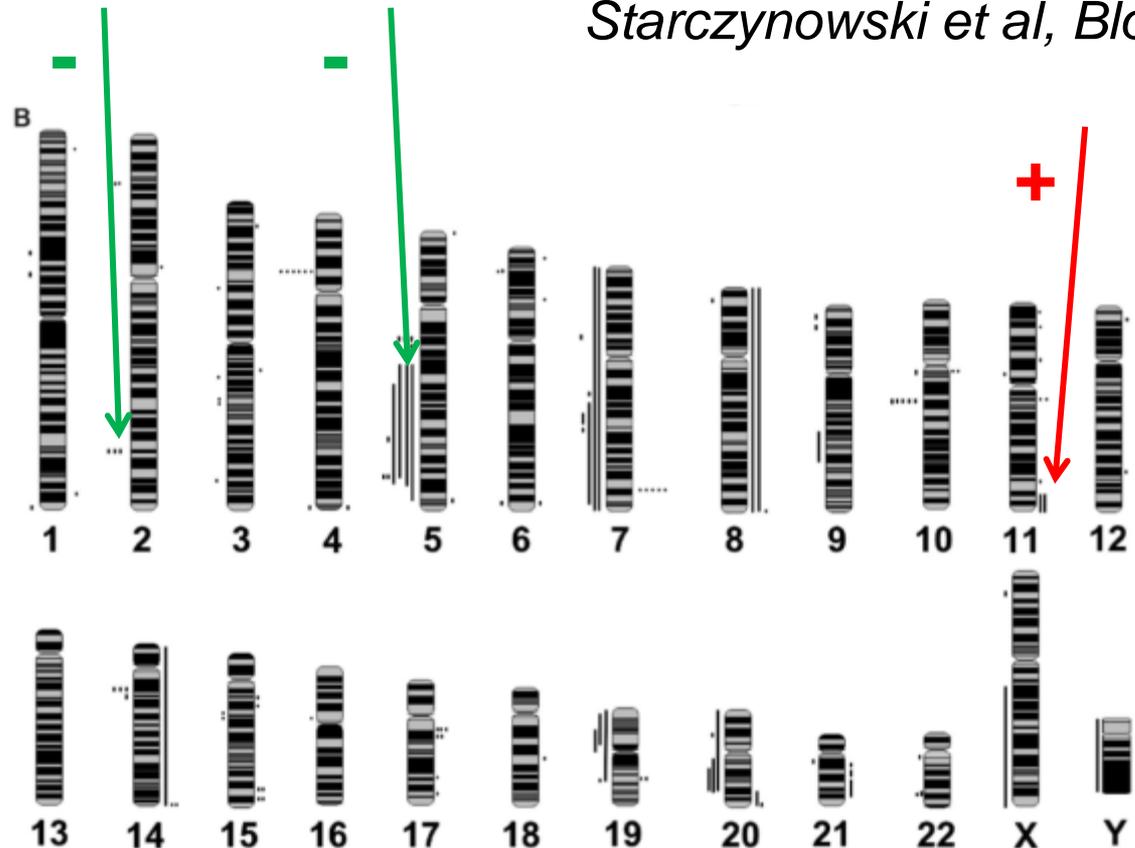
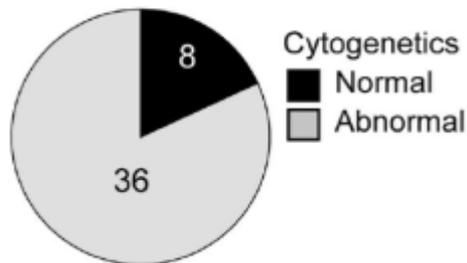
Intérêt des CGH-array (1)

High-resolution whole genome tiling path array CGH analysis of CD34⁺ cells from patients with low-risk myelodysplastic syndromes reveals cryptic copy number alterations and predicts overall and leukemia-free survival

Starczynowski et al, Blood 20



Array CGH



Intérêt des CGH-array (2)

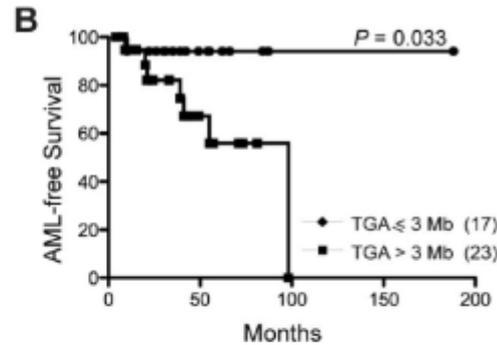
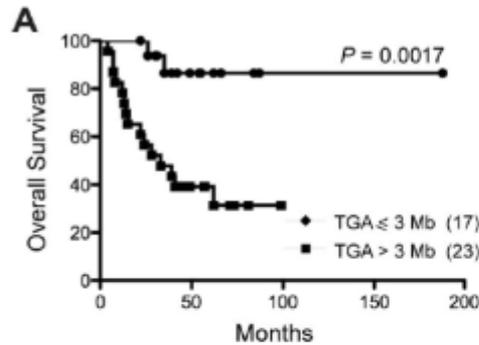
40 SMD avec IPSS ≤ 1

Starczynowski et al, Blood 2008

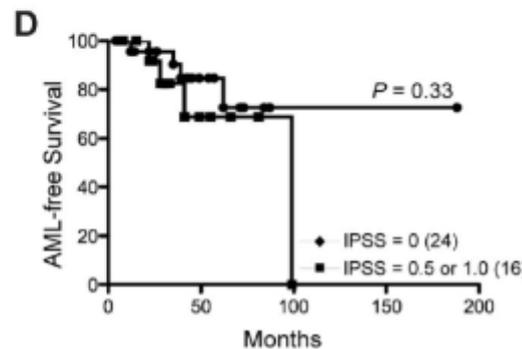
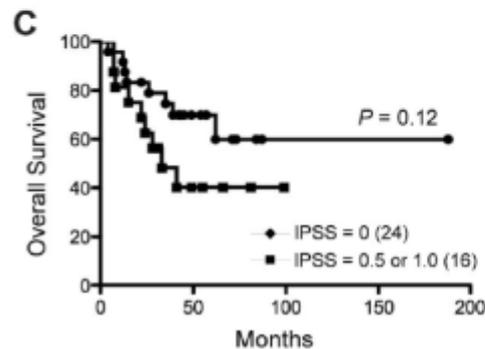
Addition du nombre de bases modifiées

(TGA = total genomic alteration) :

TGA



IPSS

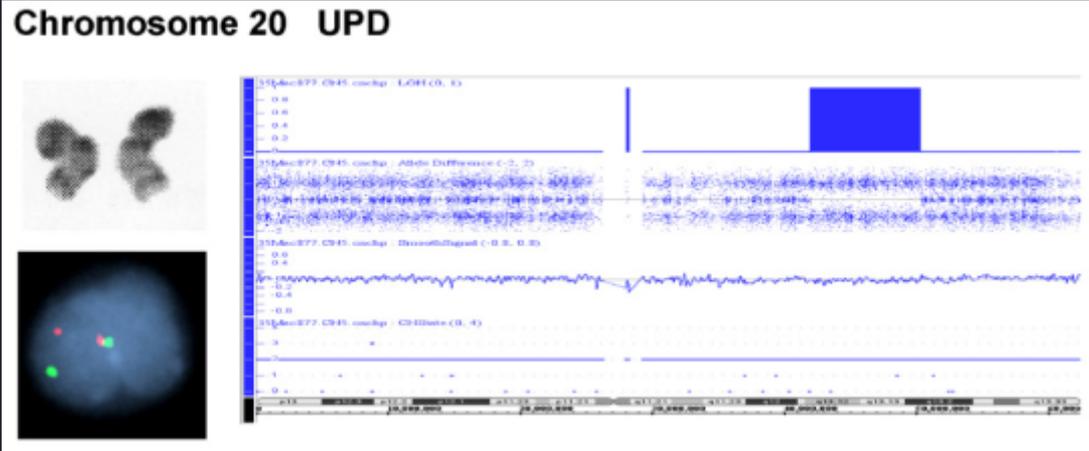
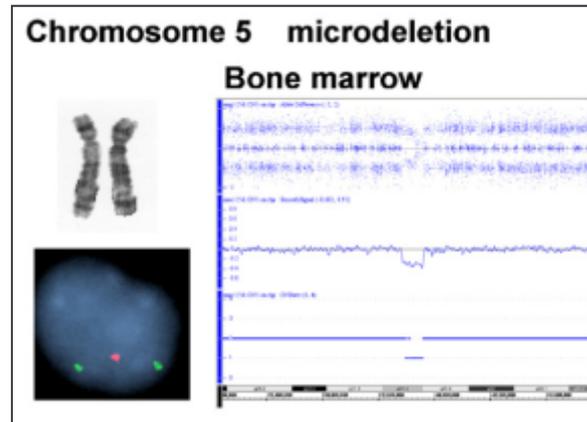
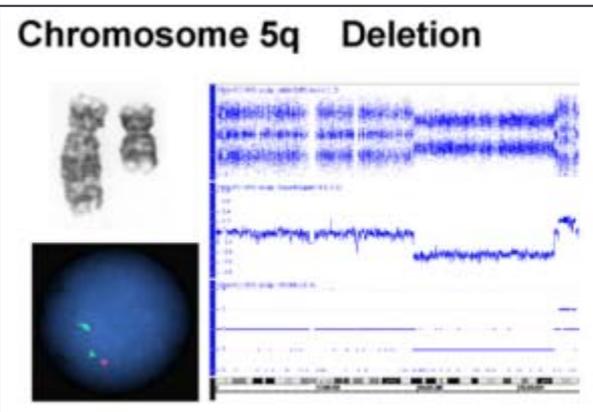


=> discriminante pour la survie globale et survie sans leucémie

Intêret des SNP-Array (1)

FISH and SNP-A karyotyping in myelodysplastic syndromes: Improving cytogenetic detection of del(5q), monosomy 7, del(7q), trisomy 8 and del(20q)

*Makishima et al,
Leukemia Research
2009*



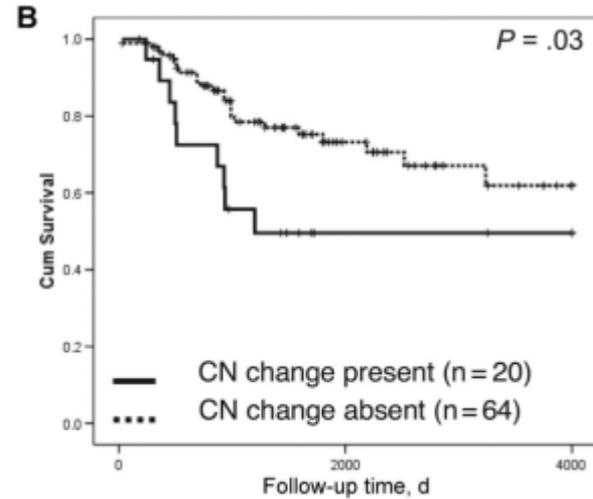
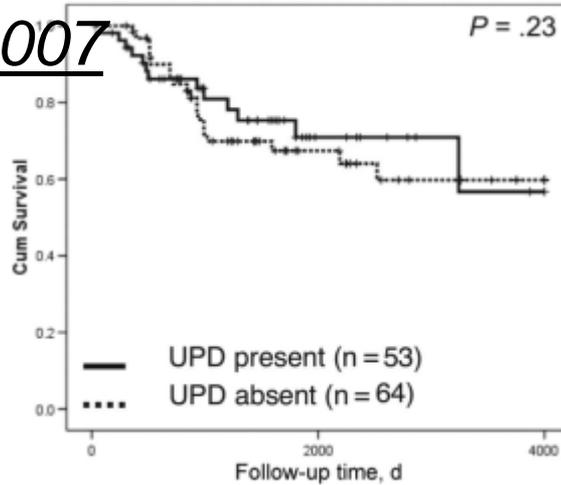
=> Combinaison des techniques améioren la détection d'anomalies cryptiques

Intêret des SNP-Array (2)

=> Intêret pronostique ?

➤ Mohamedali, Blood 2007

119 patients atteints de SMD bas risque : pronostic corrélé à la **variation du nombre de copies (CN)** mais pas à UPD



➤ Tiu et al, ASH 2009

403 patients dont 235 MDS et 80 MDS/MPN :

OS	Avec UPD	Sans UPD
Low risk	35	81
High risk	5	9

En analyse multivariée :
 -UPD
 -blastes >5%
 -cyt défavorable
 } péjoratifs pour OS et EFS



Intêret des SNP-Array (3)

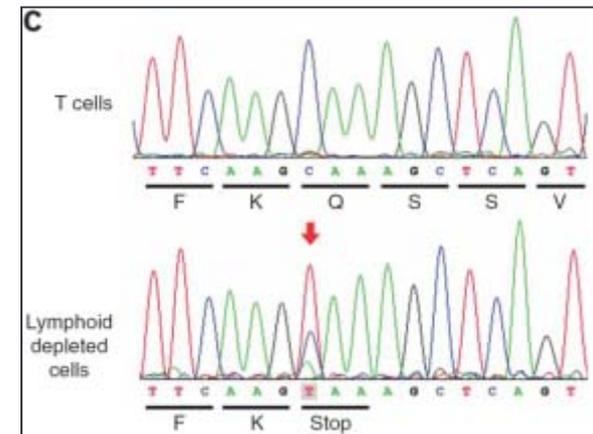
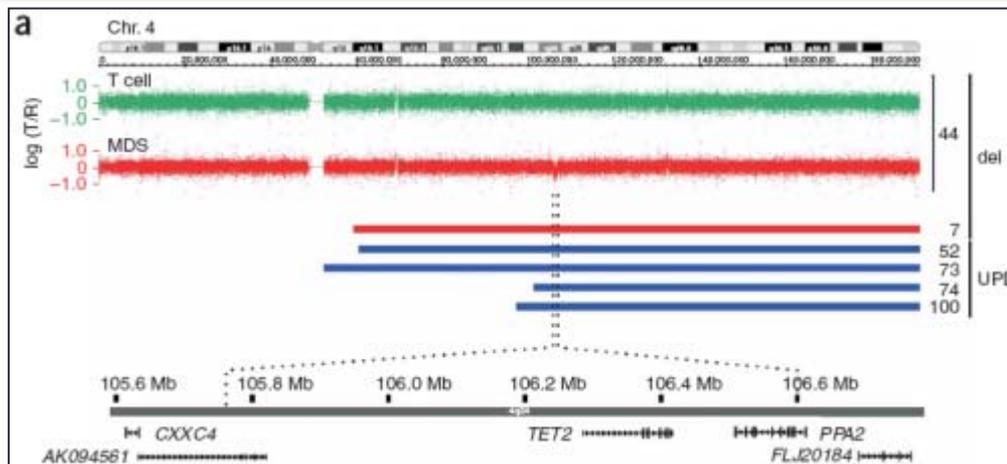
=> Identification de gènes impliqués dans la physiopathologie

Mutation in *TET2* in Myeloid Cancers

Delhommeau, NEJM 2009

Acquired mutations in *TET2* are common in myelodysplastic syndromes

Langemeijer, Nature Genetics 2009



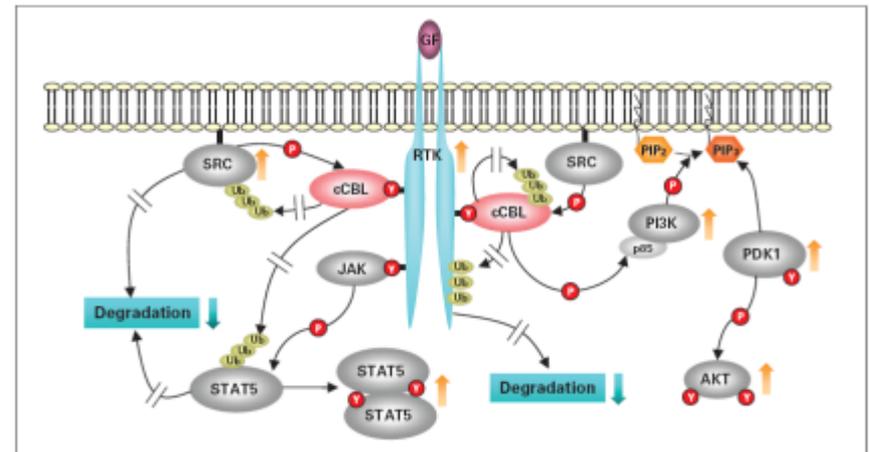
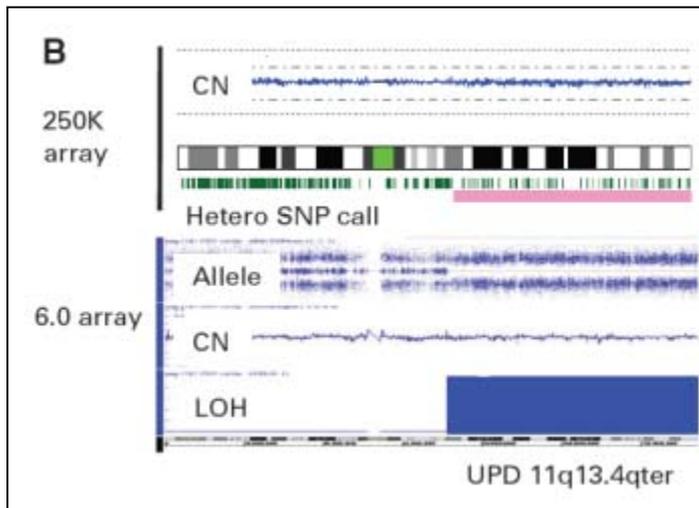
Mutation de *TET2* retrouvée chez 26 % d'une série de 102 patients

Intêret des SNP-Array (3)

=> Identification de gènes impliqués dans la physiopathologie

Mutations of E3 Ubiquitin Ligase *Cbl* Family Members Constitute a Novel Common Pathogenic Lesion in Myeloid Malignancies

Makishima et al, JCO août 2009



Actualités dans le syndromes myélodysplasiques
Génétique et apport des techniques pangénomiques

Techniques d'étude du méthylome



Méthodes d'études du méthylome :

- profil de méthylation d'un gène d'intérêt

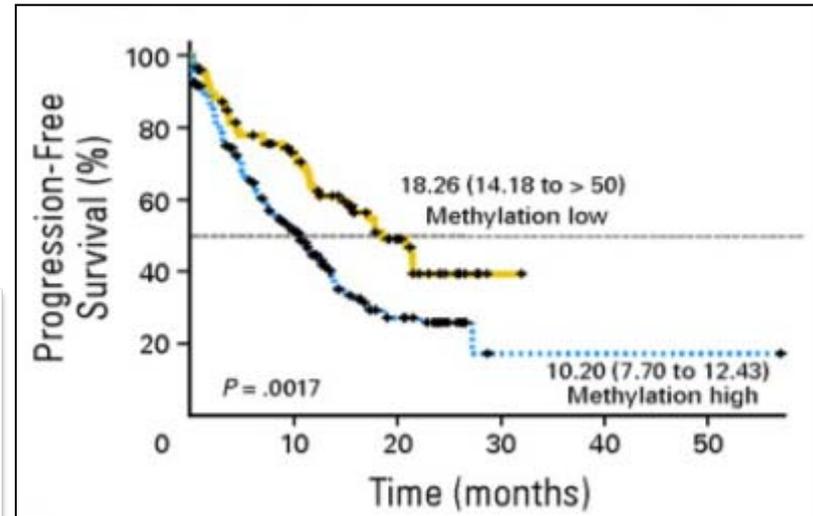
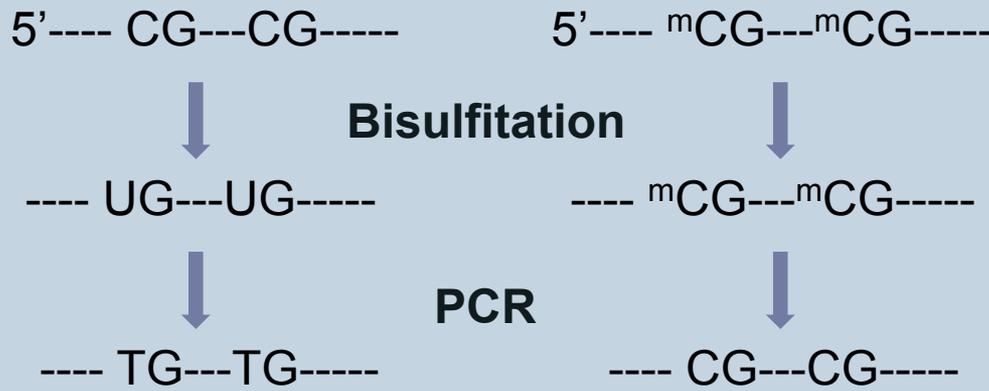
DNA Methylation Predicts Survival and Response to Therapy in Patients With Myelodysplastic Syndromes

Shen... & Issa, JCO 2010

série de 312 patients : étude du profil de méthylation des promoteurs de 10 gènes

Basé sur le principe de la bisulfitation :

conversion des cytosines non méthylées en uracile



Hyperméthylation de ces 10 gènes pronostique pour OS et PFS

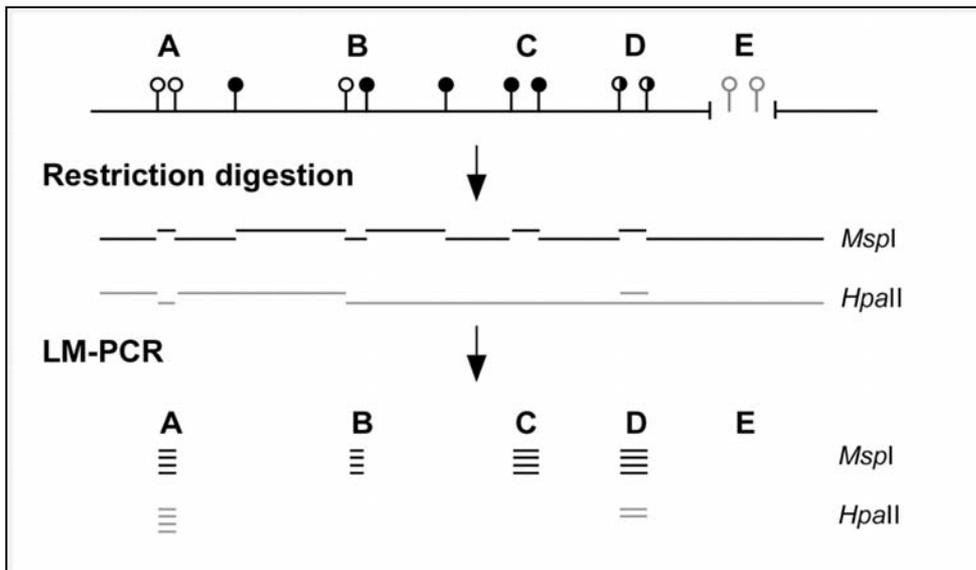
Méthodes d'études du méthylome :

- évaluation pangénomique et puce

MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation

*Figueroa,
Blood, 2009*

=> Méthylation de **50000 sites CpG** sur **14000** promoteurs de gènes



HELP methylation array :

utilisation de 2 enzymes de restriction qui clivent l'ADN au niveau de sites CpG, dont l'une uniquement au niveau des cytosine non méthylées.

⇒ Plus grand nombre de promoteurs méthylés par rapport à des LAM de novo et des témoins
⇒ réversible sous agent hypométhylant



Conclusion

➤ Référentiel GFM et SFH 2009

au diagnostic et en cas d'évolutivité

- Caryotype médullaire systématique, à renouveler en cas d'échec
- FISH en cas
 - d'échec du caryotype médullaire (<20 mitoses) : recherche d'une monosomie 7 et d'une trisomie 8 chez les sujets jeunes, ou d'une délétion 5q si le tableau hématologique est évocateur
 - de caryotype normal chez les sujets jeunes

➤ CGH-array, SNP-array, études du méthylome :

- Intêret physiopathologique => nouvelles cibles ?
 - Intêret pronostique ?
-
- 

Remerciements

Michaela Fontenay, Lionel Ades, Raphaël Itzykson

**Laboratoire d'hématologie du CHRU de Lille et Institut de
Recherches sur le Cancer de Lille :**

Olivier Nibourel, Jean-Luc Lai, Christophe Roumier,
Claude Preudhomme, Bruno Quesnel

The logo for 'sfh' consists of the lowercase letters 's', 'f', and 'h' in a red, sans-serif font. The 's' and 'f' are connected at the top, and the 'h' is positioned to the right.