

AMPLIFICATION(S) DANS UNE LAM

Dr Emilie Klein

Laboratoire d'Hématologie

Secteur de Cytogénétique et Biologie moléculaire des Hémopathies

CHU de Bordeaux

GFCH 06/02/2020



Présentation du cas

- Mme P., 79 ans
- Antécédents
 - Cancer de la thyroïde suivi depuis 4 ans et demi, avec des métastases osseuses, traité plusieurs ostéosynthèses dont la dernière remonte à avril 2019 + 2 radiothérapies
- 19 Novembre 2019 :
 - Asthénie et oppression thoracique depuis 1 mois, avec aggravation depuis 1 semaine.
 - NFS : Bicytopénie + érythro-myélémie + blastose 14%

NFS	
Hématies	2,24 T/L
Hémoglobine	5,2 g/dL
Hématocrite	17,2%
VGM	76,8 fl
CCMH	30,2%
TCMH	23,2 pg
Plaquettes	28 G/L
Leucocytes	5,88 G/L
Poly neutrophiles	3,18 G/L (54%)
Poly éosinophiles	0 G/L (0%)
Poly basophiles	0,12 G/L (2%)
Lymphocytes	0,47 G/L (8%)
Monocytes	0,06 G/L (1%)
Myélémie	1,23 G/L (21%)
Blastes	0,82 G/L (14%)
Erythroblastes	8%

Myelogramme, immunophénotypage

- **Myelogramme :**

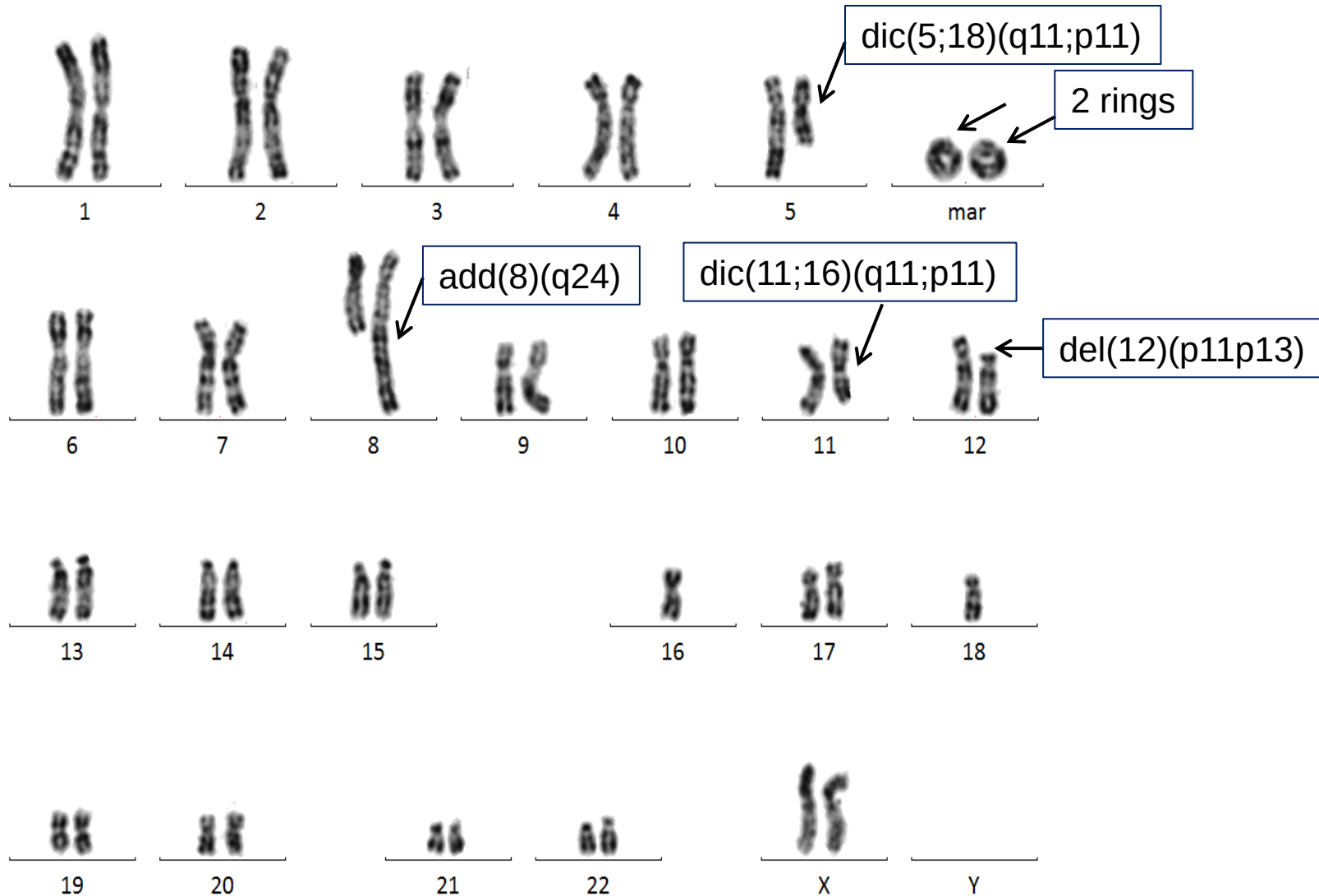
- LAM avec 35% de blastes et dysplasie multilignée

- **Immunophénotypage :**

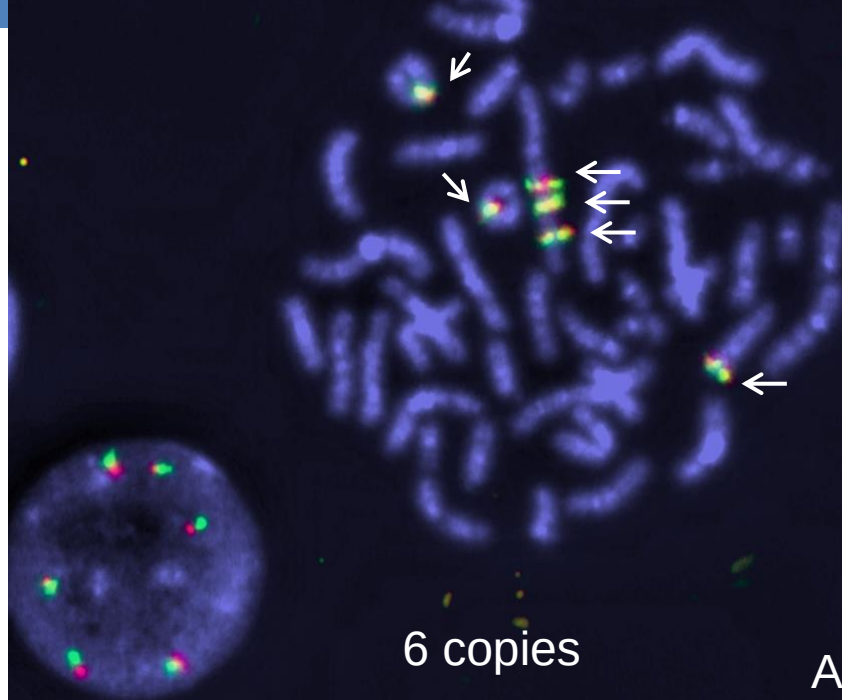
- LAM avec importante hétérogénéité clonale
MPO+/CD34+/CD117+/CD33+/CD36+/CD71+/CD38+ et LAIP
CD7+/CD2+/CD4+
(en l'absence de cCD3 il ne s'agit pas d'une LAL T ou d'une LA
biphénotypique)

Caryotype : complexe avec évolution clonale

44,XX,dic(5;18)(q11;p11),add(8)(q24),dic(11;16)(q11;p11),del(12)(p11p13)[2]/
45,sl,+r[10]/46,sdl1,+r[6]/47,sdl2,+9[2]

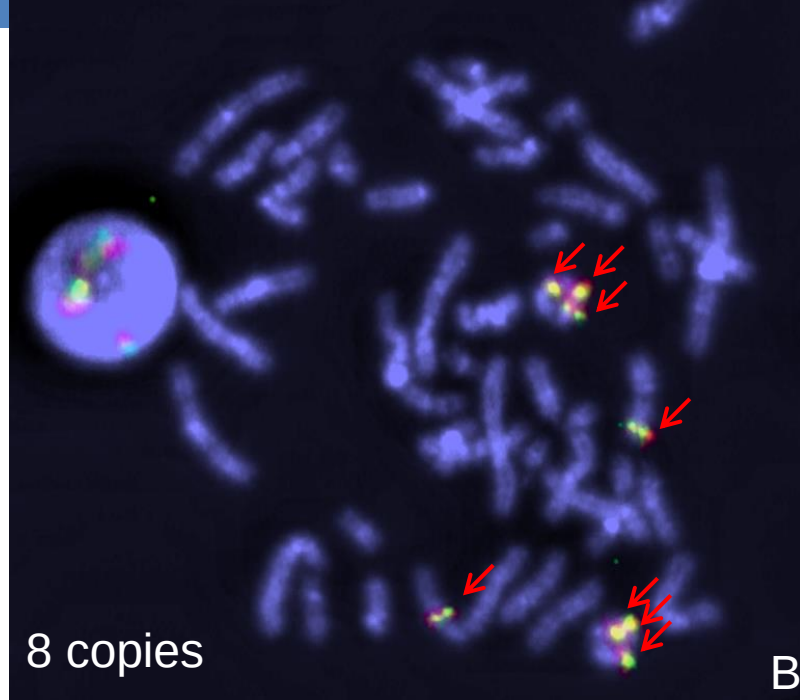


FISH with MYC dual color break-apart probe

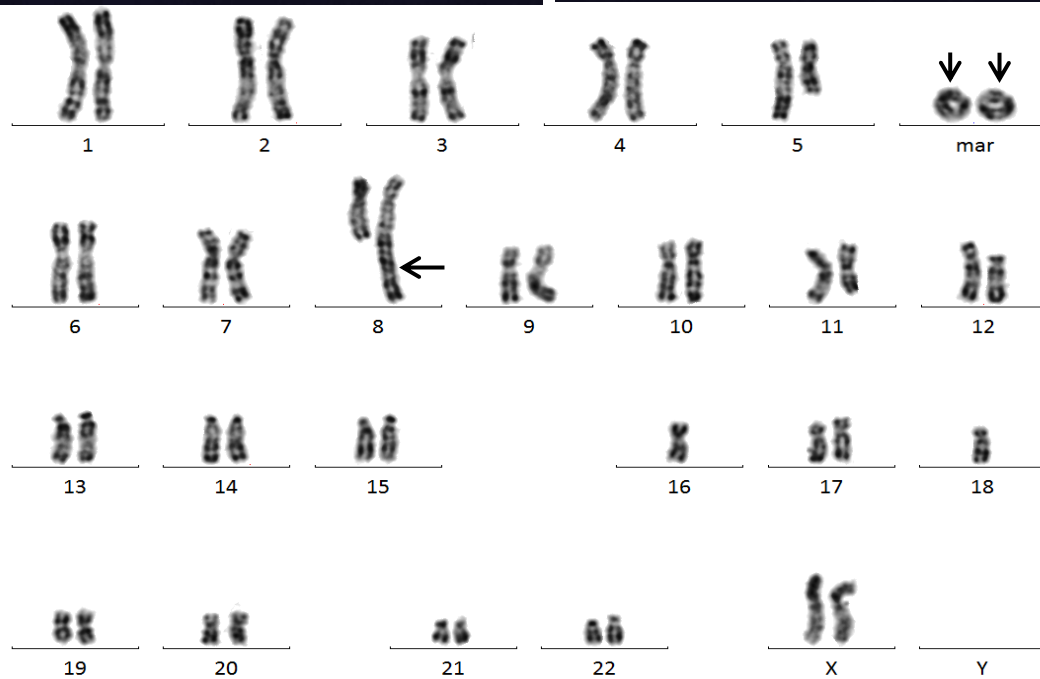


A

FISH with KMT2A dual color break-apart probe



B



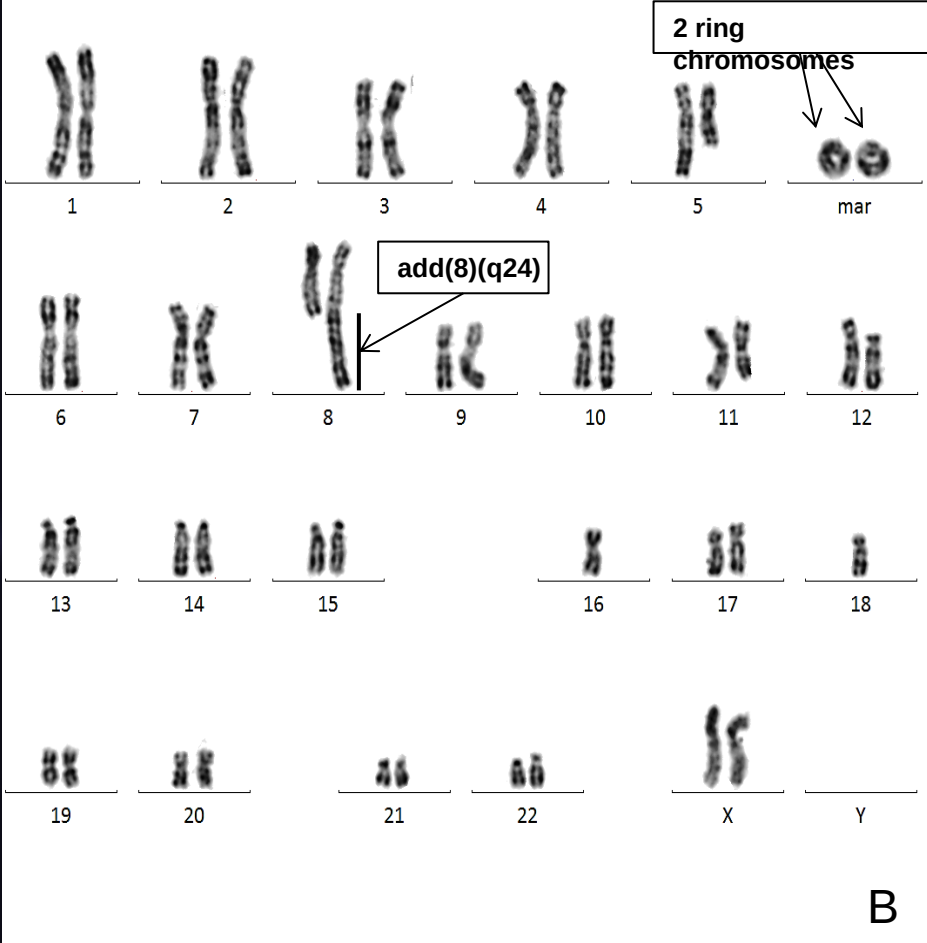
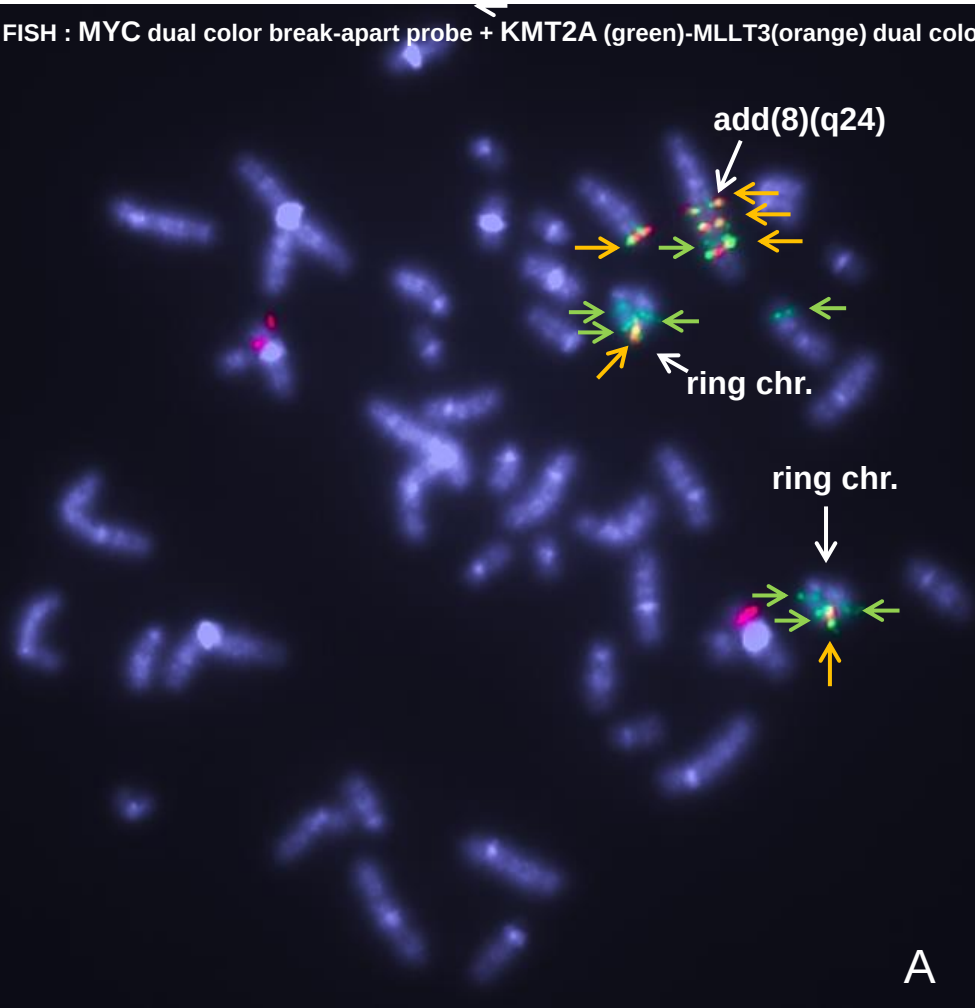
C

Caryotype + FISH

- .ish dic(5;18)(wcp5+,wcp5-),add(8)(MYCx3,MLLx1)[2]/+r(MYCx1,MLLx3)[2]/+r(MYCx1,MLLx3)[2].nuc ish (MYCx5)[74/200], (MYCx6)[59/200],(MLLx8)[114/200],(MLLx5)[31/200]
- La FISH révèle une amplification des gènes MYC et MLL au sein de l'addition de matériel en 8q24 et des chromosomes en anneau vus au caryotype (avec jusqu'à 6 signaux MYC et 8 signaux MLL).
- Mise en évidence d'un caryotype complexe et monosomique associant au sein d'un clone et de plusieurs sous-clones anomalies de nombre et de structure affectant les chr.5,8,9,11,12,16, 18 et présence d'un ou deux chromosomes en anneau. La FISH révélera en plus des amplifications des gènes MYC et MLL. Caryotype de pronostic défavorable dans une LAM et compatible avec une LAM avec modifications liées aux myélodysplasies (LAM-MRC)

Evolution

- Initiation d'un traitement par Vidaza
- Décès 09/01/2020



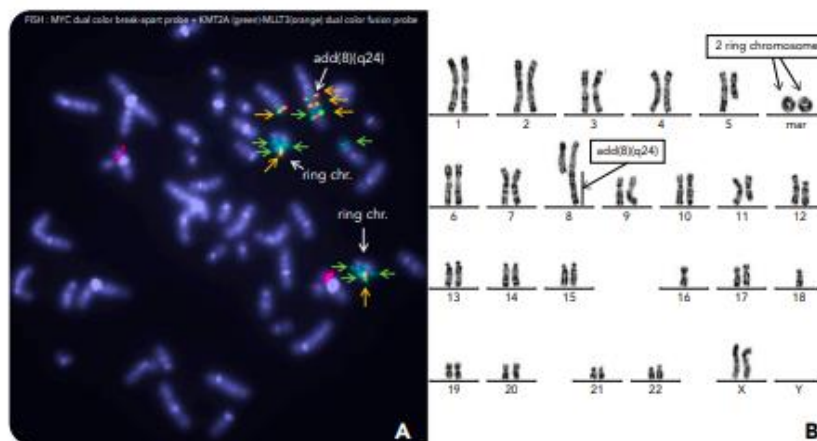
Amplifications géniques

- Nombre de copies? Définition rarement rappelée dans la littérature
 - LAL : détection d'iAMP21 : au moins 3 copies supplémentaires de *RUNX1* regroupées sur un chromosome 21 anormal -> ≥ 5 copies
 - Pas de définition de nombre dans l'ISCN
 - Définition amplification ACMG* :
 - High copy-number gain of sequences, typically containing oncogene(s) that are important for the cancer being studied.
 - The term should not be used to describe a single copy gain of chromosomal material or to describe gain due to polysomy.
 - Standard thresholds used to represent amplification typically range from 3–5 fold increases over baseline ploidy (e.g., intrachromosomal amplification of chromosome 21 [iAMP21] in B-ALL) to >100 copies per genome (e.g., MYCN amplified neuroblastoma) and will vary depending on the type of tumor.

*Technical laboratory standards for interpretation and reporting of acquired copy-number abnormalities and copy neutral loss of heterozygosity in neoplastic disorders: a joint consensus recommendation from the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Cancer Genomics Consortium (CGC); Fady M.Mikhail, American College of Medical Genetics and Genomics, sept 2019

MYC and KMT2A multiple extra copies in acute myeloid leukemia

Emilie Klein and Audrey Bidet, CHU Bordeaux



An 80-year-old woman with a prior history of thyroid cancer cured with surgery and ionizing radiation therapy presented with asthenia, weight loss, and chest tightness. A complete blood count revealed bicytopenia (hemoglobin, 5.0 g/dL; platelets, $42 \times 10^9/L$), and peripheral blood smear examination showed 14% blasts. The bone marrow was infiltrated by 35% blasts and showed multilineage dysplasia. Immunophenotyping analysis showed positivity for MPO, CD34, CD33, CD117, CD36, CD71, and CD38; aberrant positivity for CD2, CD4, and CD7; and negativity for cCD3 and CD19. These results led to a diagnosis of therapy-related acute myeloid leukemia. Cytogenetic analysis revealed a complex karyotype, which was, according to the 2016 International System for Human Cytogenetic Nomenclature, described as: 44,XX,dic(5;18)(q11;p11),add(8)(q24),dic(11;16)(q11;p11),del(12)(p11p13)(2)/45,sl,+r[10]/46,sdl1,+r[6]/

47,sdl2,+9[2] (panel B, conventional karyotype, R-banding). Interestingly, fluorescence in situ hybridization analysis revealed a concurrent gain of multiple extra copies of 2 genes, MYC (6 copies) and KMT2A (8 copies), in the additional material in 8q24 and in ring chromosomes (panel A, fluorescence in situ hybridization original magnification $\times 1000$, MYC dual color break-apart probe [orange arrows] and KMT2A-MLLT3 dual color fusion probe [green arrows for KMT2A]). The patient was treated with azacitidine.

Single gene gain of multiple extra copies or amplification is already a rare phenomenon in acute myeloid leukemia (<1%), associated with poor prognosis, but concurrent gain of multiple extra copies of 2 genes in the same clone is exceptional.

Amplifications géniques et LAM

- Relativement fréquent dans les cancers solides
- Rares dans les hémopathies : 1% des LAM
- Amplification génique souvent considérée comme un biomarqueur de pathologies agressives, souvent résistantes aux traitements
- Amplifications au sein d'hsr ou dmin le plus souvent, ou ring chr. ou marqueurs
- Souvent therapy related AML (radiations-alkylants-antimetabolites)
- Amplifications géniques : MYC, MLL, EVI1
- Amplifications doubles exceptionnelles : uniquement qq cases report dans la littérature (sous-estimé?)

Amplification MYC

- Mécanisme formation dmin : modèle de l'épisome :
 - segments d'ADN sont excisés du chromosome puis circularisés par fusion des bords excisés puis amplifiés
 - souvent associé à une délétion du gène amplifié sur le chromosome
- dmin MYC+ : souvent associées à des délétions 8q, notamment en 8q24
- MYC : facteur de transcription nucléaire impliqué dans le cycle cellulaire-> surexpression pourrait être associée à prolifération ++ et mauvais pronostic...
- Région amplifiée en 8q24 contient MYC mais également 7 gènes dont **TRIB1** et **PVT1**
- MYC ne serait pas le gène cible de l'amplification : *
 - pas de surexpression de MYC mais en revanche de
 - **TRIB1** (pseudokinase, rôle dans voies de signalisation notamment MAPK)
 - **PVT1** long non -coding RNA gene : contrôle expression de MYC; amplifications dans K solides associées à mauvais pronostic-> pistes thérapies ciblées)
- Associées aux mutations TET2, DNMT3A, TP53*

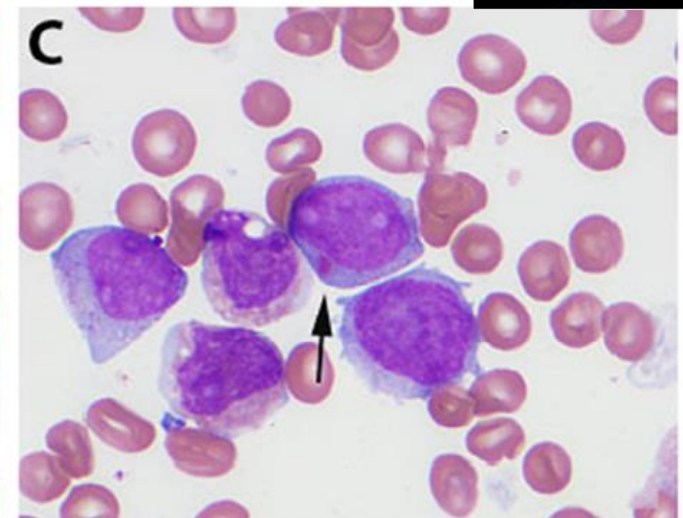
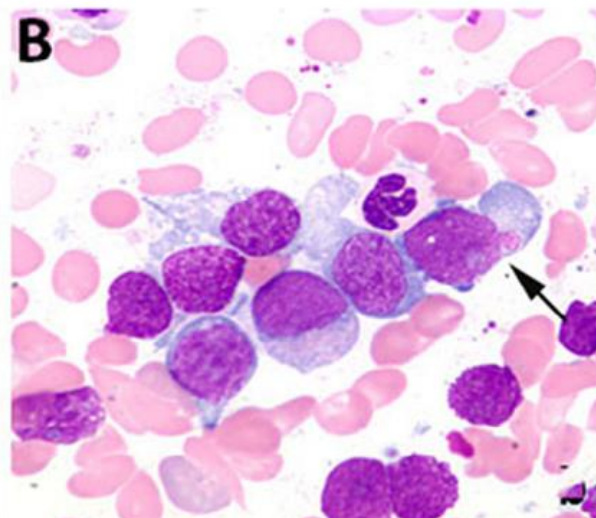
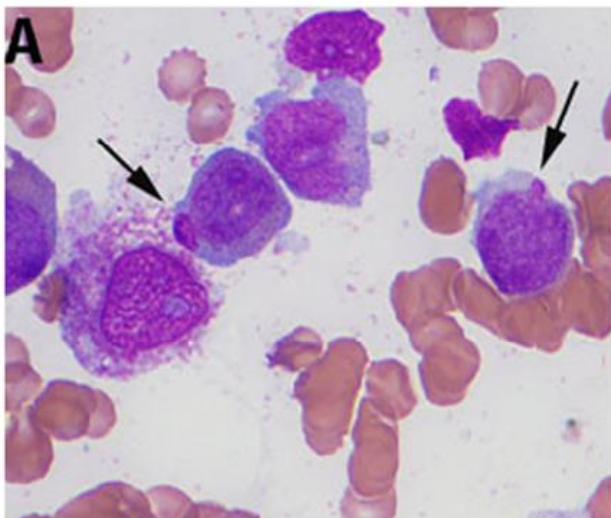
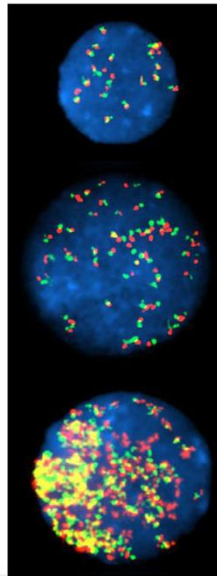
*(Storlazzi et al –Hum mol genet 2004;Storlazzi et al-Leukemia 2018);Xu et al-Molecular cancer 2019

Amplification MLL

- MLL : code pr histone methyltransferase
- Rôle crucial dans la régulation épigénétique (modif post-traductionnelles des histones) de la transcription de gènes impliqués dans le développement embryonnaire et l'hématopoïèse
- LAM = ~5% de translocations MLL; plus de 130 gènes partenaires; mécanisme de leucémogénese selon le gène cible de la translocation -> profils d'expression distincts selon la surexpression de HOXA5,HOX7,HOXA9,MEIS1
- Amplifications dans chr. marqueurs, hsr, ring chromosomes, plus rarement dmin
- Amplification d'une zone de 10MB -> surexpression MLL + autres gènes cibles dont HOXA9 et MEIS1 -> prolifération cellulaire, blocage de différenciation, survie cellulaire

Série de 18 cas d'amplifications (MYC et MLL)

- Mise en évidence de bourgeonnements nucléaires (micronoyaux)
- Les micronoyaux apparaîtraient lorsque les chr. sont en retard lors de la division cellulaire. La cellule fille résultante aurait alors 2 noyaux:
 - un micronoyau qui contiendrait le/les chr. mal ségrégué(s)
 - un noyau principal qui contiendrait le reste des chr.
- Les chromosomes à l'intérieur des micronoyaux sont susceptibles de subir un chromothripsis (théorie chromothripsis infirmée par Storlazzi et al –Leukemia 2018). Les divisions cellulaires ultérieures pourraient produire des cellules filles qui ont soit un caryotype diploïde avec des chromosomes dmin, soit un chromosome fortement réarrangé, identifiable à l'analyse du caryotype comme chromosome marqueur, ainsi que des chromosomes dmin (Zang et al Nature 2015)
- Médiane de survie de 5 mois



Amplification MLL

Original contribution

MLL gene amplification in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes is associated with characteristic clinicopathological findings and *TP53* gene mutation[☆]

Guilin Tang MD, PhD^{a,*}, Courtney DiNardo MD^b, Liping Zhang MD^a, Farhad Ravandi MD^b, Joseph D. Khoury MD^a, Yang O. Huh MD^a, Tariq Muzzafar MD^a, L. Jeffrey Medeiros MD^a, Sa A. Wang MD^a, Carlos E. Bueso-Ramos MD^a

^aDepartment of Hematopathology, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX 77030, USA

^bDepartment of Leukemia, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX 77030, USA

- Série de 21 hémopathies myéloïdes avec amplification MLL
- 11 AML-MRC; 6 t-AML; 4 t-MDS
- Caryotypes complexes (dont 16 hypodiploïdes) pour tous les patients avec svt : -5/del5q, -18, -17/del17p;
- Mutations TP53 chez les 12 patients testés
- Cytologiquement blastes souvent vacuolés et bilobés + dysmyélopoïèse
- Coagulopathies fréquentes : 7 CIVD, 3 hémorragies cérébrales
- Tous résistants aux thérapeutiques instaurées (chimios standard ou hypométhylants)
- Survie médiane 1 mois

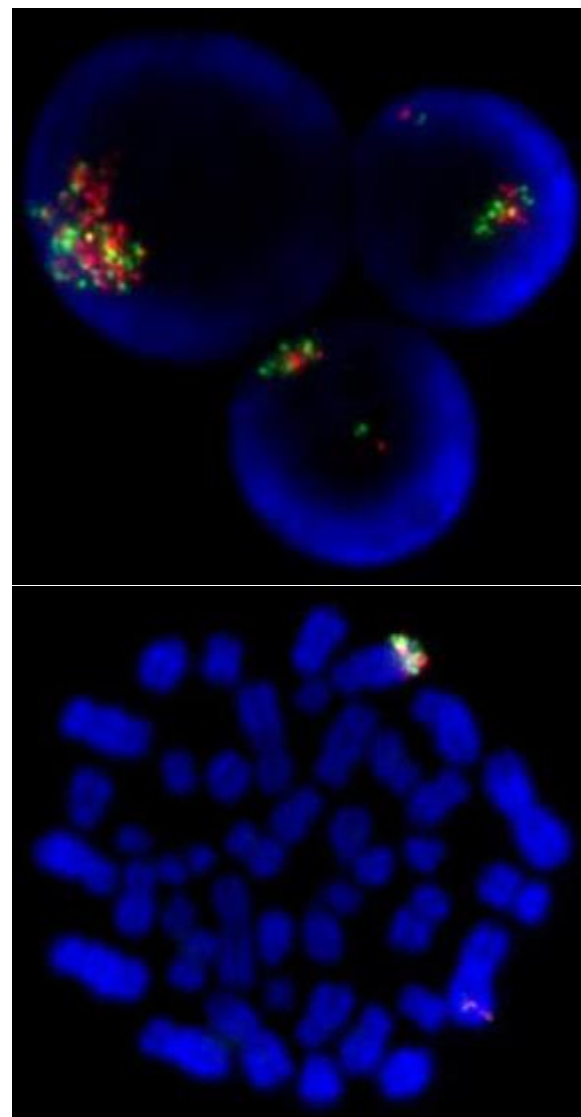
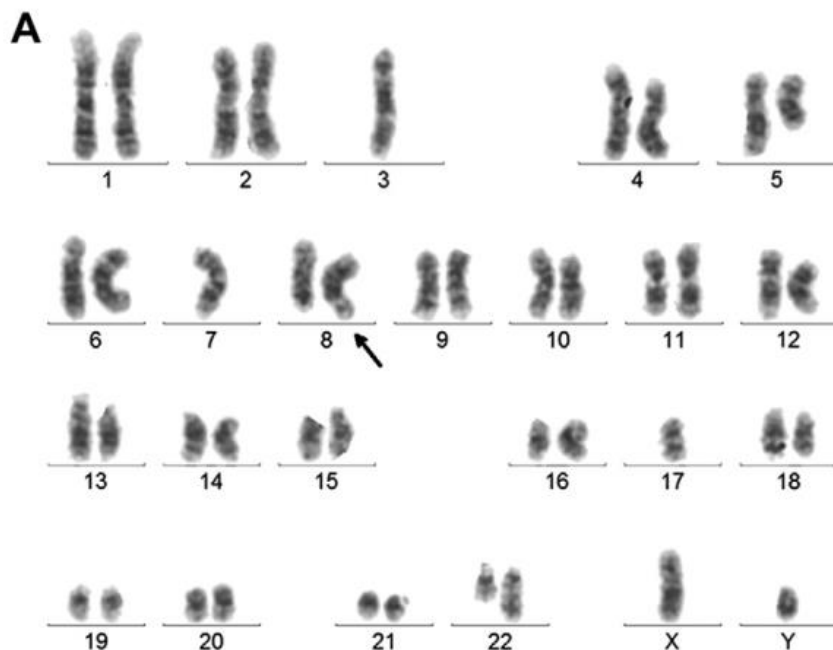
Acute panmyelosis with myelofibrosis with *EVI1* amplification

Beata Grygalewicz^{a,*}, Renata Woroniecka^a, Anna Pastwińska^a,
Jolanta Rygier^a, Paulina Krawczyk^a, Katarzyna Borg^b, Hanna Makuch-Łasica^b,
Elżbieta Patkowska^c, Barbara Pieńkowska-Grela^a

^a Cytogenetic Laboratory, Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Centre and Institute, Warsaw, Poland; ^b Genetic Laboratory, Institute of Haematology and Transfusion Medicine, Warsaw, Poland; ^c Department of Haematology, Institute of Haematology and Transfusion Medicine, Warsaw, Poland

Amplification *EVI1*

- Case report patient : panmyélose aiguë avec myélofibrose
- Caryotype complexe
- Amplification au niveau d'un der(8)ins(8;3)(q24;q26.1q26.3)hsr(8;3)(q24;q26.1)



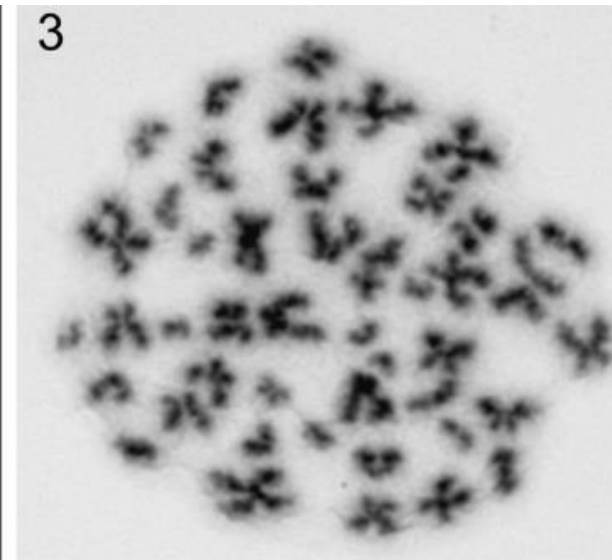
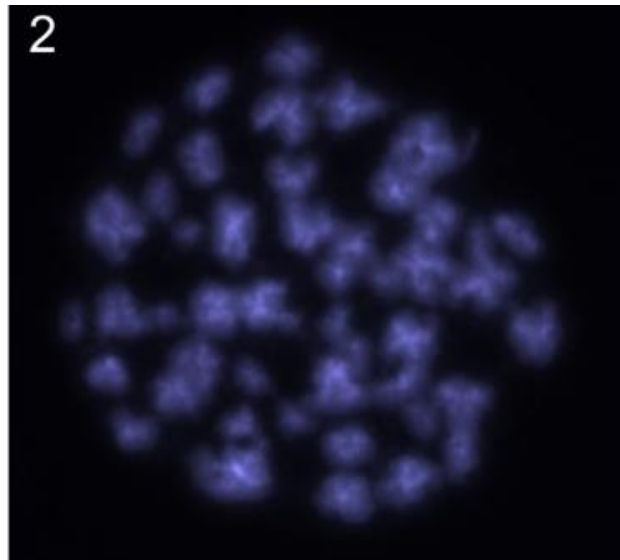
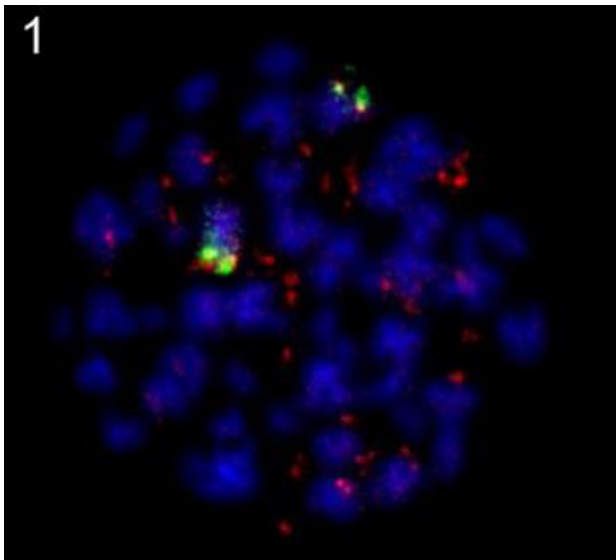
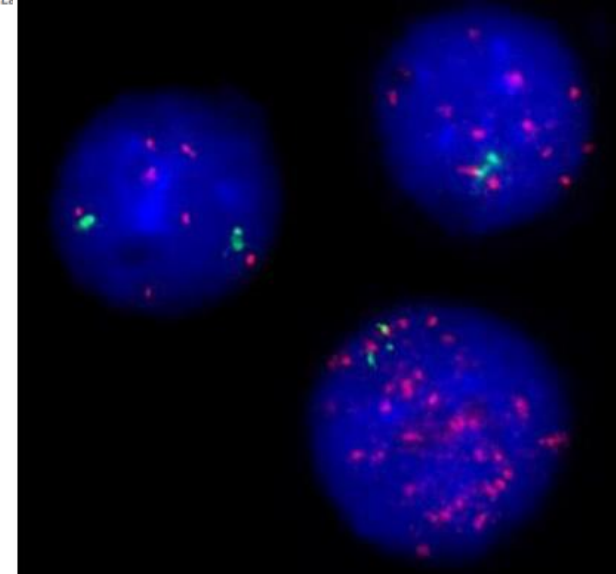
BRIEF COMMUNICATION

Amplification of *EVI1* on cytogenetically cryptic double minutes as new mechanism for increased expression of *EVI1*

Sarah Volkert, Susanne Schnittger, Melanie Zenger, Wolfgang Kern, Torsten Haferlach, Claudia Haferlach*
MLL Munich Leukemia Laboratory, Munich, Germany

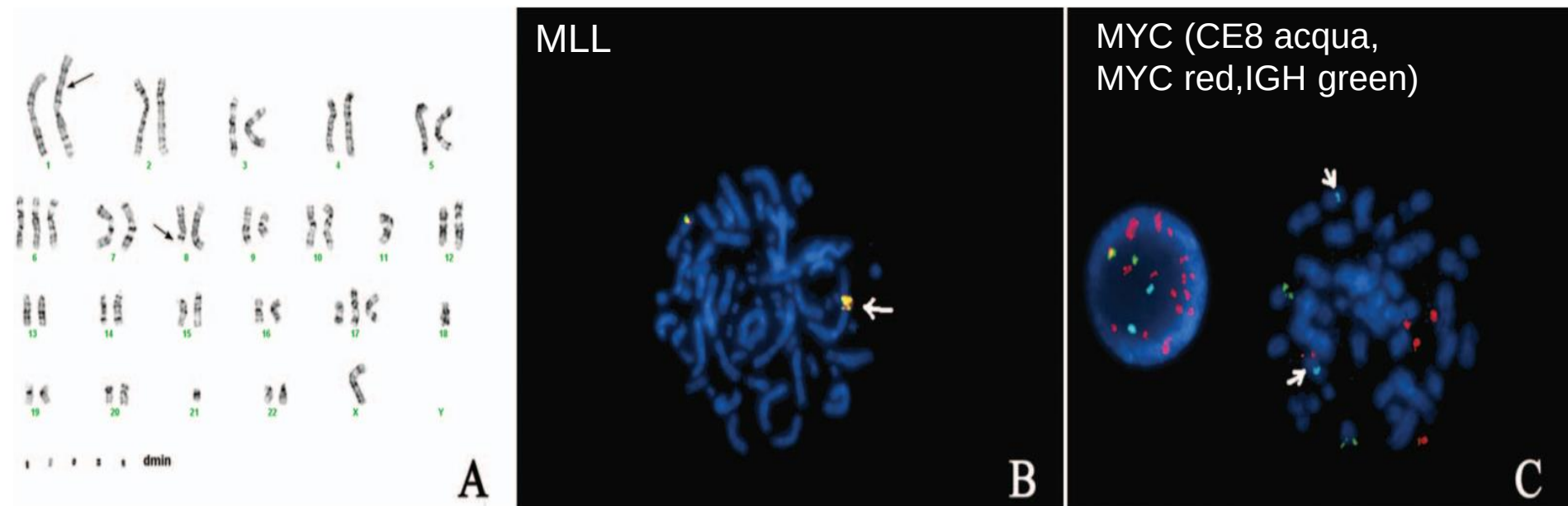
Amplification *EVI1*

- Série de 4 patients :
 - 3 SMD avec excès de blastes, 1 t-LAM, thrombopénie + anémie
- Caryotype :
 - 2 sans anomalies additionnelles
 - 1 avec un chr.7 en anneau,
 - 1 avec caryotype complexe avec r(5) et -7
- FISH : Amplification de la partie centromérique de la sonde sous forme de dmin



Doubles Amplifications et LAM

- Concurrent *MYC* and *MLL* amplification on dmin and hsr in acute myeloid leukemia*
- Caryotype complexe



Case Report

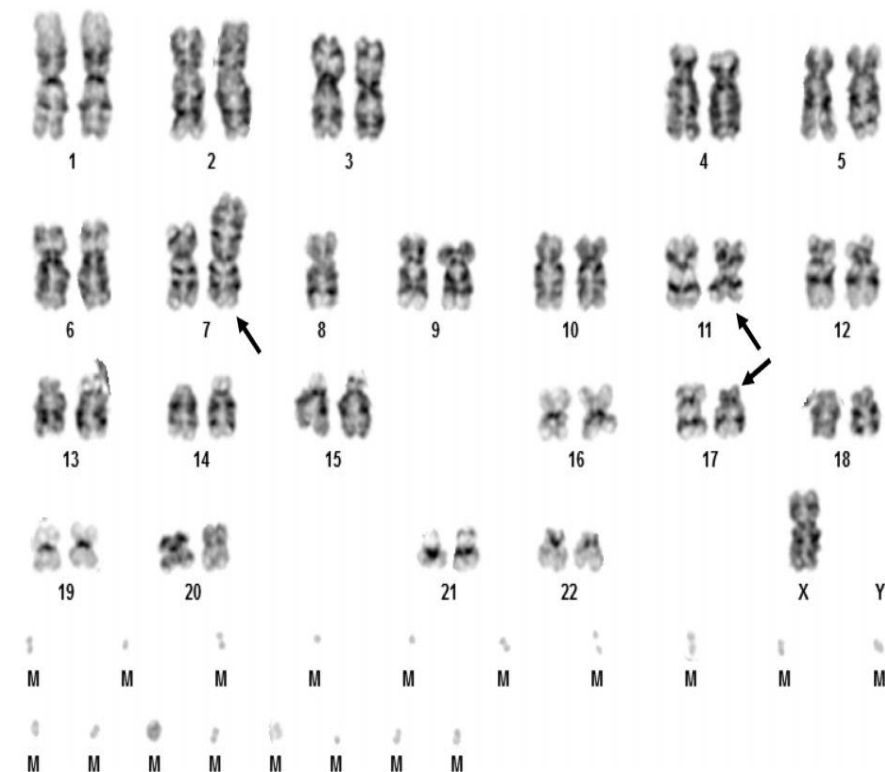
Cytogenomic characterization of double minute heterogeneity in therapy related acute myeloid leukemia

Prasad Koduru^a, Weina Chen, Barbara Haley, Kevin Ho, Dwight Oliver, Kathleen Wilson^aDepartment of Pathology, and Division of Hematology and Oncology, Department of Medicine, UT Southwestern Medical Center, Dallas, USA

- Amplification MYC et MLL dans dmin différentes mais au sein du même clone.
- t-LAM (18 mois post K sein traité par chirurgie + chimio + radiothérapie)
- Caryotype complexe avec 2 clones

45,XX,add(7)(p22),-8,idic(11)(q11),add(17)(p11.2),dmin[cp15]/90<4n>,idemx2[cp5]

- Résistante au ttt d'induction
- Survie 21 mois



Case Report

Cytogenomic characterization of double minute heterogeneity in therapy related acute myeloid leukemia

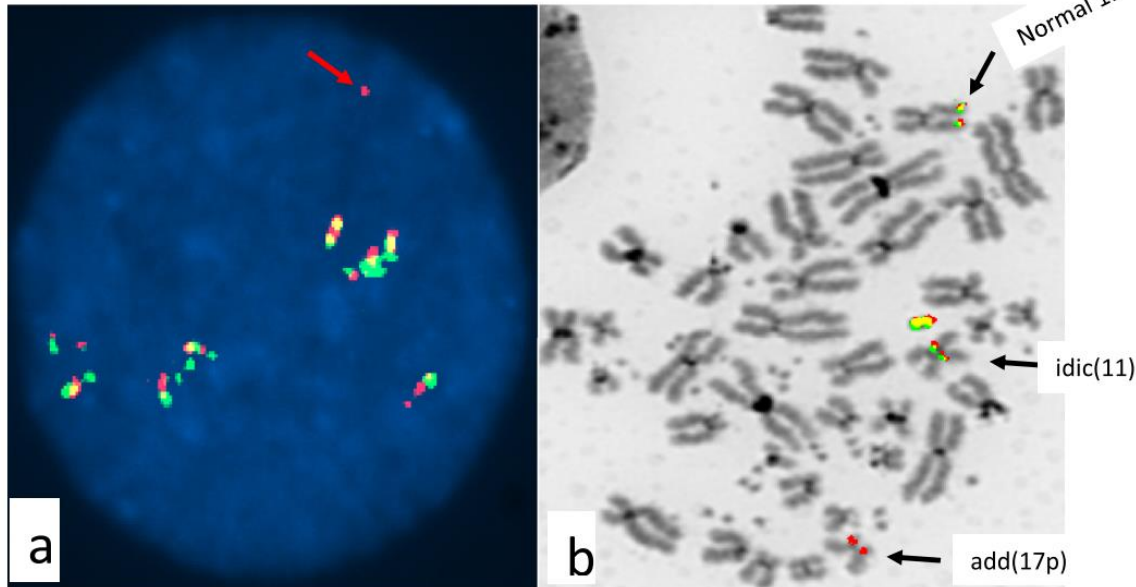
Prasad Koduru^a, Weina Chen, Barbara Haley, Kevin Ho, Dwight Oliver, Kathleen Wilson^a Department of Pathology, and Division of Hematology and Oncology, Department of Medicine, UT Southwestern Medical Center, Dallas, USA

Fig. 4. FISH with *KMT2A* probe. a. An interphase nucleus showing amplification and partial deletion (arrow), b. metaphase FISH showing signal on the *idic(11)* chromosome and on a *dmin*.

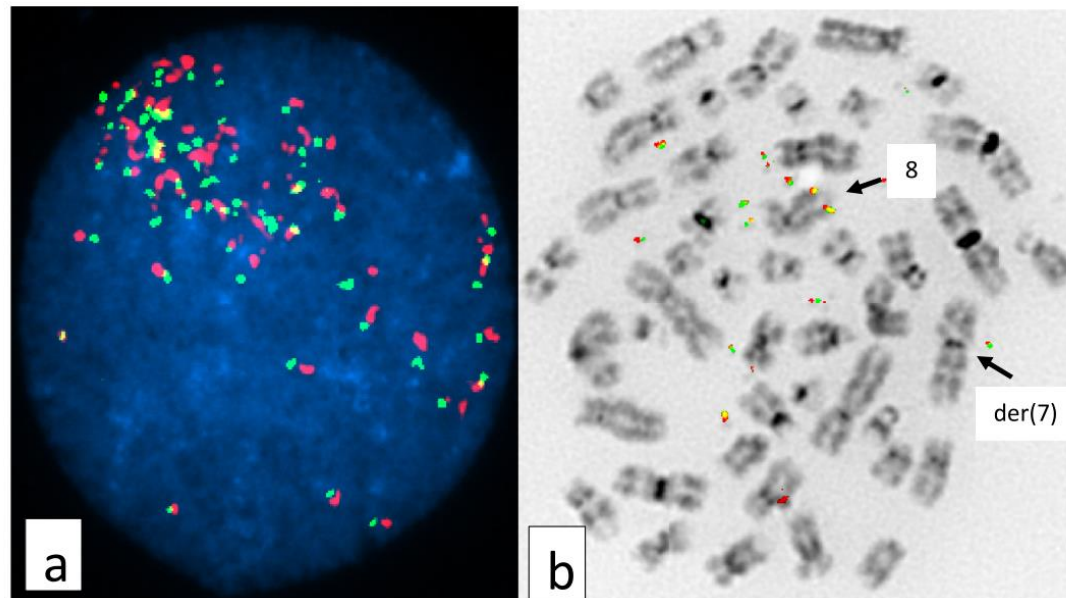


Fig. 6. FISH with *MYC* break-apart probe on a interphase nucleus, and (b) on a metaphase. Signal was present on the normal 8 and on some *dmin*, but not on the *der(7)*.

**Amplification MYC
et MLL dans dmin
différentes mais au
sein du même
clone.**

Conclusion

- Amplifications géniques rares dans les hémopathies (~1% des LAM)
- Hsr, dmin, ring chr., chr. marqueurs
- Amplifications les + fréquentes dans LAM : MYC et MLL
- Association à caryotypes complexes avec fréquentes délétion/mutation TP53
- Doubles amplifications géniques exceptionnelles
- Pronostic péjoratif avec résistance au traitements, survies courtes
- Mieux comprendre la physiopathologie de ces amplifications -> trouver des thérapies ciblées

REMERCIEMENTS

GFCH

Equipe de cytogénétique du CHU De Bordeaux :

Dr Audrey Bidet, Sandrine Achard, Stéphanie Dupont-Mouffakir, Elodie Laharanne, Gaëlle Paul, Michèle Plault.