

Détection du réarrangement KMT2A-MLLT10

Importance du Design des sondes break-apart *à propos de 2 cas*

A.Daudignon

M.Muller

- **Enfant de sexe féminin – 18 mois** – inclusion dans protocole MyeChild

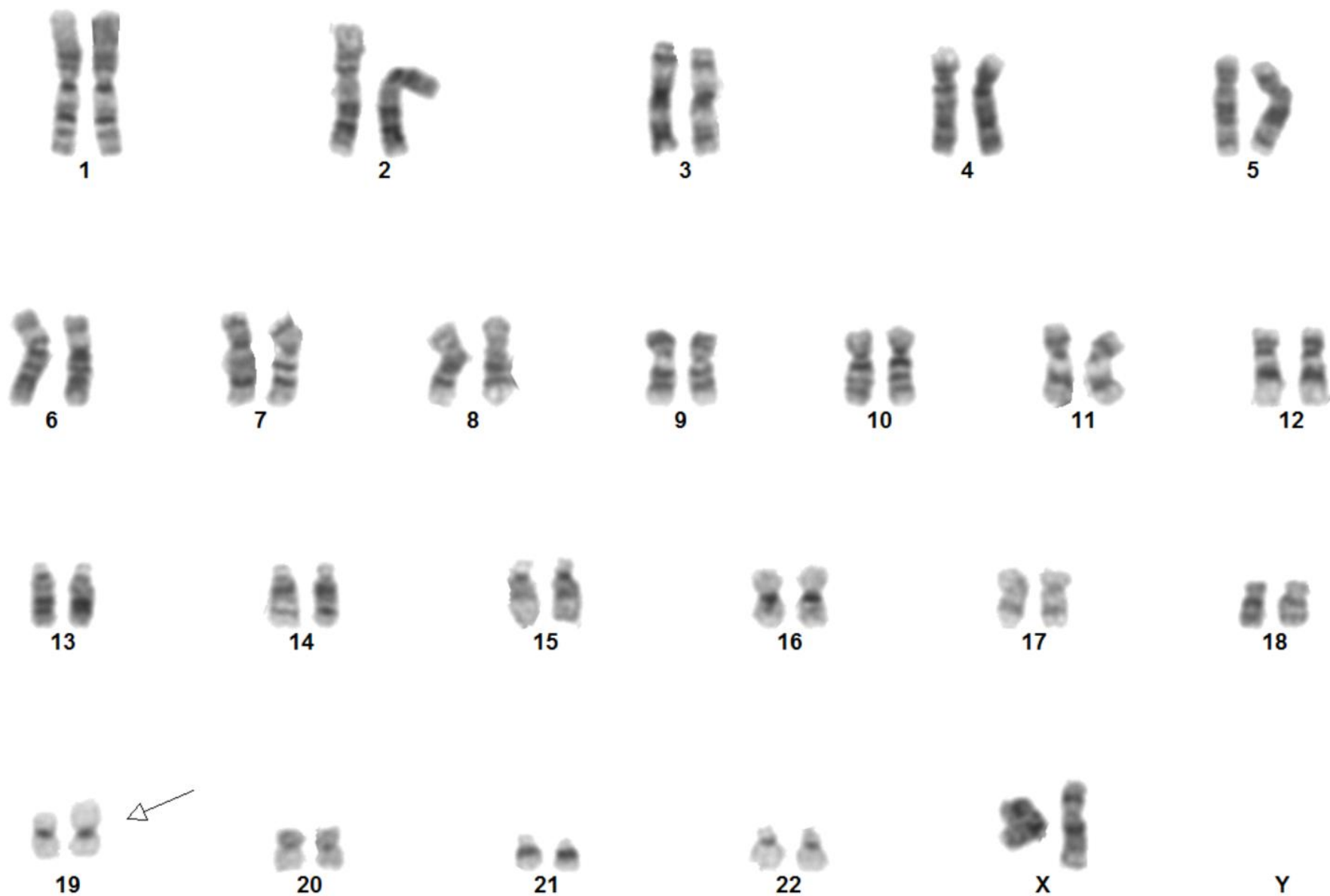
- **Immunophénotype**

HLA Dr modérée, CD34- CD38- CD117- CD13- **CD33+** CD10- CD19- CD56- CD4 de très faible intensité CD36 partiel pour 16% des blastes CD2+ d'intensité modérée Cd3cyto neg, CD7 neg CD 56- CD64- CD11b positif faiblement CD123+ CD14- CD65-

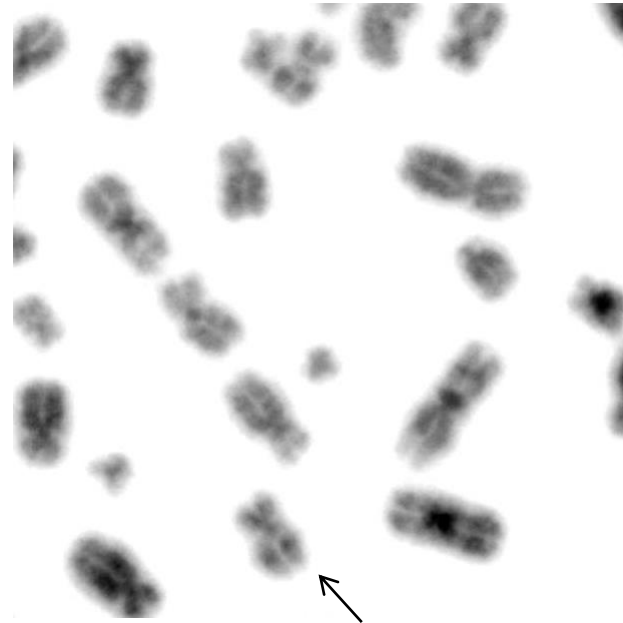
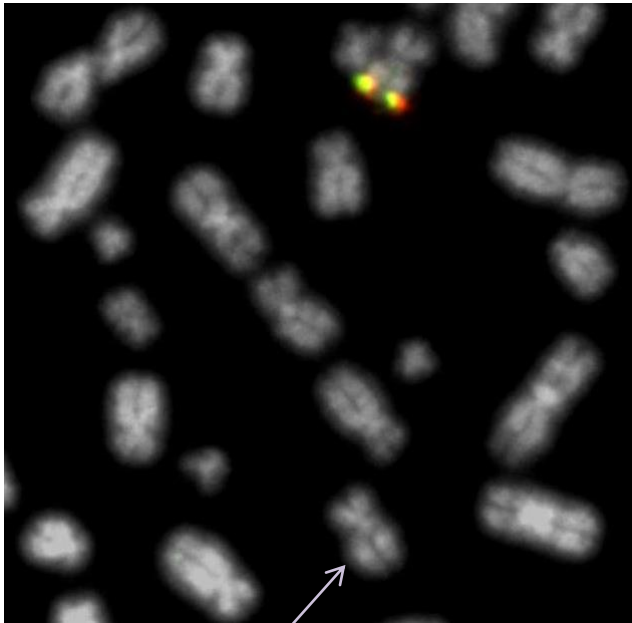
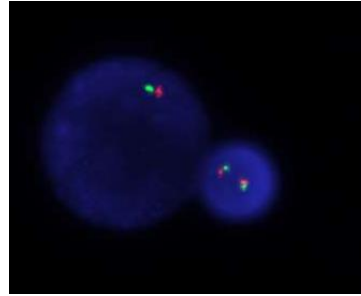
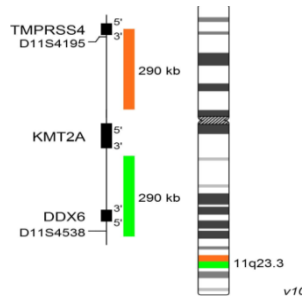
Devant ce phénotype qui est inhabituel pour une LAM , complément de phénotype qui a permis d'objectiver une positivité pour le CD41 et le CD61 et une négativité pour la Glycophorine A.

LAM mégacaryoblastique, M7 selon FAB.

➤ **Caryotype sur Moelle** - banding GTG- 46,XX,?add(19)(p13)[9]/46,XX[1]



METASYSTEMS



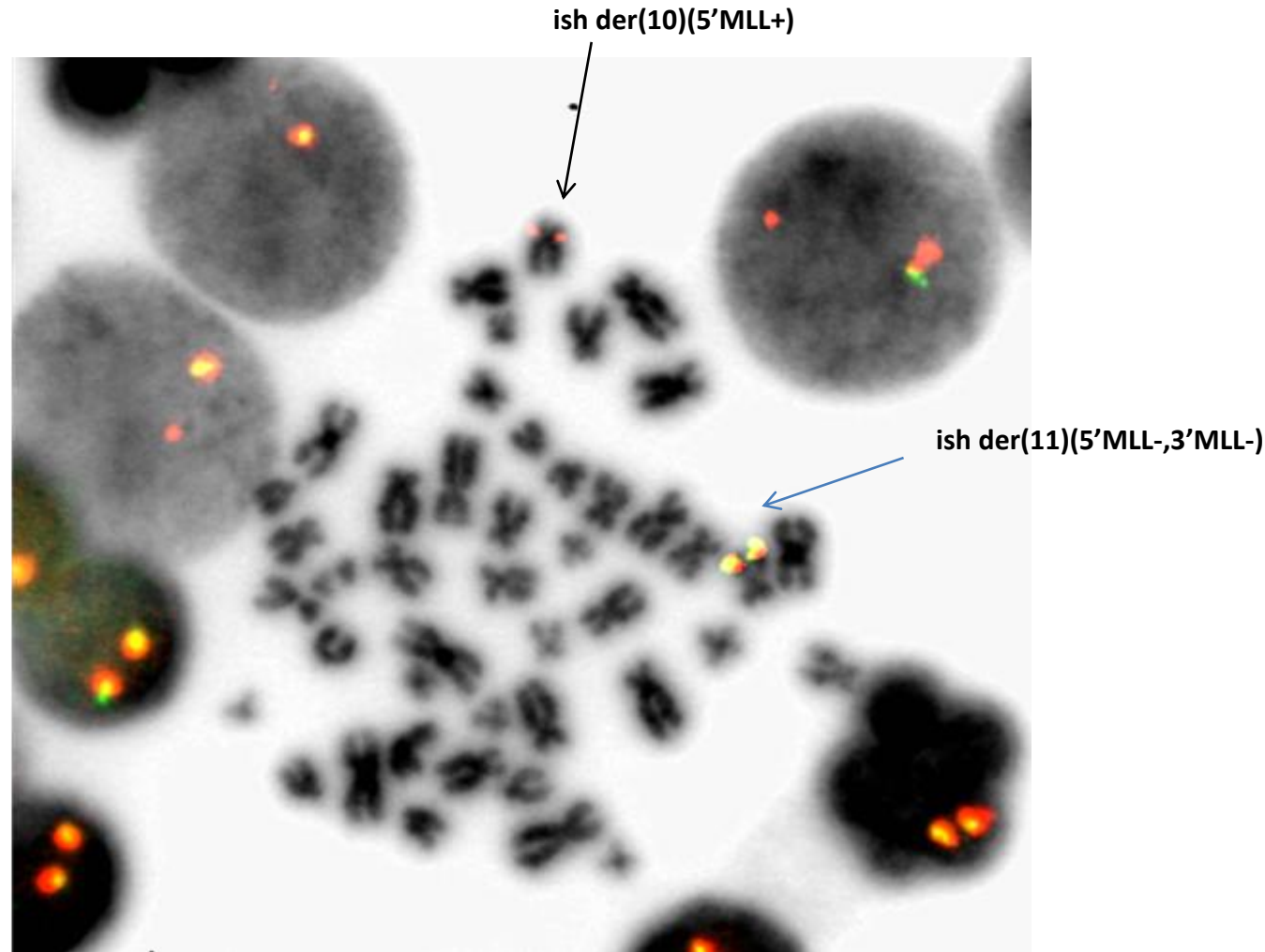
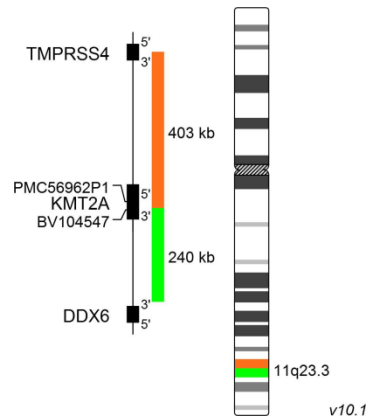
➤ ish der(11)(MLL-)

del(11)

Pas de réarrangement de MLL visible
 Délétion d'un allèle sur 1 chromosome 11
 ➤ Retour de RT-MLPA : transcrit KMT2A-MLLT10

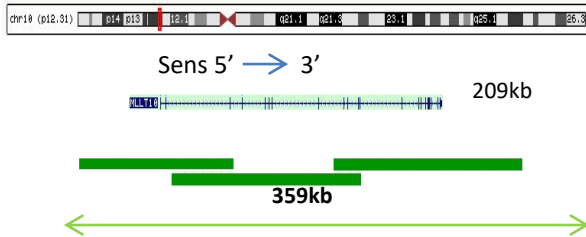
XL KMT2A Break apart

METASYSTEMS



- Insertion du 5'KMT2A en 10p (+ signal rouge dim), avec délétion du 3'KMT2A associée

MLLT10 probe

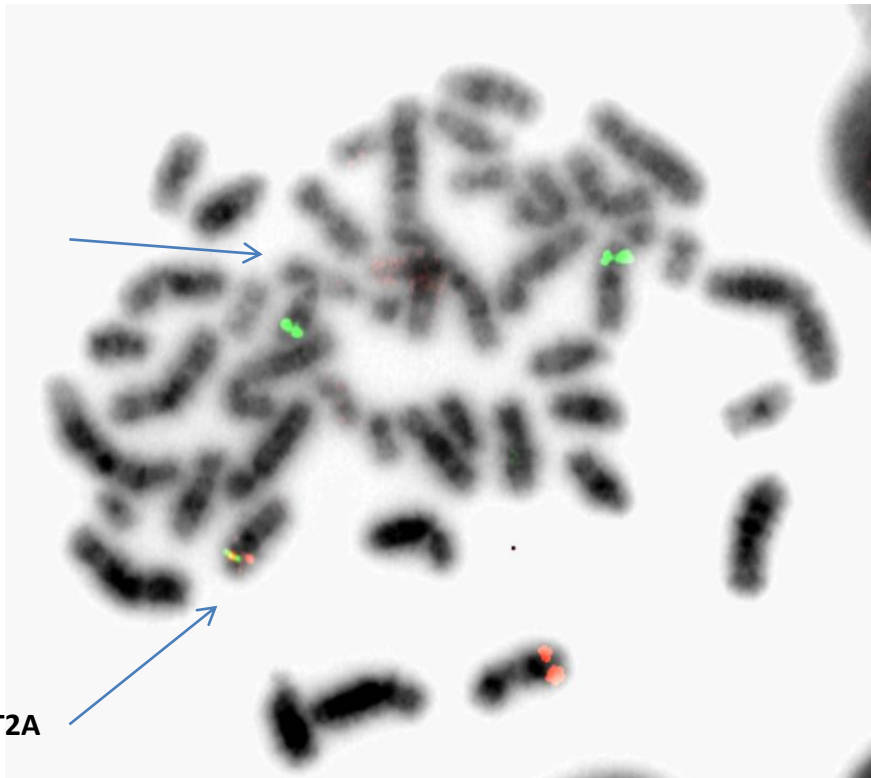


KMT2A probe



der(11)(MLLT10+)

Fusion MLLT10-KMT2A



- Fusion KMT2A-MLLT10 sur le der(10)
- Il s'agit d'une translocation puisque 1 signal MLLT10 est retrouvé sur le der(11)
- Il y a bien une délétion du signal 3'KMT2A résiduel

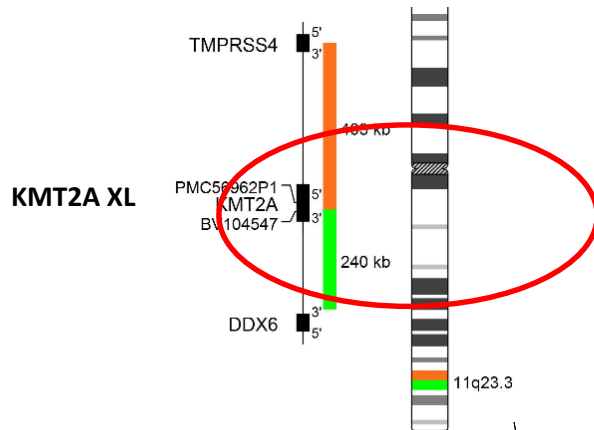
Bilan :

- Réarrangement **MLLT10-KMT2A** par translocation **t(10;11)** cryptique avec réarrangement KMT2A-MLLT10 en 10p12, associée à la délétion de la région 11q23 résiduelle.
- Sondes *KMT2A* break-apart
 - Sonde encadrant *KMT2A* : aspect d'hybridation en faveur d'une délétion du locus *KMT2A* sur 1 de chromosome 11
 - Sonde couvrante break-apart, visualisation d'une insertion du signal 5'*KMT2A* en 10p12, et perte du signal vert associé à la région 3'*KMT2A*
 - Sonde double fusion KMT2A-MLLT10, fusion KMT2A-MLLT10 sur der(10), signal MLLT10+ sur le der(11), perte du signal 3'*KMT2A* résiduel.

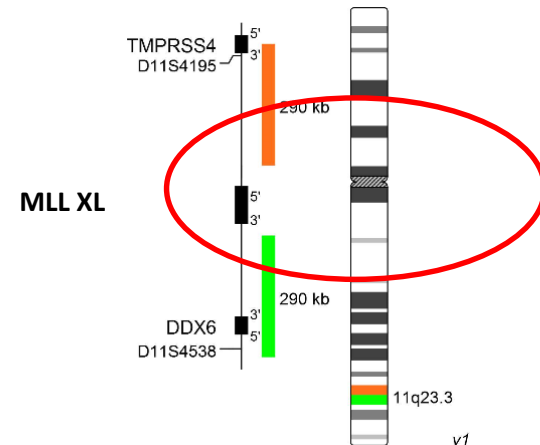
METASYSTEMS MLL=KMT2A gène avec noms différents:

il existe 2 sondes chez Metasystems au « design » différent avec éloignement différent par rapport au gène:

KMT2A XL ref D-5090-100-OG



MLL plus XL ref D-5060-100-OG



Sur ce dossier, le remaniement de KMT2A-MLLT10 est mis en évidence avec la sonde KMT2A break-apart couvrante.

La sonde de translocation KMT2A-MLLT10 finit de valider le mécanisme : translocation + délétion associée

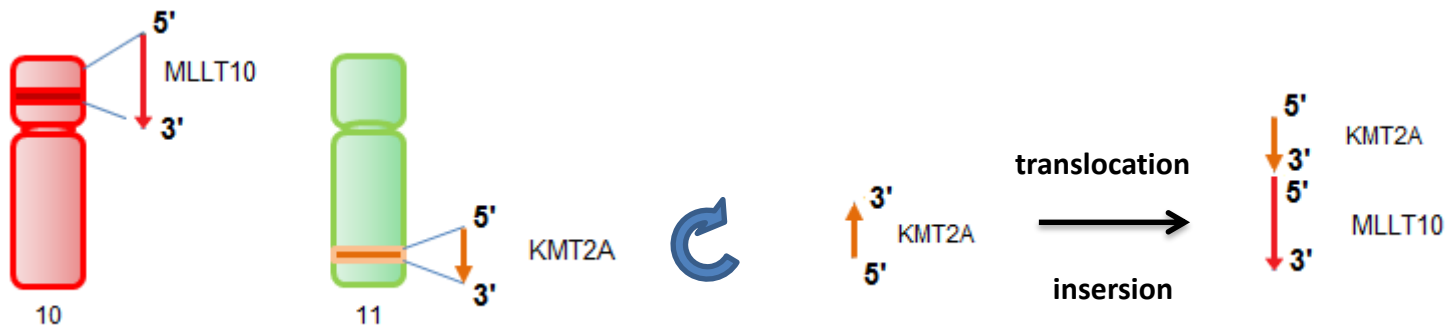
Mais le mécanisme est forcément un peu plus complexe.



Point sur le réarrangement KMT2A-MLLT10

Le réarrangement de KMT2A avec MLLT10 fait parti des réarrangements de MLL complexes nécessitant au moins 2 étapes :

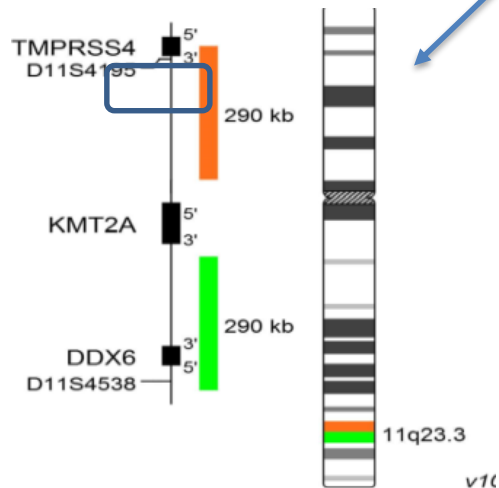
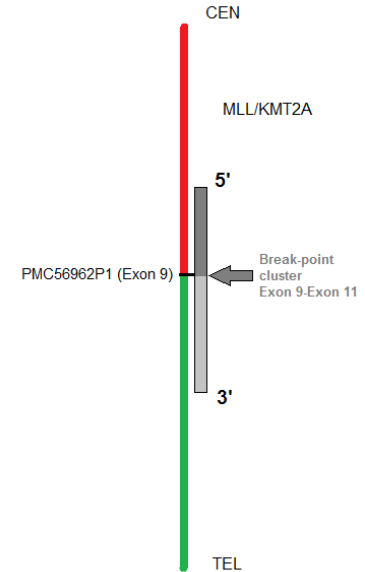
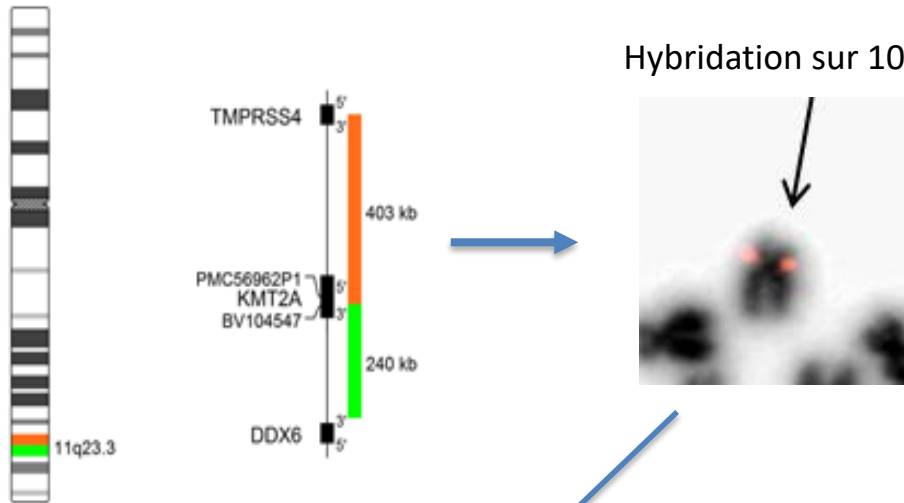
- En effet, KMT2A et MLLT10 sont positionnés en sens inverse sur le brin d'ADN, ce qui nécessite avant leur fusion un mécanisme d'inversion pour que les deux gènes soient dans la même orientation transcriptionnelle.



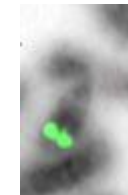
- Les inversions qui précèdent le transfert ont pour but de casser et mettre en sens opposés le 5'KMT2A de l'exon 1 à exon 9 ou 11 (région de cassure la plus courante 95% des cas de réarrangement de *KMT2A*)

En revanche le second point de cassure de l'inversion est variable, ainsi que le site de cassure de la seconde étape.

- C'est pourquoi le design des sondes break-apart est important



➤ Il s'agit d'une translocation puisque 1 signal **MLLT10** est retrouvé sur le der(11)
(Sonde KMT2A rouge / MLLT10 verte, double couleur, double fusion)



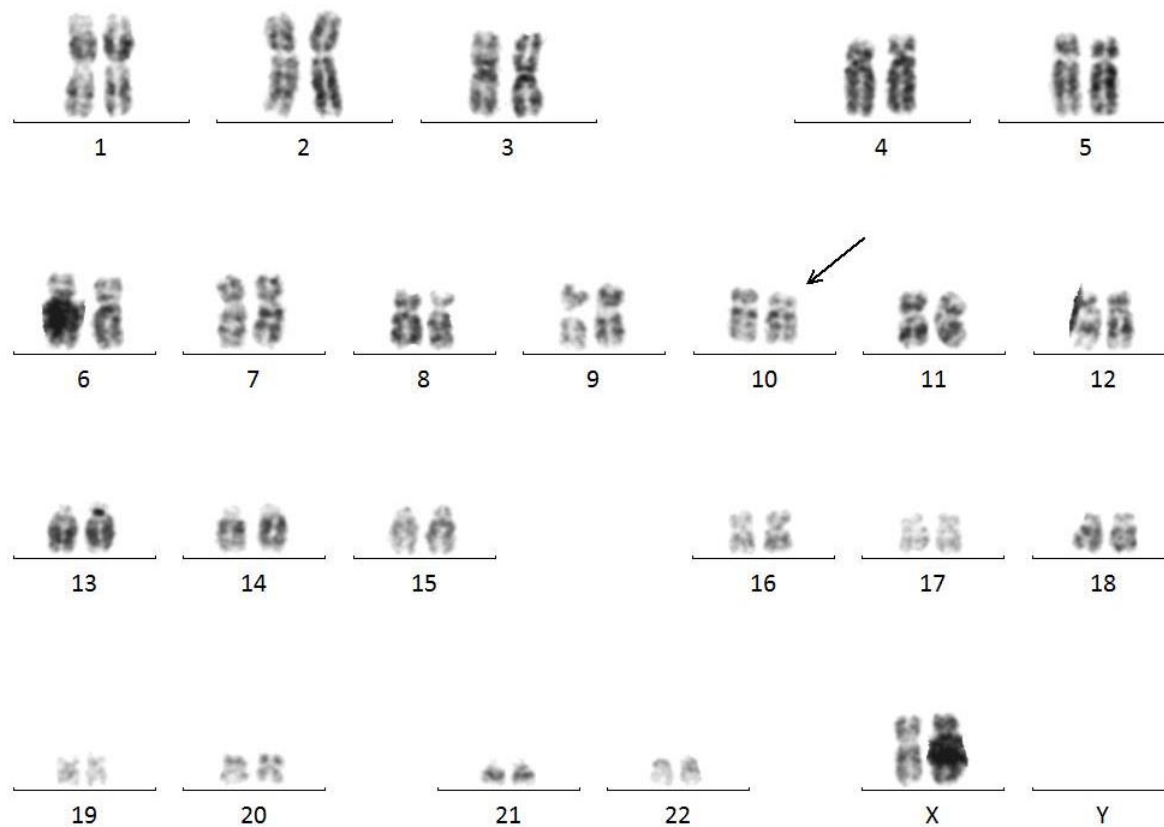
+

Et délétion du
3'KMT2A

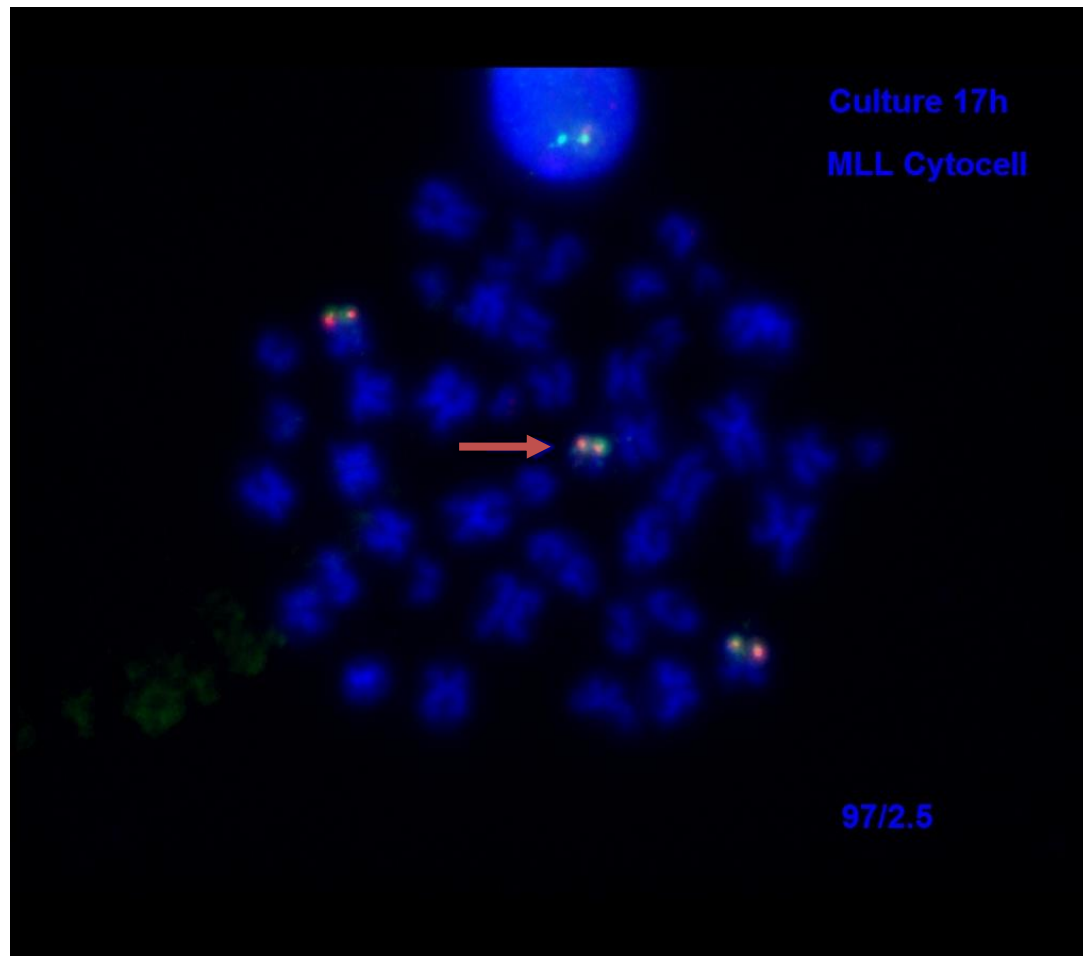
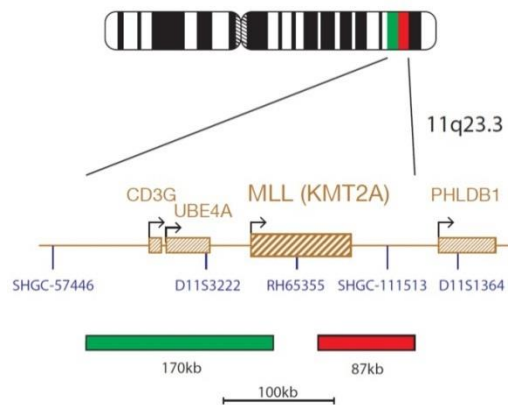
DE

- Bilan de lésions cutanées (hemangiomatose néonatale) réalisées chez un nourrisson de 16 semaines
- Bilan lésion cutanée: prolifération monotone blastoïde de phénotype CD45,MPO et CD33 compatible avec une LAM
- Bilan médullaire:84% blastes évocateur d'une LAM5
 - Phénotypage des cellules immatures : cellules CD45+, n'exprimant pas GD2 : non en faveur d'un neuroblastome.
 - Population majoritaire CD45+ exprimant : HLA DR+ exprimant des marqueurs myéloïdes : MPO+ iCD13+ CD33+ CD117+ et monocytaires : CD14+, CD4+, CD11b+ CD64+ en faveur d'une leucémie aiguë myéloïde à composante monoblastique.

DE : caryotype (QFQ)

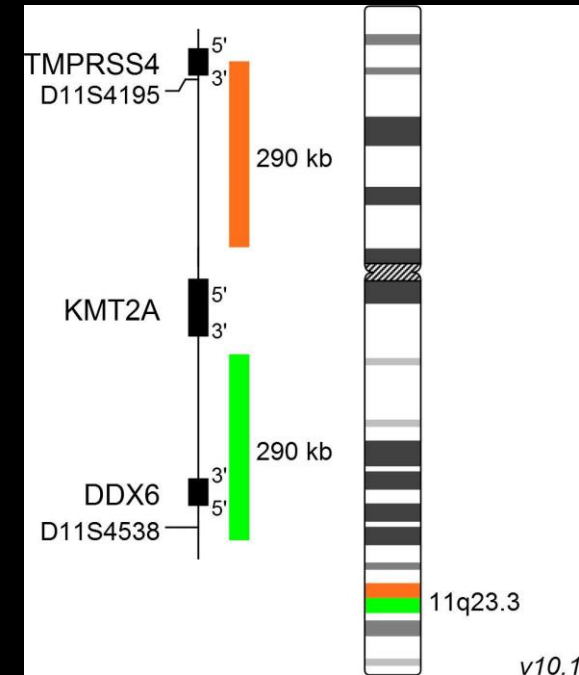
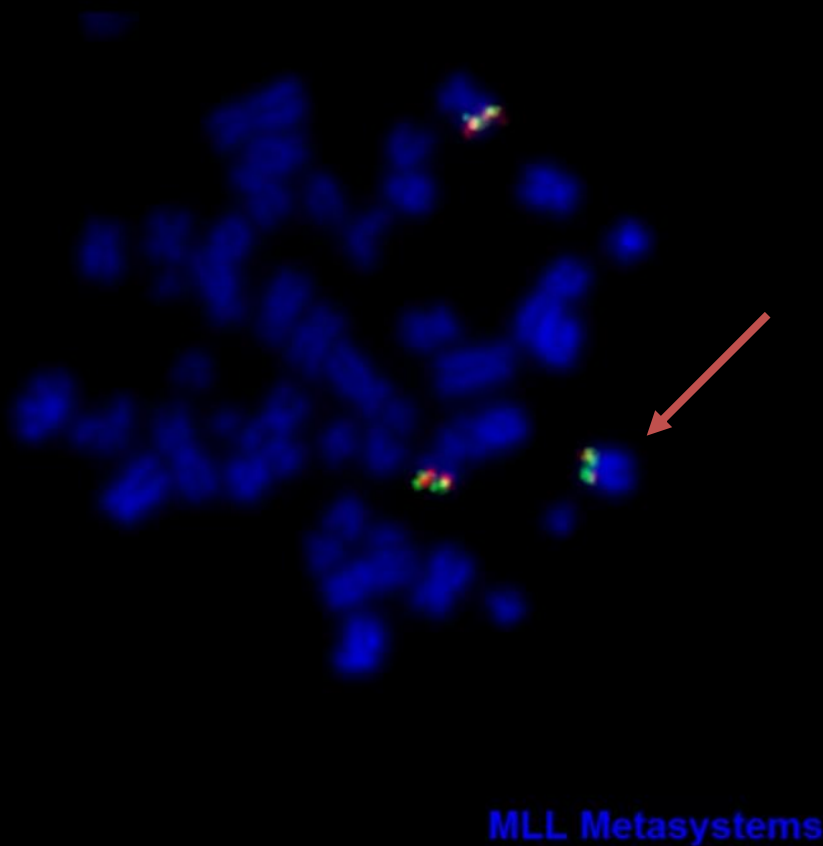


46,XY,del(10)(p12)

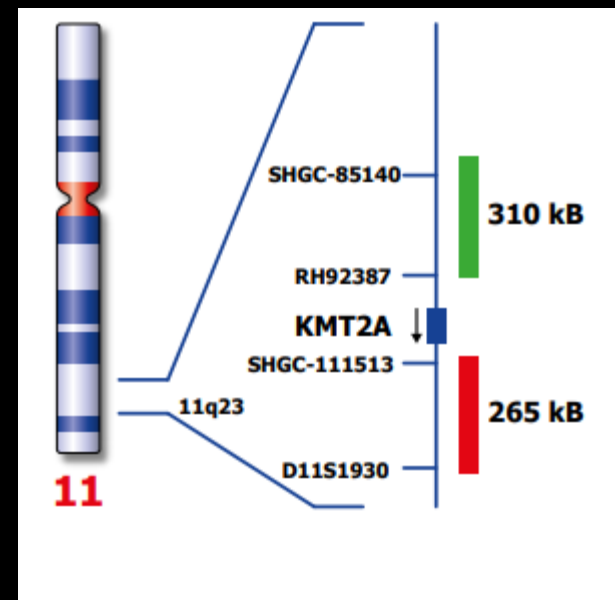
DE : FISH sonde MLL cytocell

3 signaux de fusion KMT2A(MLL), dont 1 signal sur le del(10)(p12)

DE FISH sonde MLLplus Metasystem



2 signaux de fusions + 1 fusion avec sonde 5' rouge au signal affaibli



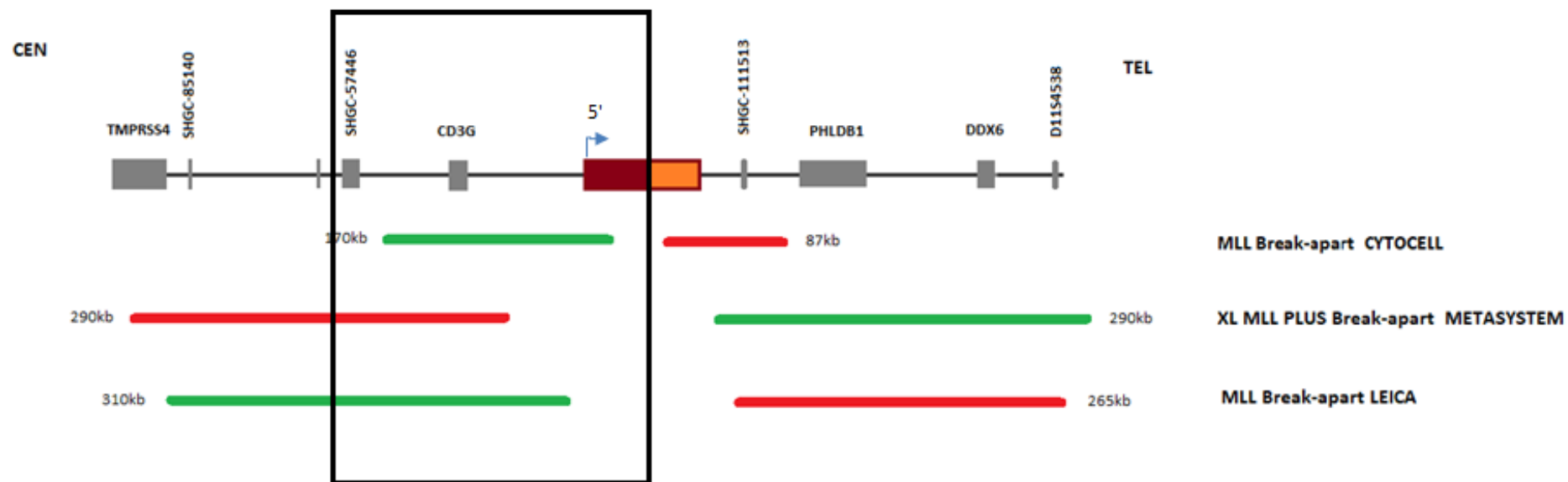
2 signaux de fusions + 1 fusion avec sonde 5' vert au signal affaibli

DE Au final

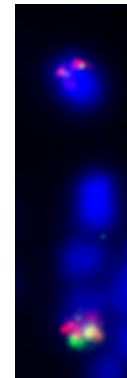
- 46,XX,del(10)(p12)[39]/46,sl,+19[2]/46,XX[2].ish
der(10)t(10;11)(p12;q2?3)(5'KMT2A dim+,3'KMT2A+,WCP11+,WCP10+)[7].nuc ish(KMT2Ax3)[82/100]
- L'analyse FISH d'une sonde KMT2A break-apart montre la présence de 3 signaux KMT2A sans cassure dans 12 des 14 mitoses et 82 des 100 noyaux.
 - La localisation du troisième signal KMT2A semblant sur le bras court du chr.10
 - l'analyse FISH de sonde de peinture des chr.10 et 11 révèle la présence de matériel du chr.11 sur le chr.10 sans matériel du chr.10 sur les 2 chr.11 observés.
- L'hybridation in situ de sondes KMT2A (KMT2A,11q23 Break apart,Leica) et (XL MLL plus break apart, metasystems) montre toutes les deux une diminution de l'intensité du signal de la région 5' sur le der(10) dans 4 mitoses parmi 4 compatible avec un réarrangement KMT2A.
- Conclusion: L'ensemble est en faveur d'une translocation déséquilibrée entre le bras court du chr.10 et le bras long d'un chr.11 incitant à rechercher une fusion KMT2A-MLLT10
- Fusion confirmée par RT MLPA.

Mécanisme supposé :

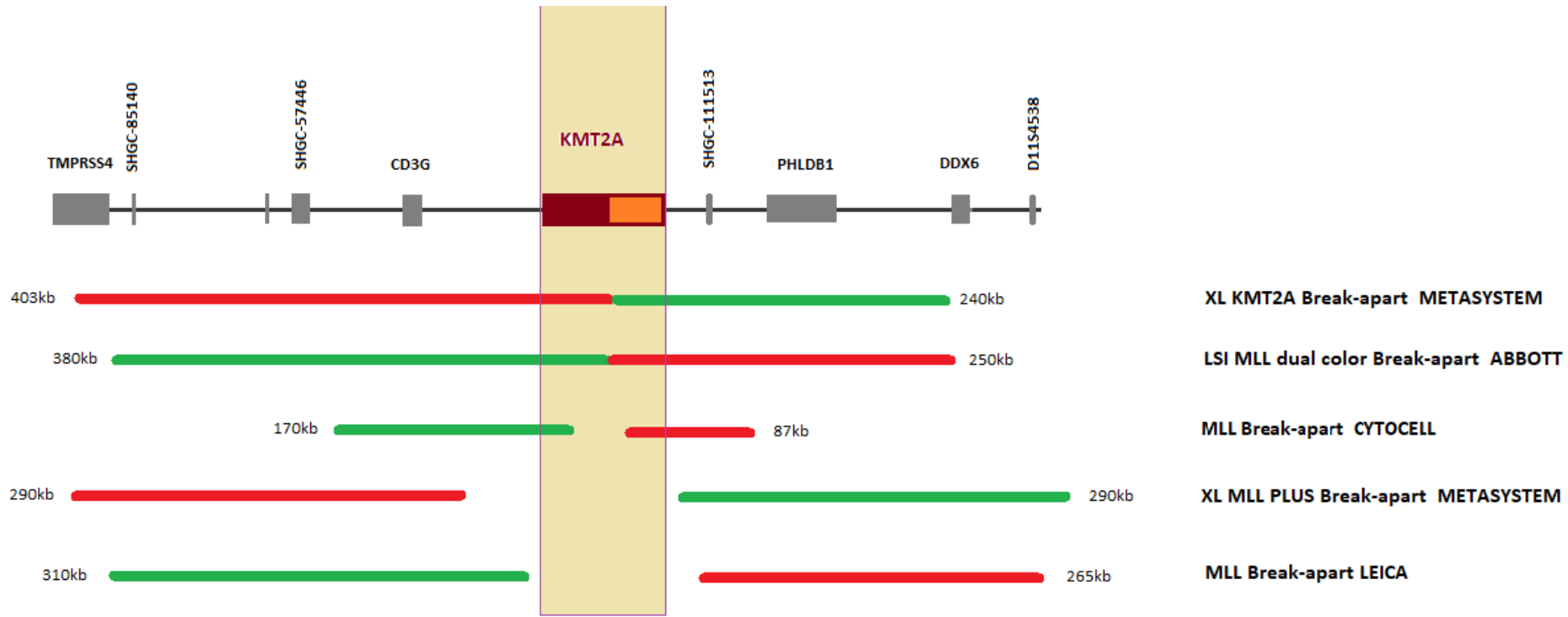
1- inversion



TEL



Design des sondes KMT2A/MLL break-apart



Les deux cas présentés ici sont mis en évidence par FISH en utilisant des design de sondes opposés.

Le choix des sondes n'est donc pas tranché.

- Les deux cas présentés ici sont mis en évidence par FISH en utilisant des designs de sondes différents.

Le choix des sondes n'est donc pas tranché.

- Dans les deux cas, c'est la RT-MLPA qui a mis en évidence le réarrangement KMT2A-MLLT10.
- Le caryotype peut ou pas orienter

En conclusion :

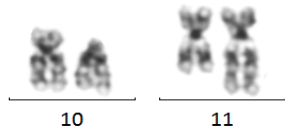
- devant une anomalie chromosomique 10p
- et/ou devant une hybridation de *KMT2A* BA sans split sur un 10p
Chercher un remaniement KMT2A-MLLT10
- avoir en stock les deux types de sondes, couvrantes et non couvrantes.

Demander aux fournisseurs de produire une sonde KMT2A 3 couleurs!?!...

- Autres cas de la littérature....

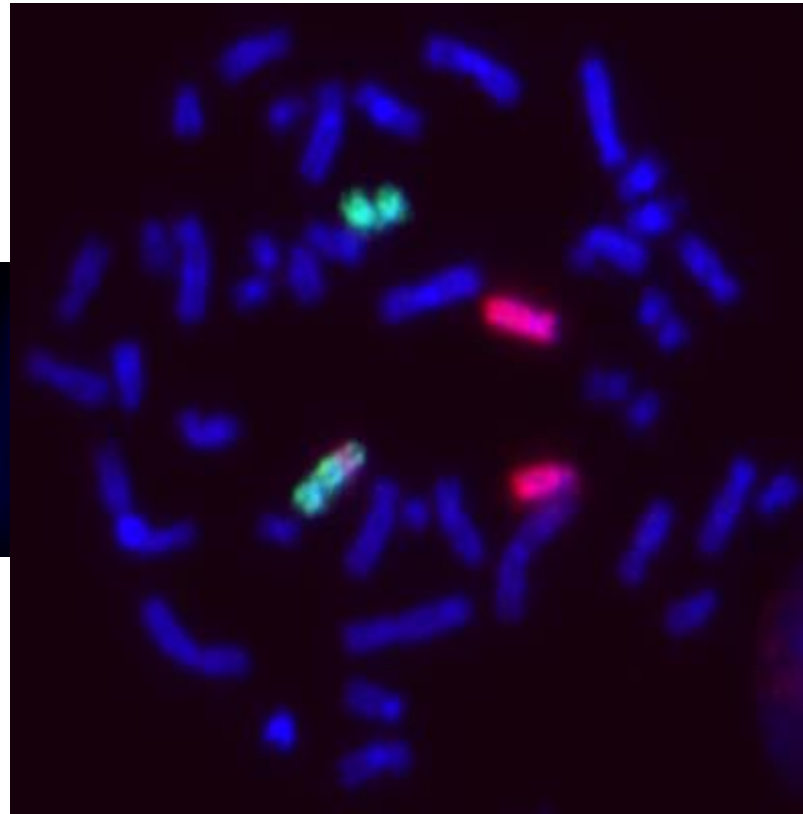
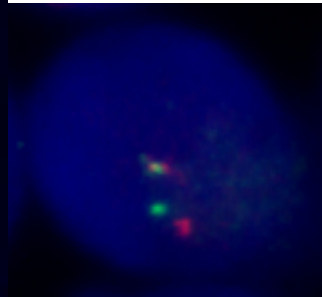
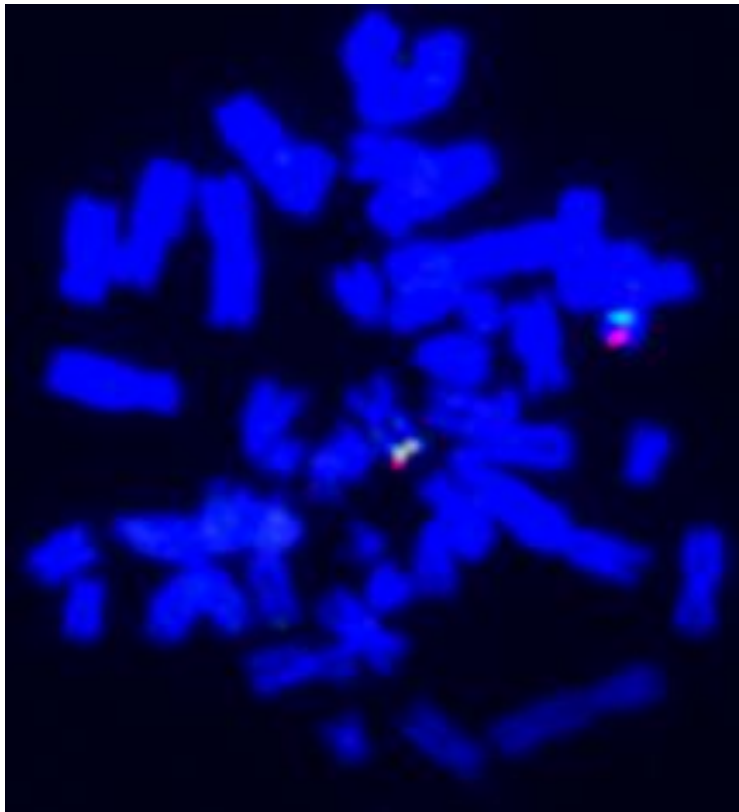
« A new rearrangement giving rise to a very rare *MLL-MLLT10* fusion mRNA in an infant acute myeloid leukemia »
Sergio Burillo et al., *Cancer Genetics Volume 208, Issue 3, March 2015, Pages 101-102*

- Béb  de 5 mois
- Moelle : 78.1% de blastes,
- immunophenotype: CD13-/+ CD64++CD117 + HLADR+/-MPO+/-CD34-CD15 + NG2+
- LAM5



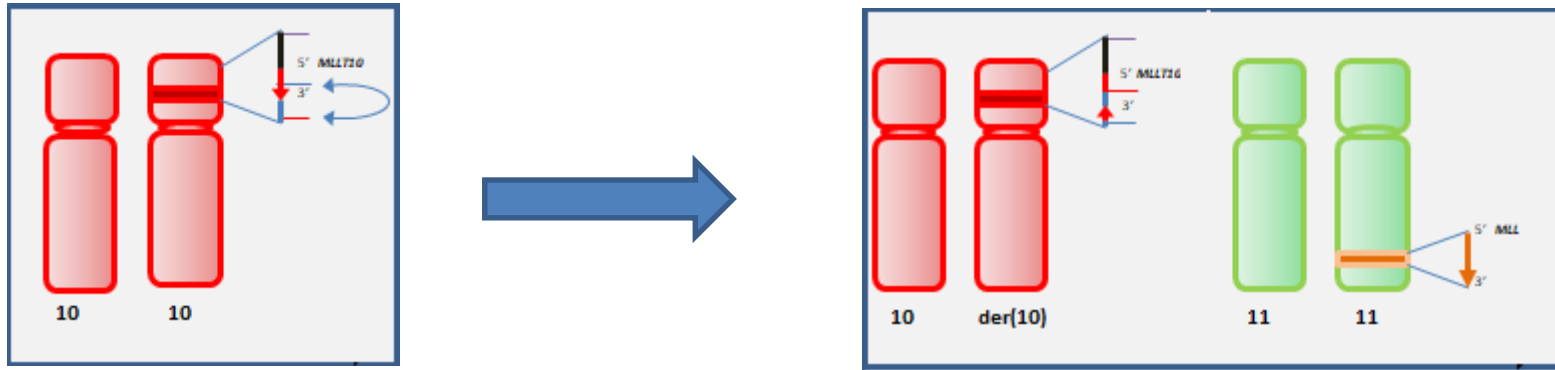
46,XY,del(10)(p12),add(11)(q23)

WCP 10 Rouge / WCP 11 Vert

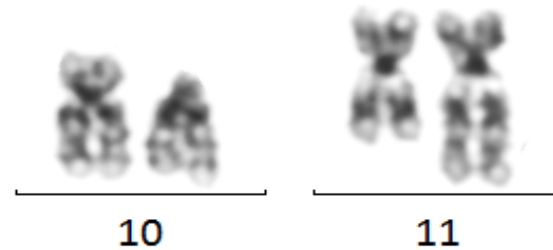
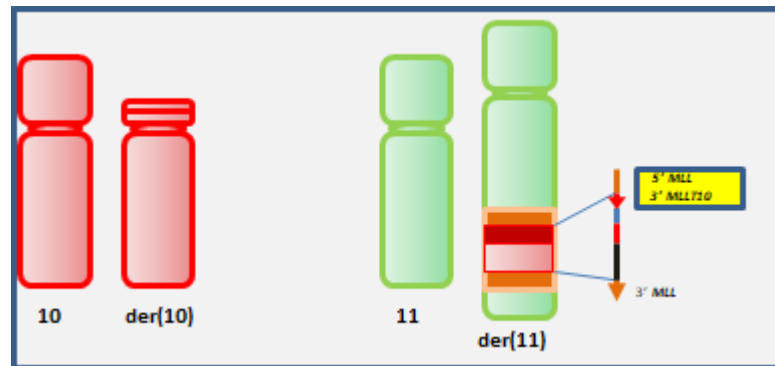


Mécanisme proposé :

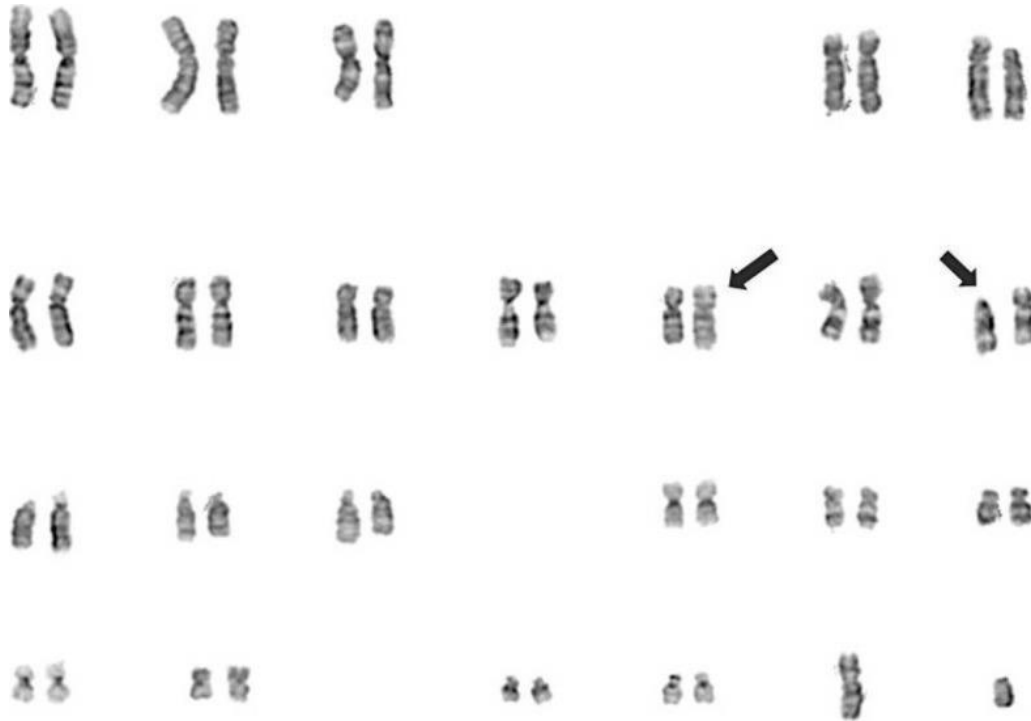
1- inversion de *MLLT10*



2- insertion de *MLLT10* dans *KMT2A*



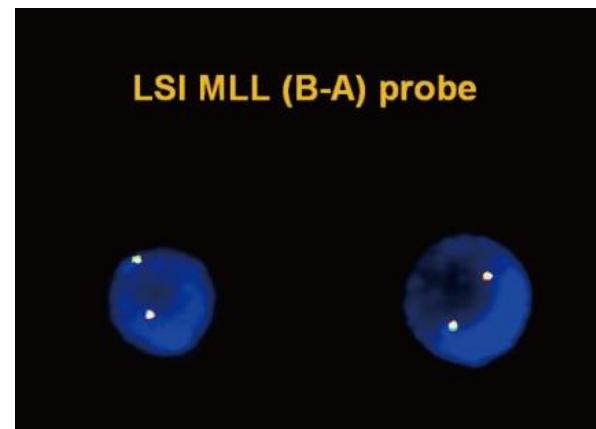
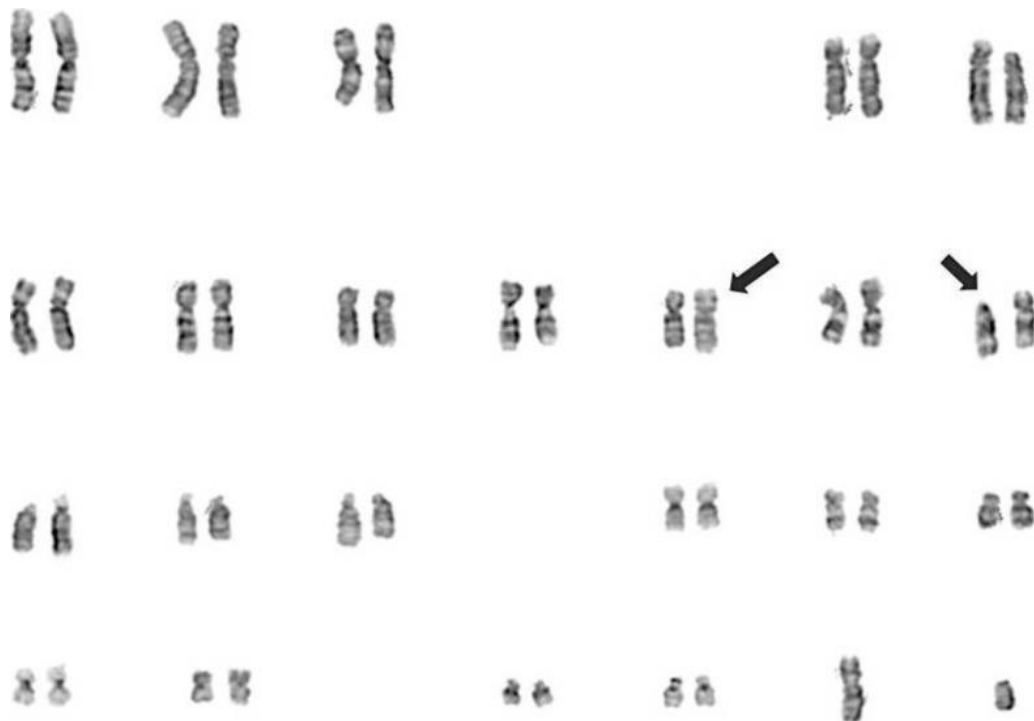
Identification of Mixed Lineage Leukemia Gene (MLL)/MLLT10 Fusion Transcripts by Reverse Transcription-PCR and Sequencing in a Case of AML With a FISH-Negative Cryptic MLL Rearrangement
Kiwoong Ko, Ann Lab Med. 2015 Jul; 35(4): 469–471



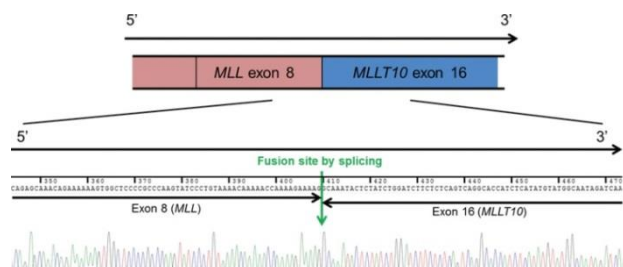
Identification of Mixed Lineage Leukemia Gene (*MLL*)/*MLLT10* Fusion Transcripts by Reverse Transcription-PCR and Sequencing in a Case of AML With a FISH-Negative Cryptic *MLL* Rearrangement

Kiwoong Ko,

Ann Lab Med. 2015 Jul; 35(4): 469–471



46,XY,der(10)t(10;21)(p12;q21),der(12)del(12)(p11.2)add(12)(q24.2)[17]/46,XY[3]



Réarrangement KMT2A-MLLT10 atypique : 3'KMT2A (exon 8 à 16)

Réarrangement rare et inversé retrouvé dans les remaniements complexes