

Point sur la cytogénétique standard et le test de cassures chromosomiques des Aplasies Médullaires (AA)

CUCCUINI Wendy

Laboratoire d'hématologie, Hôpital Saint Louis, Paris

Journée SFH 2020

GFCH 2020 novembre

Cytogénétique standard des Aplasies Médullaires (AA)

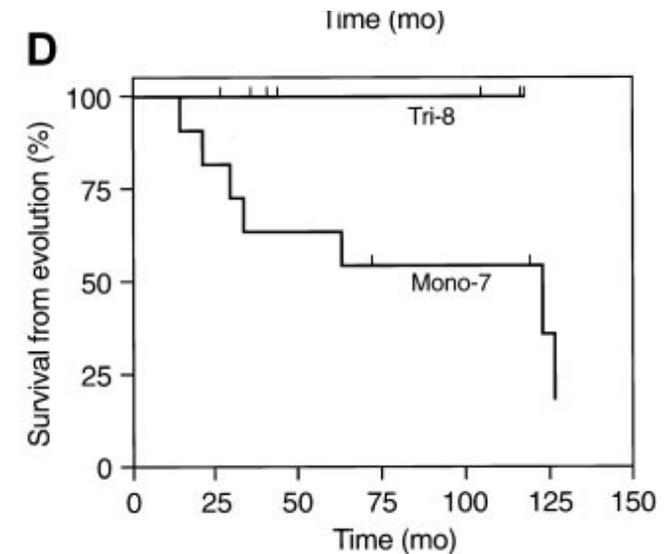
Littérature : 10 à 15 % des patients AA présentent des anomalies cytogénétiques au diagnostic
(Maciejewski JP et al. *Leuk Lymphoma*. 2004/Maciejewski JP, et al. *Blood*. 2002)

- monosomie 7/del(7)q
- trisomie 8
- délétion du bras long du chromosome 13
- trisomie 6,15...
- Perte du chromosome Y, del(20q),etc...

-> identification de la **monosomie 7** chez les patients AA est associée avec un **risque accru de progression vers le SMD ou la LAM**

-> **trisomie 8 et del (13q)** associées à une réponse plus **favorable à l'IST** et à l'amélioration des résultats cliniques

(Sloand EM, et al. *Blood*. 2007; Ishiyama K et al *Br J Haematol*; Maciejewski JP et al. *Blood*. 2002)



Differential prognosis in AA patients with cytogenetic abnormalities.

(D) Survival of patients with trisomy 8 (Tri-8; n 7) and abnormalities of chromosome 7 (Mono-7; n 11)
Maciejewski JP, Risitano A, et al. *Blood*. 2002

Cytogénétique standard des Aplasies Médullaires (AA)

2015 à 2019		
caryotypes pour AA diagnostic	370	
échec moelle pauvre	74	20%
caryo normaux	168	58%
anomalies acquises	46	14%
trisomie 8	7	2,40%
trisomie 6	1	
trisomie X	2	
trisomie 9	1	
trisomie 1q partielle der(14)t(1;14)(q11;q11)	1	
del(13)(q13q22)	7	2,40%
del(20)(q11)	4	
del(7)(q?)	2	
del(6)(q16q24)	1	
monosomie 7	6	2,2%
perte Y (>60ans)	4	
add(7)(p22)	1	
t(5;11)(q35;q12)	1	
anomalies consitutionnelles	4	1,30%
inv(9)(p11q23)c	2	
inv(10)(p11q22)c	1	
t(17;20)(p13;p11)	1	

TABLE 1 Recurring cytogenetic abnormalities in acquired aplastic anemia

Shallis RM, Ahmad R, et al. Eur J Haematol. 2018

Abnormality	Incidence*, %	Prognostic impact	Reference(s)
Monosomy 7/del(7q)	2.0-13.3	Higher risk of progression to MDS or AML	68,72,92
Trisomy 8	1.3-6.7	Favorable response to IST, lower risk of progression to MDS or AML	68,72,92,96
Del(13q)	0.4-1.8	Favorable response to IST, possibly better survival	75,85
Trisomy 6	2.4	Unknown	71
Trisomy 15	2.4	Unknown	71

Cytogénétique standard vs moléculaire des Aplasies Médullaires (AA)

Le caryotype moelle des **AA est hypocellulaire** -> sous-estimation des anomalies par échec culture.

1/SNParray a révélé des anomalies en dessous du niveau de détection par caryotype conventionnel : disomie (UPD) en **6p (6pUPD)** dans 13% de AA, qui ont échappées aux caryotypes classiques (*Afable MG 2nd, Wlodarski M et al. Blood.2011*)



Frequency and genomic distribution of lesions detected by SNP-A.
(*Afable MG 2nd, Wlodarski M, et al.2011*)

MC: caryotype standard; **3% échec du caryotype.**/n=93 AA

SNP-A: 3 patients détectés en plus en SNP-A/MC : une monosomie 7 échec; 2 microdélétions (12q21.1 and 6p22.1)

TABLE 1 Recurring cytogenetic abnormalities in acquired aplastic anemia

Abnormality	Incidence*, %	Prognostic impact	Reference(s)
6pUPD	13	Favorable response to IST	75,85
Monosomy 7/del(7q)	2.0-13.3	Higher risk of progression to MDS or AML	68,75,92
Trisomy 8	1.3-6.7	Favorable response to IST, lower risk of progression to MDS or AML	68,71,92,96
Del(13q)	0.4-1.8	Favorable response to IST, possibly better survival	75,85
Trisomy 6	2.4	Unknown	71
Trisomy 15	2.4	Unknown	71

(*Shallis RM, Ahmad R, et al. Eur J Haematol. 2018*)

Cytogénétique standard vs moléculaire des Aplasies Médullaires (AA)

2/FISH :

Peu d'information pour la pratique diagnostic FISH dans les AA :

- **En cas d'échec du caryotype** FISH adaptées aux anomalies connues délectable en FISH dans les AA (+8,-7....)
- difficulté diagnostic AA/h-MDS (syndrome myélodysplasique hypocellulaire) -> **questionnement -7/+8/5q-**

Littérature pauvre :

Application of FISH in primary diagnosis of AA by morphology, Lin X et al, Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi. . 2016 Feb;33(1):5-8.

Mélange SMD/AA...

Hypoplastic Myelodysplastic Syndrome is a Distinctive Clinical Entity With Poorer Prognosis and Frequent Karyotypic and FISH Abnormalities Compared to Aplastic Anemia (AA), Yongil Koh et al, et al, leukresh 2010

Plus d'anomalies caryotype et FISH chez patient h-MDS que AA...

Williams DA et al, 2014 Pediatric Aplastic Anemia Consortium (NAPAAC) :

18 établissements étudiés dont 61% font **FISH systématique : 7,8,5q-**

MAIS hétérogénéité du diagnostic et des soins parmi les centres qui souligne la nécessité de développer des approches de diagnostic et de traitement fondées sur des preuves dans cette maladie rare....

Cytogénétique standard et moléculaire Aplasie Médullaire (AA)

CAT FISH AA/BFM SLS			
	cytologie	caryotype	FISH
aplasie médullaire idiopathique			
diagnostic	Diluée/pauvre	échec ou peu de mitoses analysables	7q22/7q31* /EGR1 /centromère 8 (si trop peu matériel centromère 7 seul minimum)
	Aplasia(AM)		
	hypoplasie(HM)		
	normale	Normal	7q22/7q31* /EGR1 /centromère 8
suivi	diluée	echec ou peu de mitoses analysables	7q22/7q31* et centromère 8
	AM persistance cytopénie	Normal	7q22/7q31*et EGR1
	Normale dyserythroïèse	Normal	7q22/7q31*et EGR1
	Normale dysgranulopoïèse	Normal	7q22/7q31*et EGR1
	signe dysmyélopoïèse	Normal	7q22/7q31*et EGR1
	Sans evolution >2 ans	Normal	7q22/7q31*et EGR1 (en fonction cytologie) sinon RAS
	AM/HM (GATA2; téloméropathie; SAMD9,etc...)	Normal	7q22/7q31* et/ou centromère 7
FANCONI			
diagnostic et suivi	dysmyélopoïèse ou moelle redevient normale	Normal	MECOM/7q22-7q31/AML1(RUN X-1)
			*7q22/7q31 (7q22.3 KMT2E ou 7q22.1 RELN ou 7q22.1 CUX-1)
			point appel CUX-1 au caryotype ou en systématique lors de suivi normaux

Analyse de différentes sondes 7q22 en FISH

Différentes sondes commerciales ciblent les délétions 7q22 disponibles (couplée à 7q31(MET) ou non):

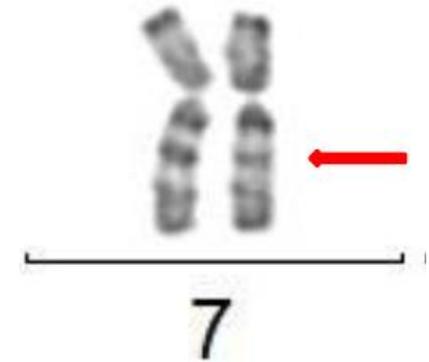
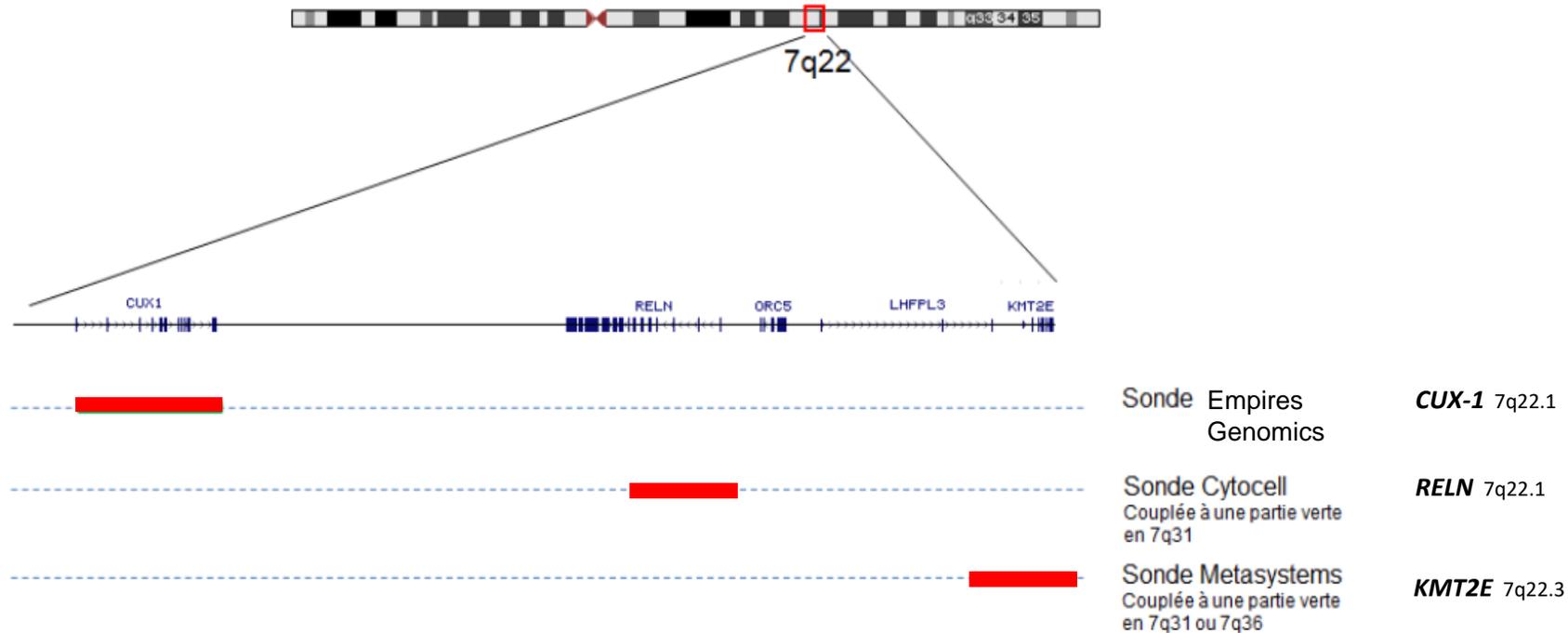


Image Présentation GFCH 2017, Dr.I.LUQUET

La taille des délétions variable et certaines peuvent être **difficiles à identifier sur le caryotype** car très fine, notamment dans la régions 7q22.

Travail de Toulouse Dr I.LUQUET et Dr S.STRUSKI sur 17 LAM/SMD montrait que CUX -1 préférentiellement délété par rapport à RELN .

CUX1 is a haploinsufficient tumor suppressor gene on chromosome 7 frequently inactivated in acute myeloid leukemia. McNerney ME et al. Blood. 2013 Feb 7;121(6):975-83.

The Molecular Pathogenesis of the Myelodysplastic Syndromes Pellagatti A, Boulwood J.Euro J Hematol. 2015 Jul;95(1):3-15

Importance de faire **CUX-1(7q22.1)** et **KMTE2 (7q22.3)** dans le diagnostic/suivi?

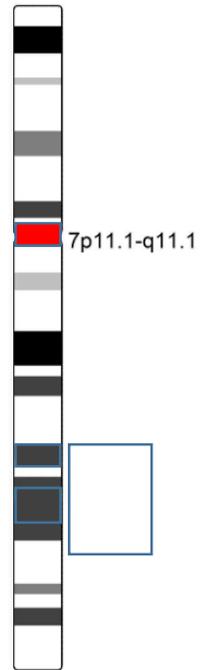
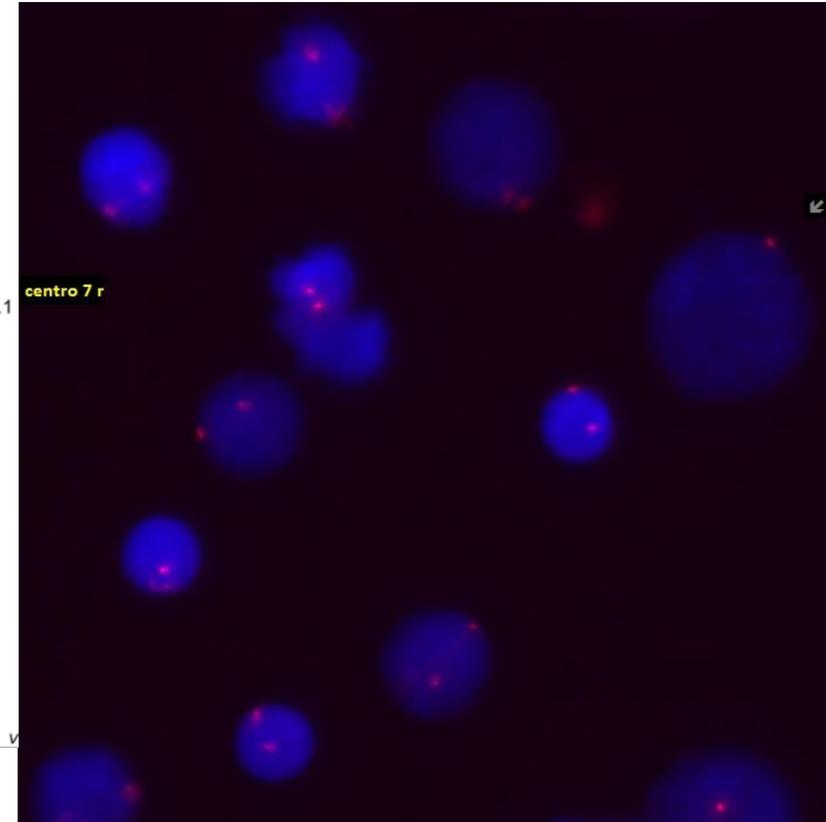
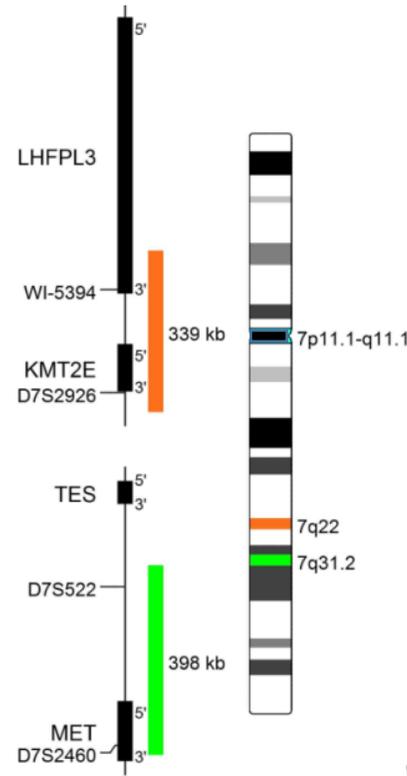
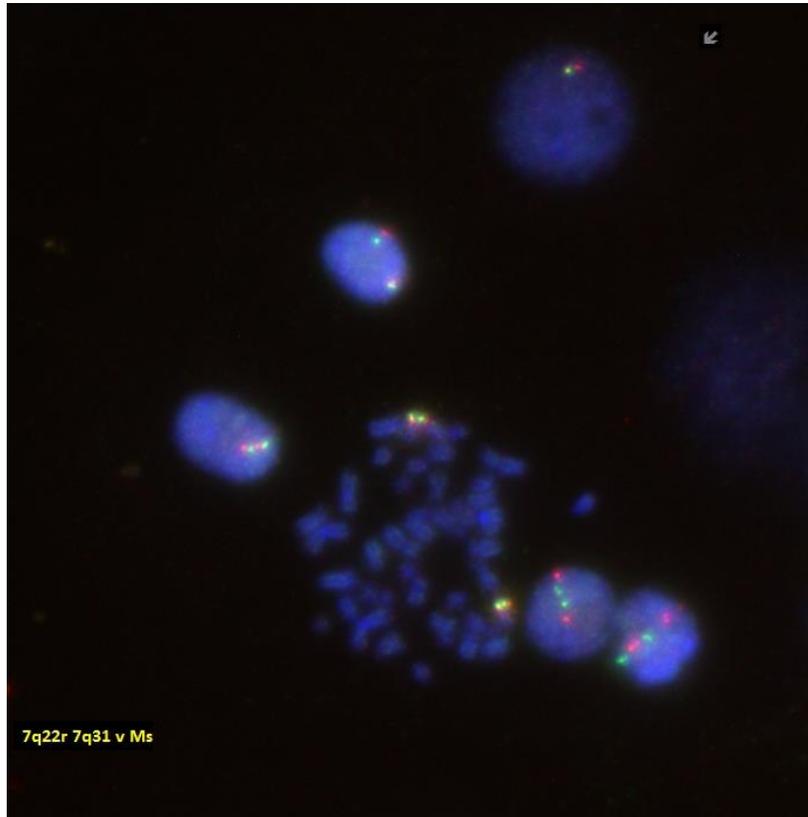
Cytogénétique moléculaire des Aplasies Médullaires (AA)

Seuil de détection laboratoire dépendant : général en moyenne 5%

Exemple : Moelle pauvre en cytologie

caryotype médullaire : 45,XX,-7[2]/46,XX[48] dans 2 moelle de suite < définition monosomie selon définition cytogénétique (3 pertes = perte clonale)

FISH 7q22-7q31 et centromérique 7: 3%



Cytogénétique standard et moléculaire des Aplasies Médullaires (AA) : CONCLUSION

Caryotype bon outil pour évaluation des anomalies cytogénétiques des AA

Echec caryotype : FISH systématique

Place de la FISH en cas de caryotype sans anomalie détectable /morphologie sans dysplasie au diagnostic et en suivi?

Suivi FISH à adapter en fonction des « nouvelles » anomalies moléculaires (GATA2; Téloméropathie,SAMD9L,DDX4, EVT6,RUNX-1etc...)?

SNP-A pour détection 6pUDP non détecté en caryotype

Analyse génétique des « maladies cassantes » : Test de cassures chromosomiques « fonctionnel »

Variété de la symptomatologie de ces pathologies :

- demandes sur la base de signes évoquant une maladie cassante de l'ADN (*en particulier, hypotrophie, microcéphalie, déficit immunitaire, taches cutanées, consanguinité, prédisposition à des tumeurs, réactions anormales à la chimio- ou radiothérapie...*) - **Recrutement constitutionnel**
- Aplasie/hypoplasie médullaire - **Recrutement hématologique**

Le diagnostic cytogénétique « cassants » intervient en première ligne pour l'identification des maladies cassantes de l'ADN

Test de cassures chromosomiques :

Méthode lymphocytes T qu'on active avec d'un mitogène (PHA) afin d'obtenir des métaphases
+ un « agent cassant » **Mitomycine C**

- Temps de culture 72 heures cultures +PHA + **Mitomycine C**
- Temps de culture 72 heures cultures +PHA (TEMOIN Négatif)

Manipulation identique à un caryotype avec coloration et étude des cassure sur métaphases.

Résultat : nombre de cassures par mitoses/nombre totales de mitoses analysées soit un ratio en PHA et un ratio en PHA+MMC.

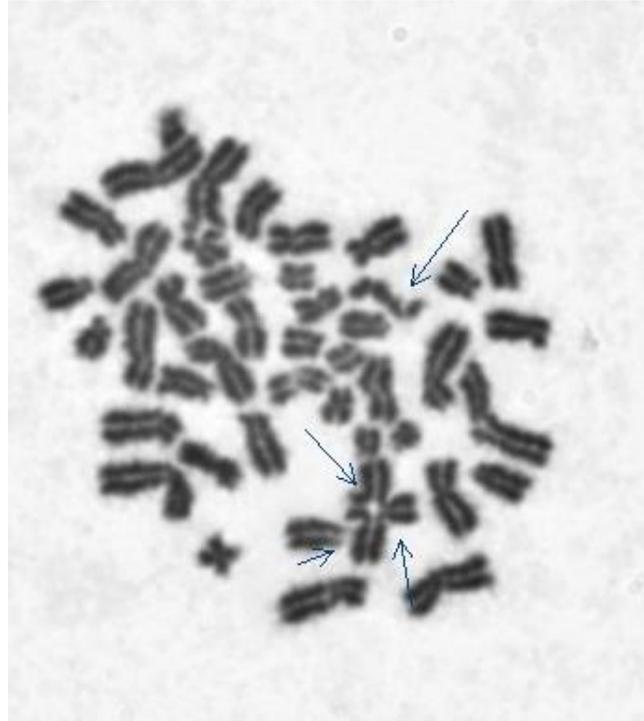
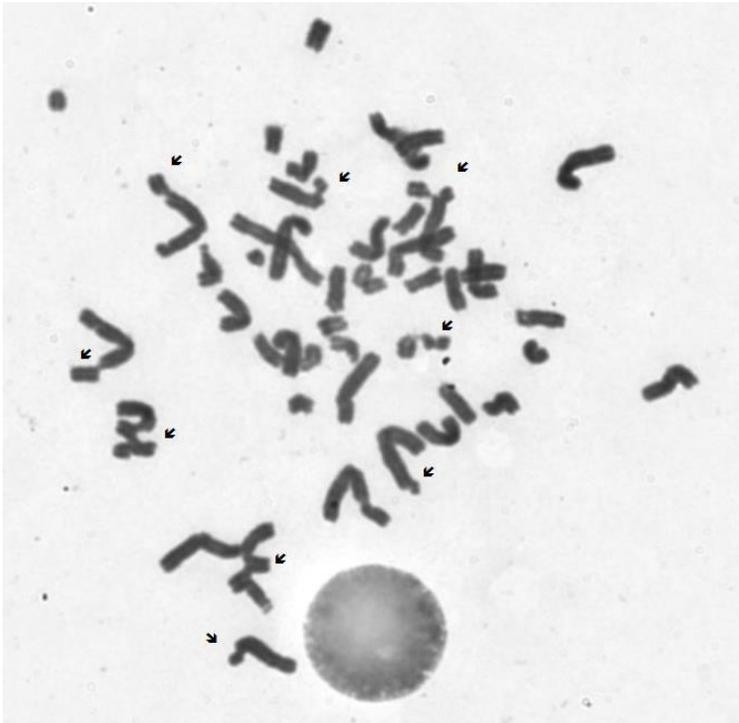
Conclusion : absence ou présence de cassures spontanées (PHA seule) et après exposition à la MMC(PHA+MMC).

Analyse génétique des « maladies cassantes » : Test de cassures chromosomiques

Cassures chromosomiques 72 heures cultures+ PHA +IL2 + Mitomycine C



Analyse génétique des « maladies cassantes » : Test de cassures chromosomiques



Cassures
chromosomiques 72
heures cultures +PHA +
Mitomycine C

cassures/cellules ~4

Recherche de cassures en PHA - ratio 0.203 [sur 113 métaphases en PHA]

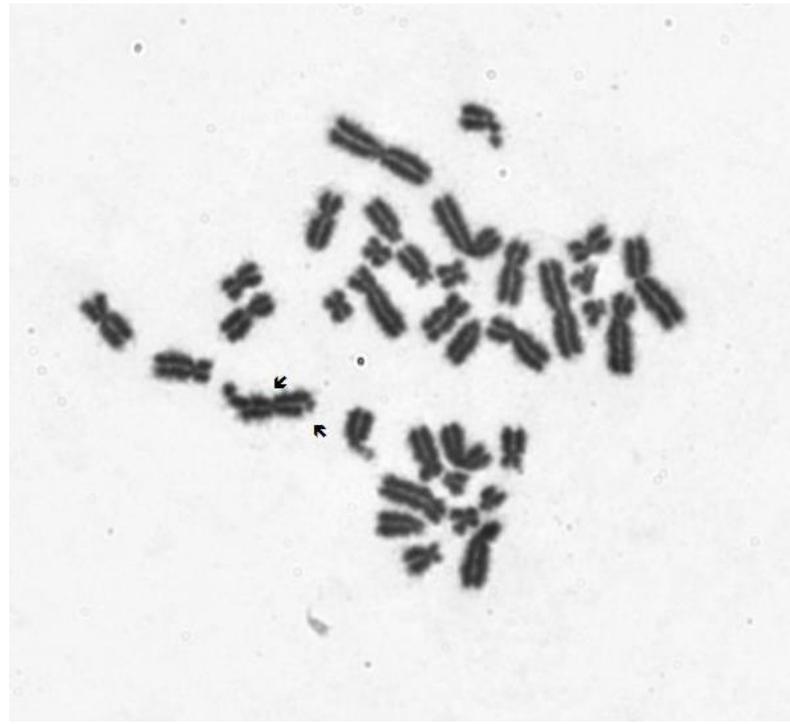
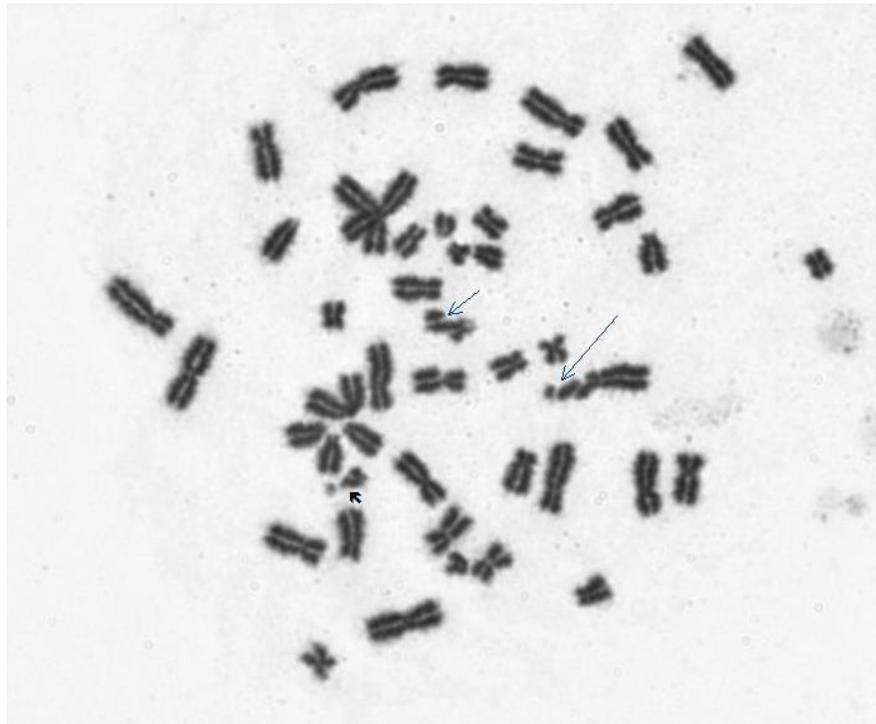
Recherche de cassures en MMC - ratio **3.4** [sur 87 mitose en métaphases]

Présence de cassures chromosomiques spontanées et de **très nombreuses cassures chromosomiques,**
et **nombreuses images radiales après exposition à la Mitomycine C.**

Aspect compatible avec une **maladie de FANCONI.**

Profil FACore lymphocytes et fibroblastes : **Profil de type FA Core.Maladie de Fanconi**

Analyse génétique des « maladies cassantes » : Test de cassures chromosomiques



**Cassures
chromosomiques**
72 heures cultures+
PHA +IL2 +
Mitomycine C

cassures/cellules 1~3

Recherche de cassures PHA témoin - ratio 0.07 [sur 100 mitoses en PHA]

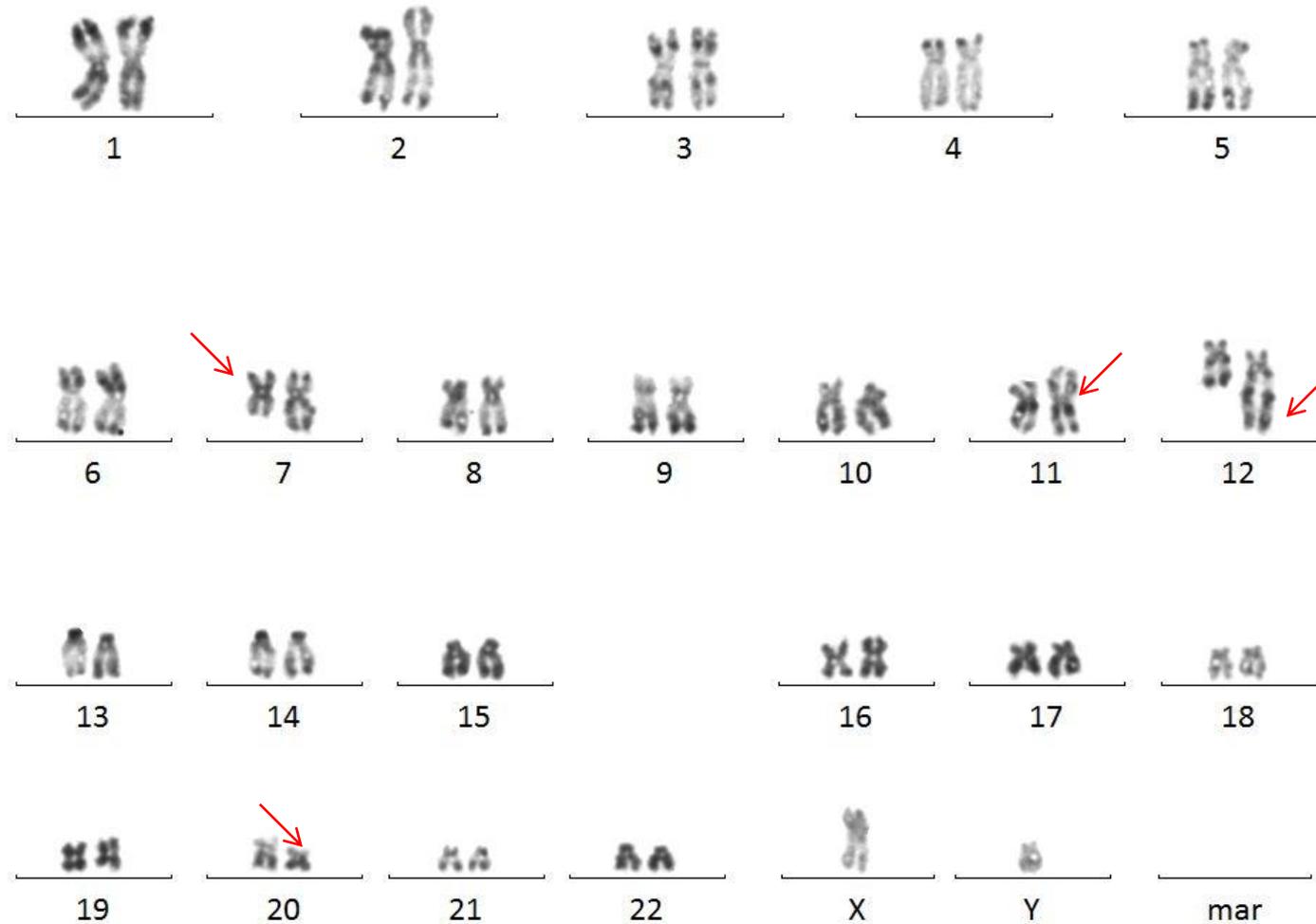
Recherche de cassures MMC - ratio **0.53** [sur 75 mitoses en MMC]

Présence d'un **taux de cassures chromosomiques plus élevé que la normale, notamment après exposition à la Mitomycine, mais en dessous des seuils observés dans une maladie de Fanconi typique.** Absence d'images radiales.

Profil FAcore fibroblastes : Sans particularité. **Pas d'argument pour une maladie de Fanconi.**

NGS: En cours....autre anomalie du système de réparation, autre....

Rappel : anomalie cytogénétique spécifique d'une maladie de FANCONI en MDS/LAM:
caryotype médullaire somatique



caryotype complexe

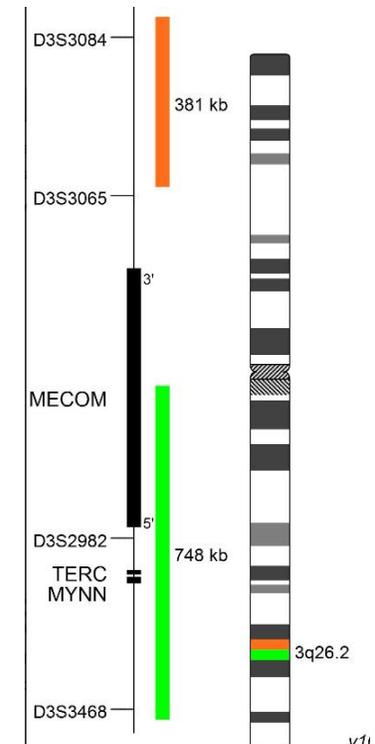
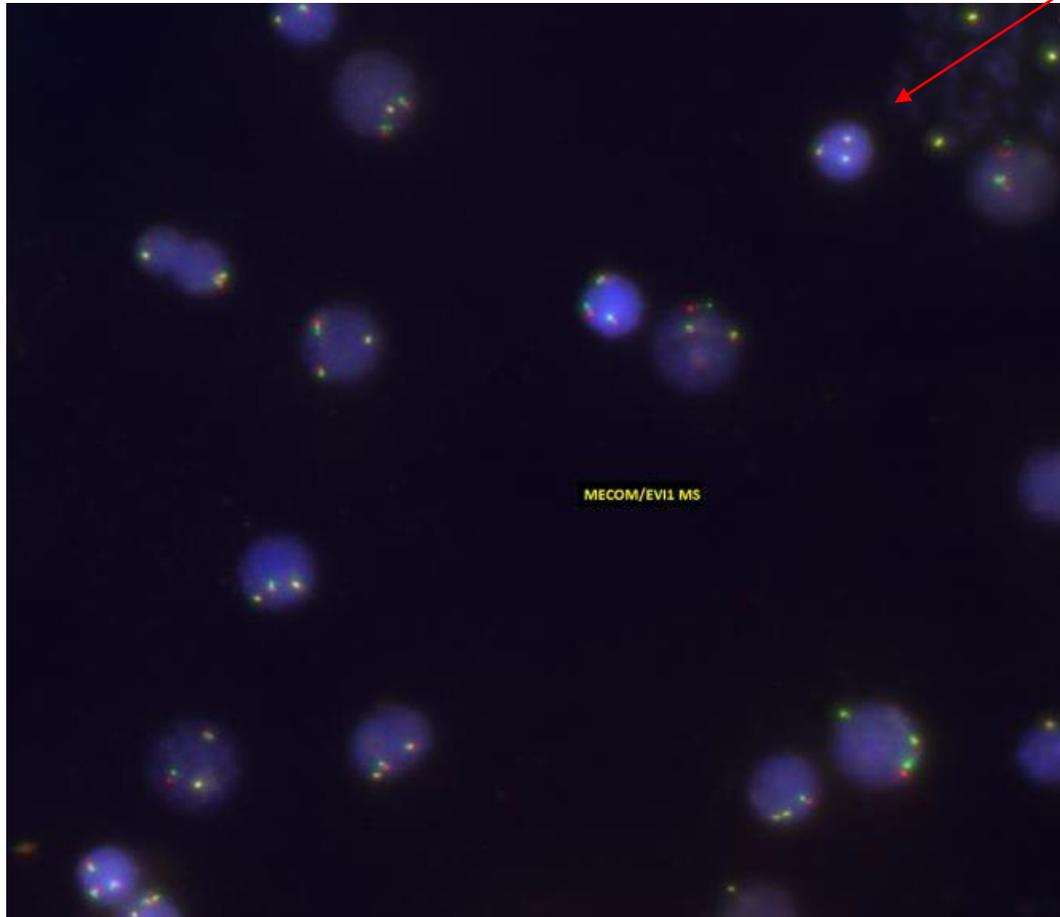
46,XY,add(6)(p2?3),del(7)(q2?2),der(11)t(3;11)(q?21;p1?5),der(12)t(1;12)(q?21;q2?2),del(20)(q1?2)[15]/46,XY[5].

Anomalie cytogénétique spécifique d'une maladie de FANCONI : FISH

3 signaux = **trisomie 3q partielle**

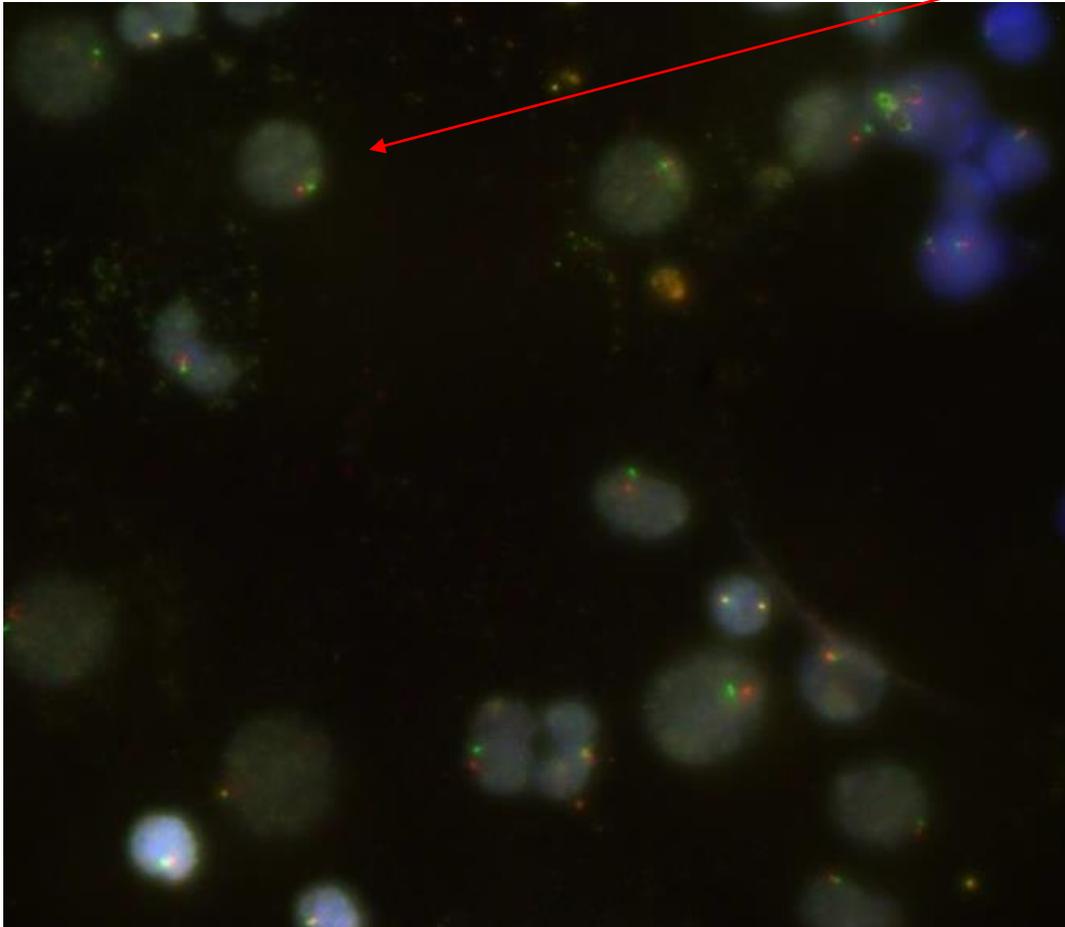
(add11p vu au caryotype)

FISH sonde MECOM break apart

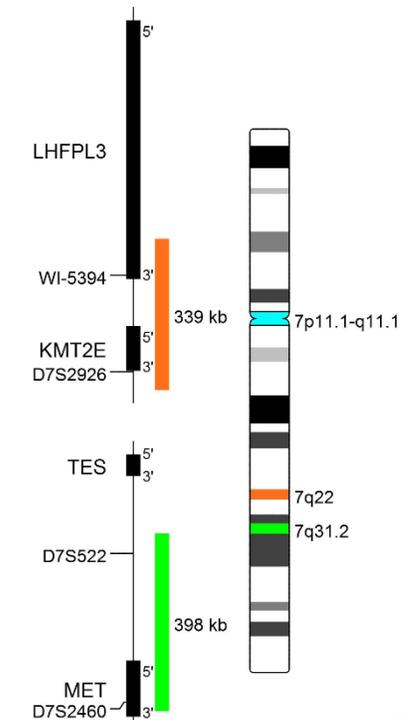


Anomalie cytogénétique spécifique d'une maladie de FANCONI : FISH

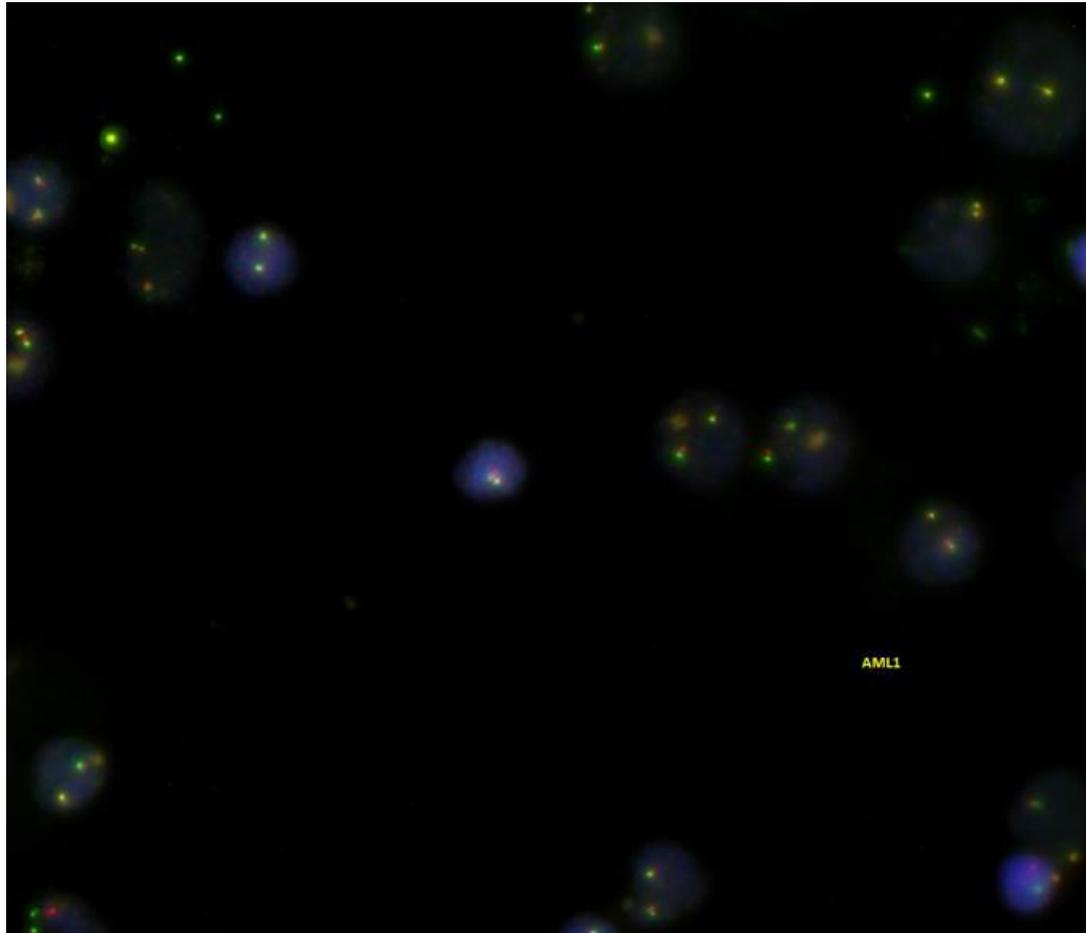
Perte des 2 signaux 7q22 et 7q31 =
délétion 7q vu au caryotype



FISH sondes 7q22 (rouge) et 7q31 (vert)

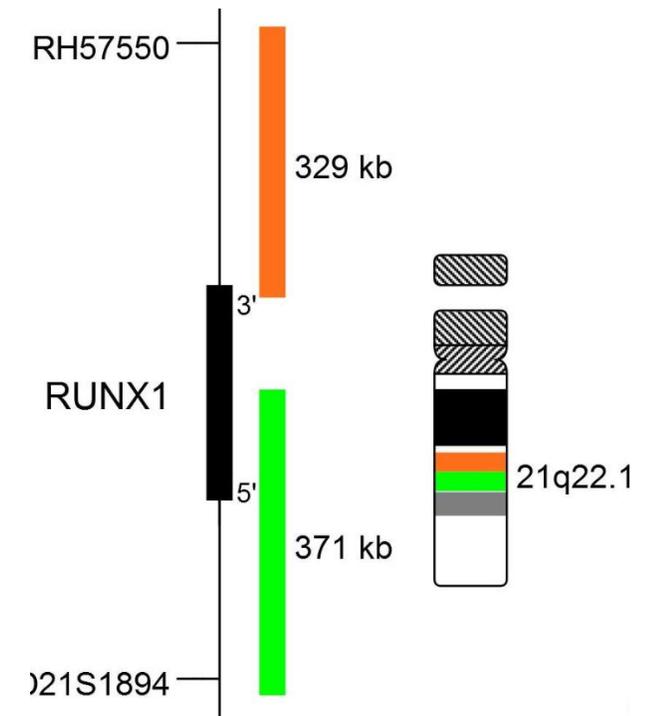


Anomalie cytogénétique spécifique d'une maladie de FANCONI : FISH

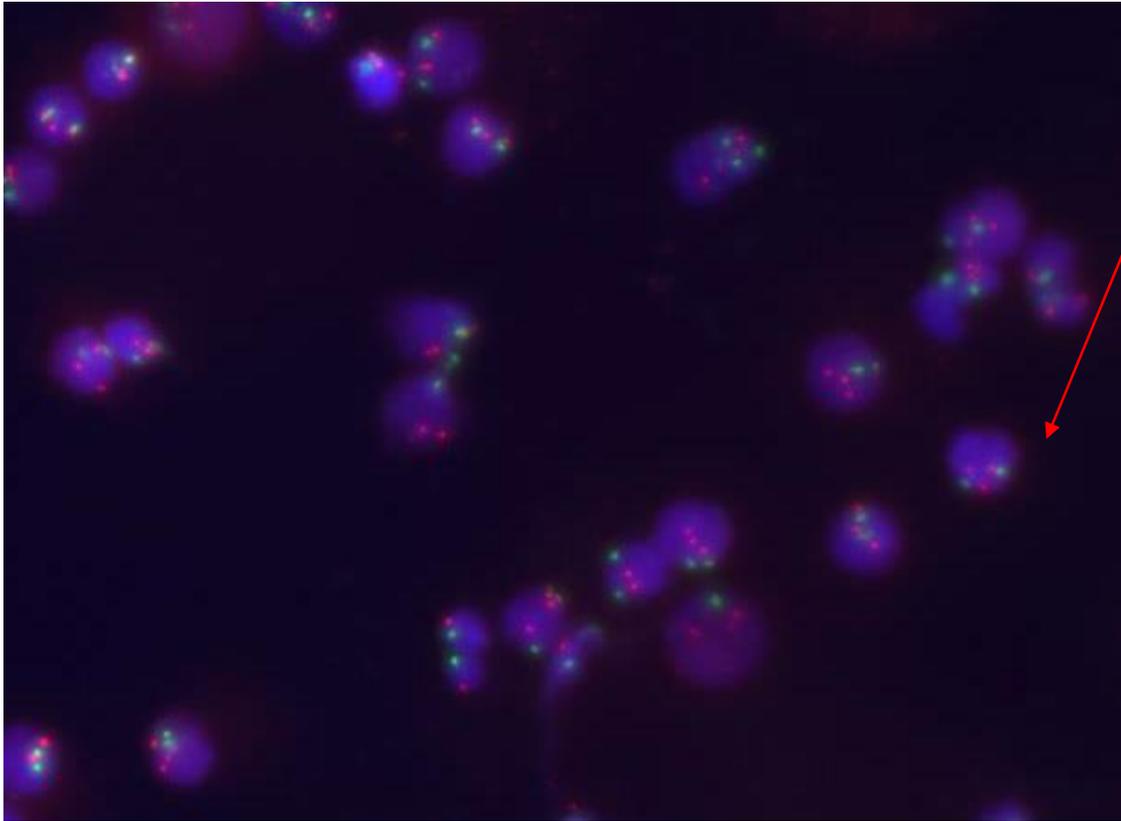


FISH sondes RUNX1(AML1)

normal



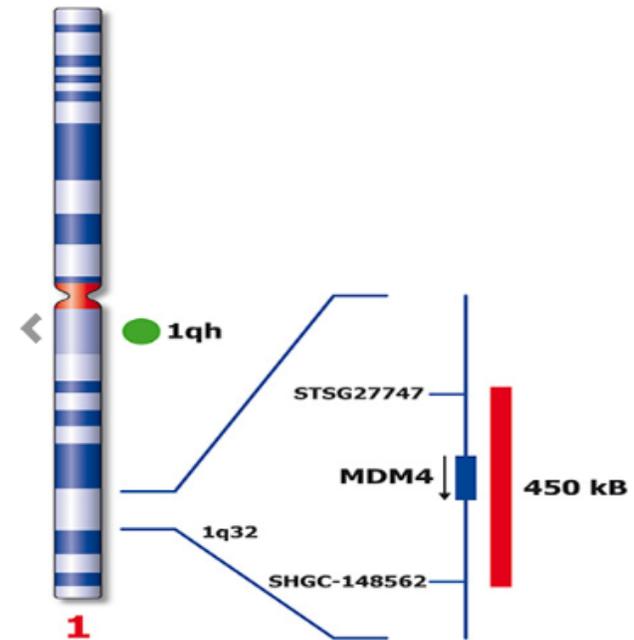
Anomalie cytogénétique spécifique d'une maladie de FANCONI : FISH



3 signaux MDM4 rouge = **trisomie 1q partielle**

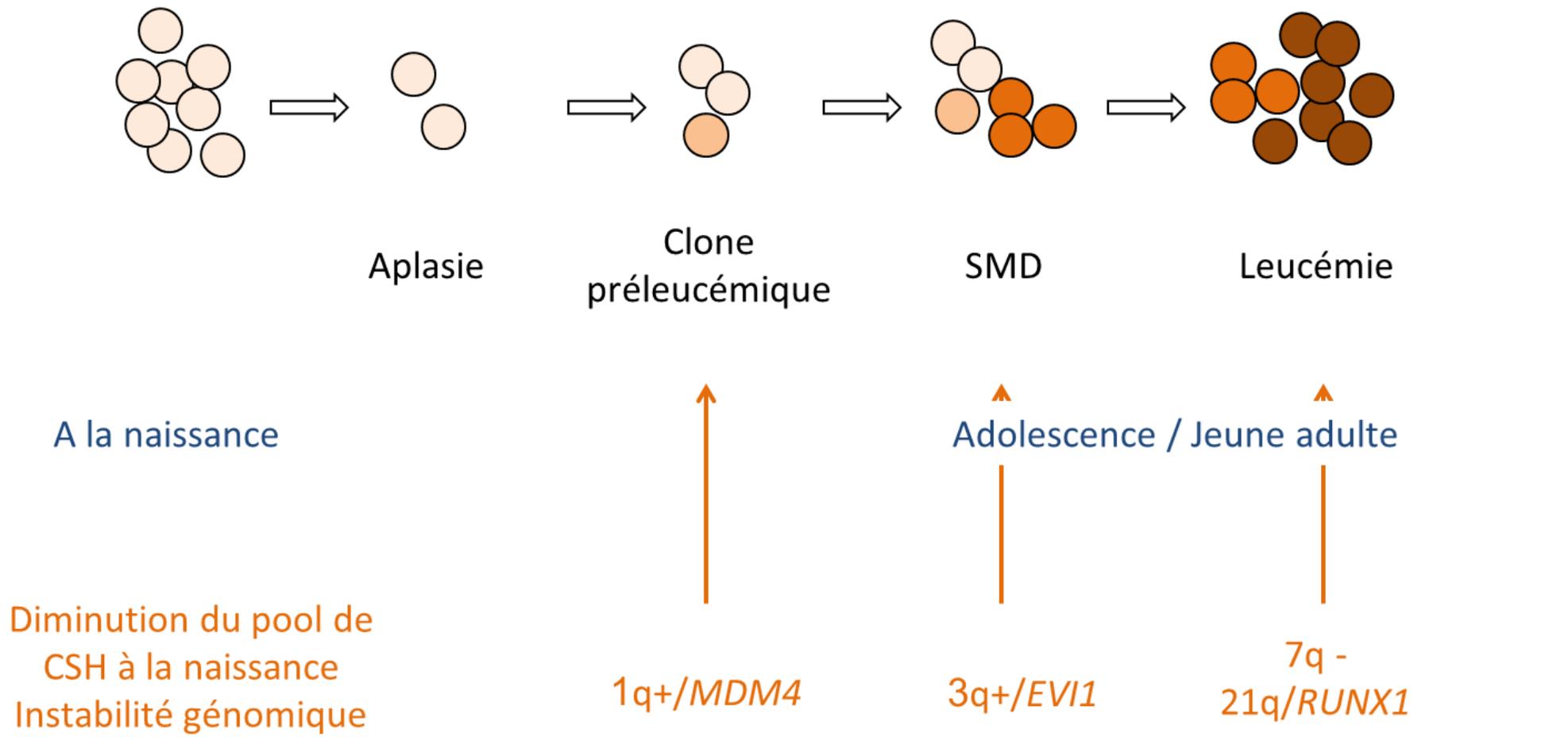
(add12q vu au caryotype)

FISH sonde MDM4 (rouge)/centromère 1(vert)



MDM4 (1q32) / SE 1 probe hybridized to paraffin embedded tissue (2R2G).

Evolution de la maladie de Fanconi



Ceccaldi et al., JCI 2011
Quentin et al., Blood 2011
Ceccaldi et al., Cell Stem Cell 2012
Sebert et al., unpublished

Point sur la cytogénétique standard et le test de cassures chromosomiques des Aplasies Médullaires (AA)

- . **Caryotype médullaire anormal dans 15% des AA** : prédictif pour traitement (ITS) et d'une transformation clonale en MDS hypocellulaire ou LAM. Place de FISH à redéfinir.

- . **Test dépistage de cassures indispensable pré-greffe** : diagnostic de la maladie de FANCONI et de maladies « cassantes » liées à des anomalies réparations car patients sensibles aux agents « cassants » utilisés lors de la greffe.

- . **FANCONI anomalie cytogénétique récurrente médullaire spécifique détectable** en caryotype et FISH:
FISH systématique en suivi pour **7q, 3q26 -MECOM(EVI1) et RUNX1(AML1)**
Détection de sous-clone mineur cryptique précoce notamment pour
le **gain du 3q26(MECOM/EVI1) de pronostic péjoratif** (Tonnes H et al, Blood, 2003), avant passage en MDS ou LAM.



Hôpital Saint-Louis, Paris

Laboratoire d'Hématologie APHP Hôpital Saint-Louis, Paris

Jean Soulier
Odile Mareek
Giulia Tueur
Wendy Cucchini
Anna Raimbault

Département de Greffe de Moelle Hôpital Saint-Louis

Gérard Socié, Regis Peffault de Latour
Flore Sicre de Fontebrune

Service de Pédiatrie, Hôpital St-Louis et R. Debré, Paris

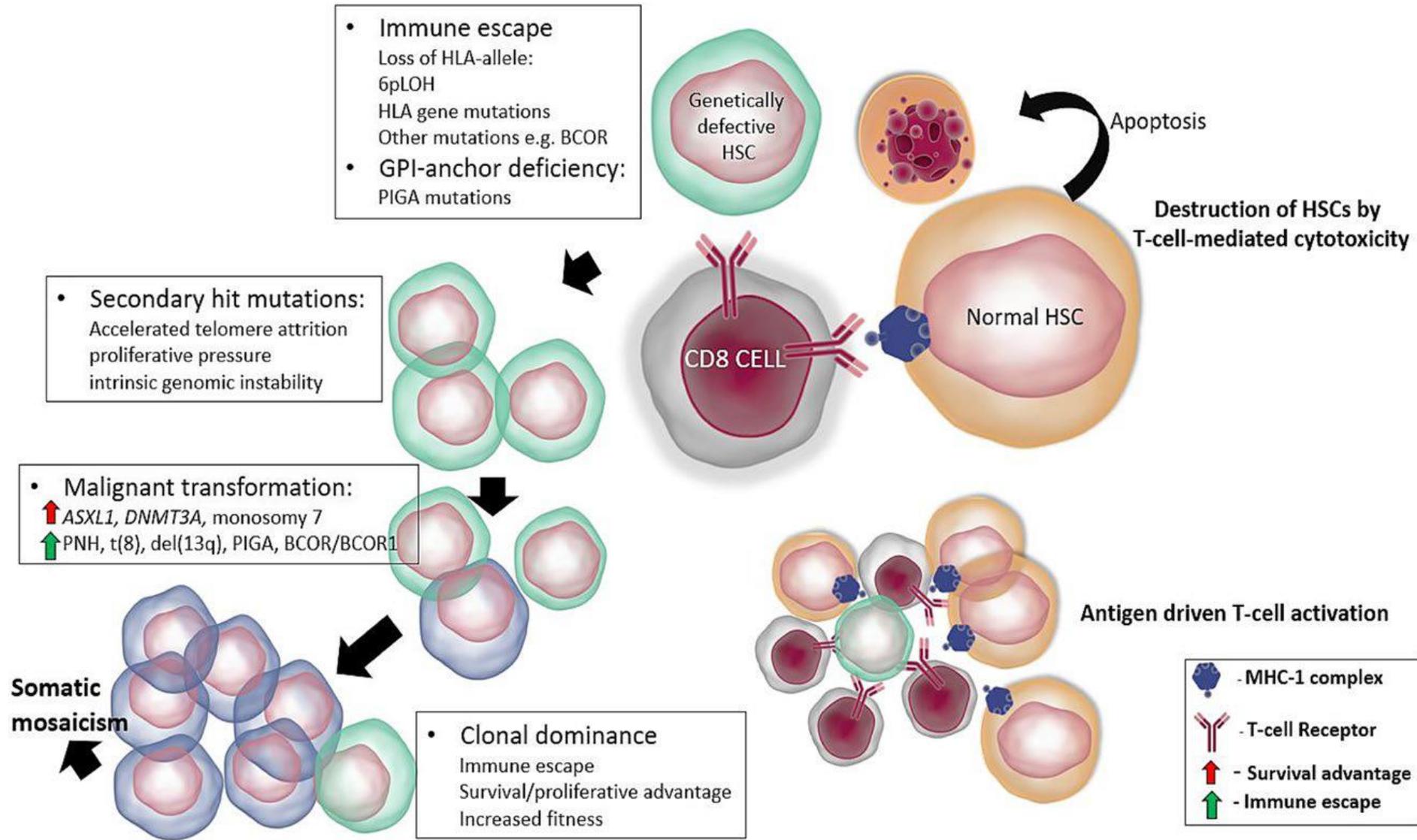
Thierry Leblanc, Benoit Brethon
André Baruchel, Jean-Hugues Dalle

Association française des familles Fanconi AFMF

French National Reference Center " Diagnosis of Bone marrow failure " (G. Socié, St-Louis-R. Debré)

French National network " DNA fragility syndromes and predisposition to cancer " (D. Stoppa-Lyonnet, Curie)

ANR Grant "Fanconi Anemia " (P. Rosselli, IGR-CEA-St Louis)



Immune escape and clonal evolution mechanisms in acquired aplastic anemia (Molecular pathogenesis of acquired aplastic anemia.