Etude de l'expression *MECOM* (*EVI1*) par NGS ciblé dans une cohorte d'hémopathies myéloïdes

Profil cytogénétique et moléculaire associé aux surexpressions

Claire BRACQUEMART

13/10/2022

GFCH

Locus MECOM (3q26.2)

2 gènes

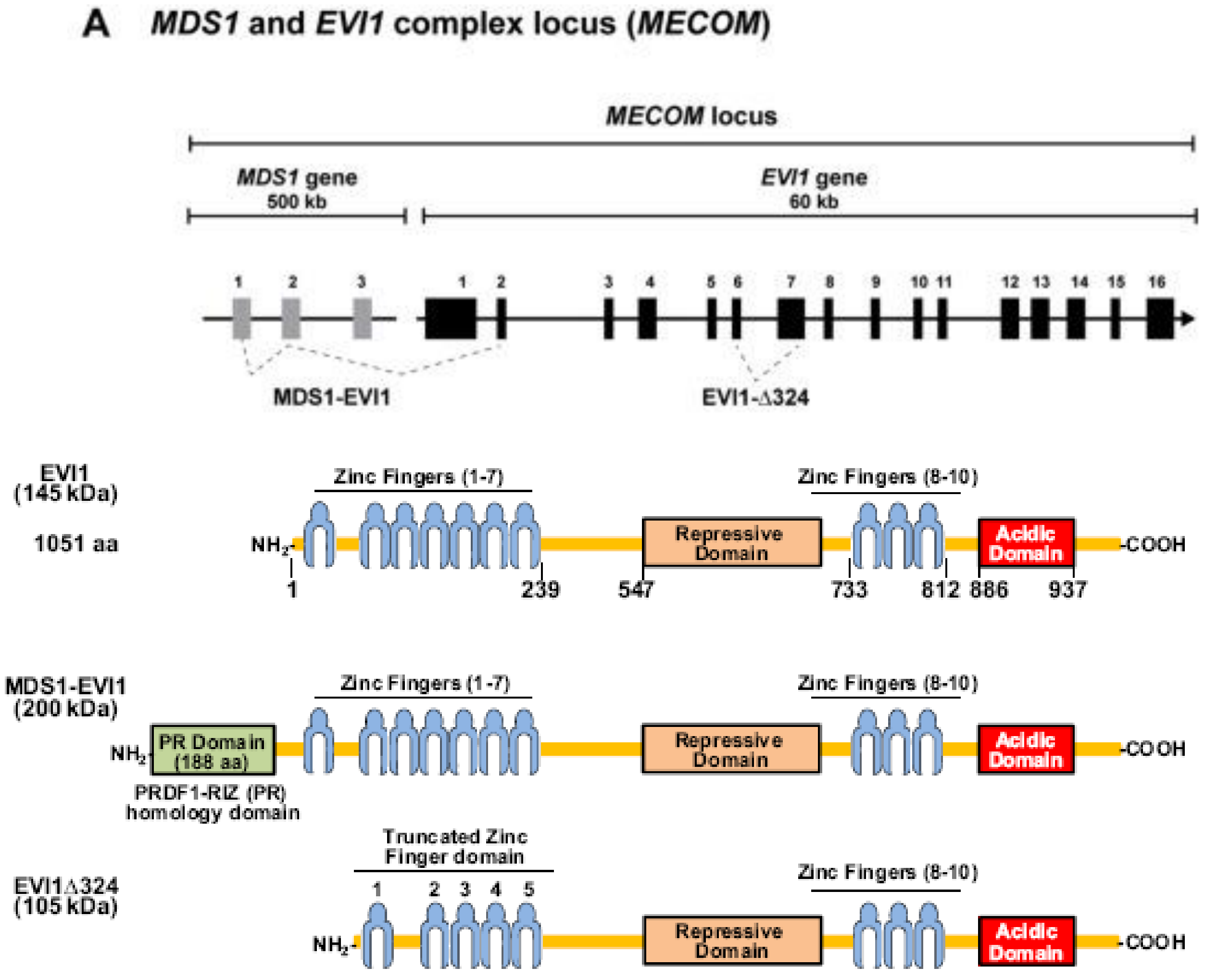
EVI1: *Ectopic viral integration site 1*

MDS1: myelodysplastic syndrome 1

Epissage alternatif du locus

3 isoformes protéiques principales

→ facteurs de transcription, motifs doigts de zinc


A *MDS1* and *EVI1* complex locus (*MECOM*)
MECOM locus
MDS1 gene
500 kb
EVI1 gene
60 kb
1
2
3
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
MDS1-EVI1
EVI1-Δ324
EVI1
(145 kDa)
1051 aa
Zinc Fingers (1-7)
Zinc Fingers (8-10)
NH2-
Repressive Domain
Acidic Domain
-COOH
1
239
547
733
812
886
937
MDS1-EVI1
(200 kDa)
NH2-
PR Domain
(188 aa)
PRDF1-RIZ (PR) homology domain
Zinc Fingers (1-7)
Zinc Fingers (8-10)
Repressive Domain
Acidic Domain
-COOH
EVI1Δ324
(105 kDa)
Truncated Zinc Finger domain
1
2
3
4
5
Zinc Fingers (8-10)
NH2-
Repressive Domain
Acidic Domain
-COOH

Maicas et al. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech 2017; Birdwell, C. *et al Blood Cancer J.* 2021

Rôles

EVI1

- **Hématopoïèse**
- Prolifération
- Différenciation cellulaire
- Apoptose
- Développement

- Expression ++ HSC
- Prolifération et différenciation
- ↘ Expression (*EVI1* et *MDS1/EVI1*) lors de la différenciation cellulaire

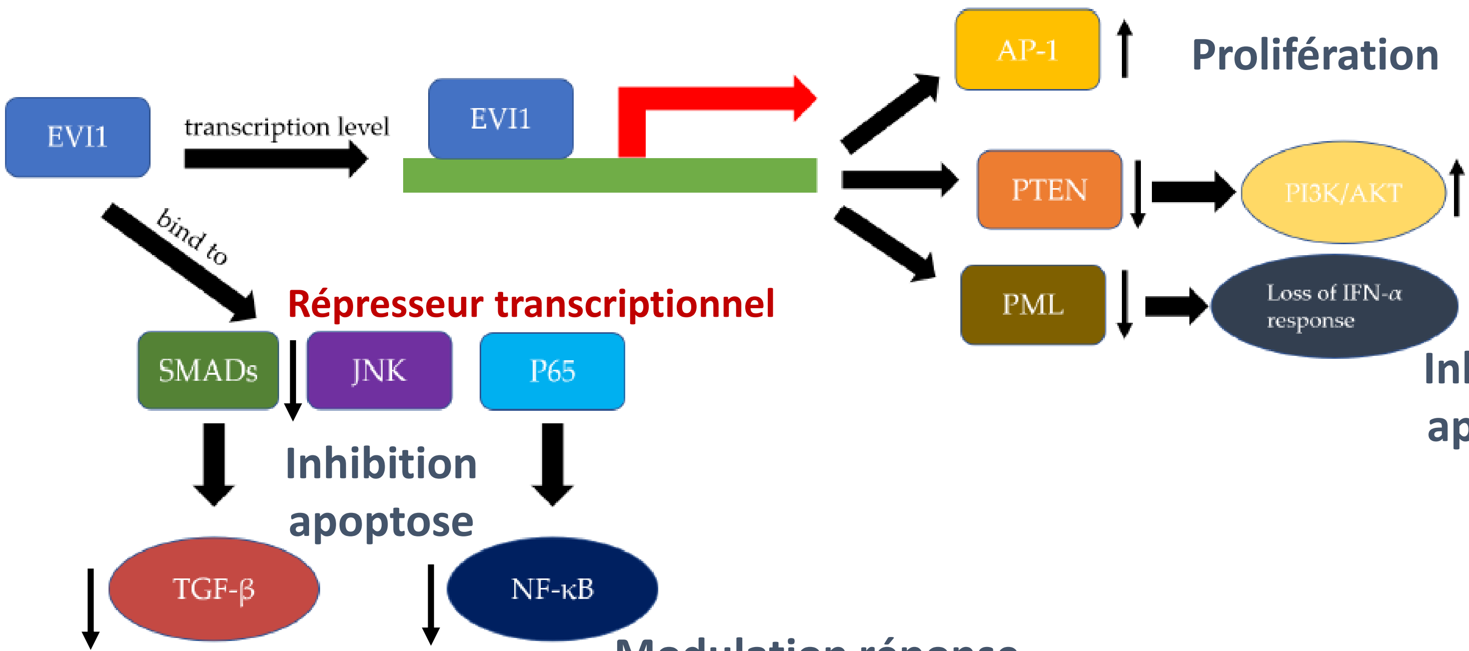
Yuan, Wang, Bi and Jiang. Int J Oncol. 2015; Bindels et al. Blood 2012; Steinleitner et al. Anticancer Res. 2012

Rôles

EVI1 → **Hématopoïèse**

- Expression ++ HSC
- Prolifération et différenciation
- ↘ Expression (*EVI1* et *MDS1/EVI1*) lors de la différenciation cellulaire

Dérégulation


EVI1
transcription level
EVI1
bind to
AP-1
PTEN
PI3K/AKT
PML
Loss of IFN-α response
SMADs
JNK
P65
TGF-β
NF-κB

Répresseur transcriptionnel

Prolifération

Prolifération
Survie Cellulaire

Inhibition apoptose

Inhibition apoptose

Perturbe l'inhibition de croissance liée à TGF-β1

Modulation réponse immunitaire/ inflammation

Liang et Wang. Cancers. 2020; Lugthart et al. Blood 2011

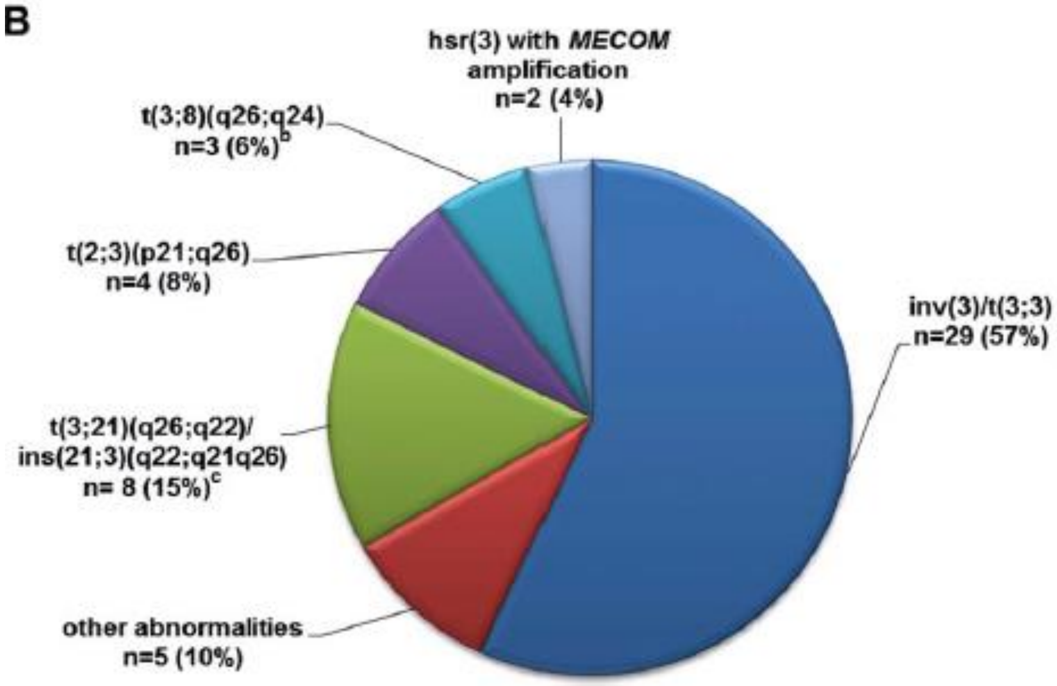
Dérégulation du locus

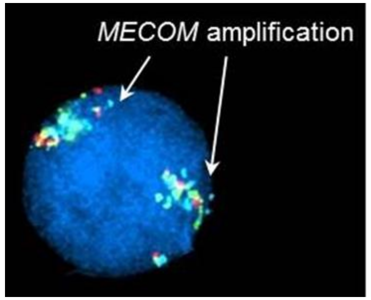
Surexpression transcrit *EVI1*

Transcrit de fusion constitutivement actif

- **Mécanismes chromosomiques** +++ amplification/translocation

  Locus multipartenaire: > 20 partenaires décrits





Baldazzi et al. Genes, Chrom, Cancer. 2016

Anomalie 3q26: Diagnostic? Pronostic?

Leucémie Aigue Myéloïde

-Surexpression *EVI1*: 6-11% (adultes); 10-25% (pédiatrie)
-Anomalie 3q entrainant une surexpression *EVI1*: 2-2,5% (adulte)

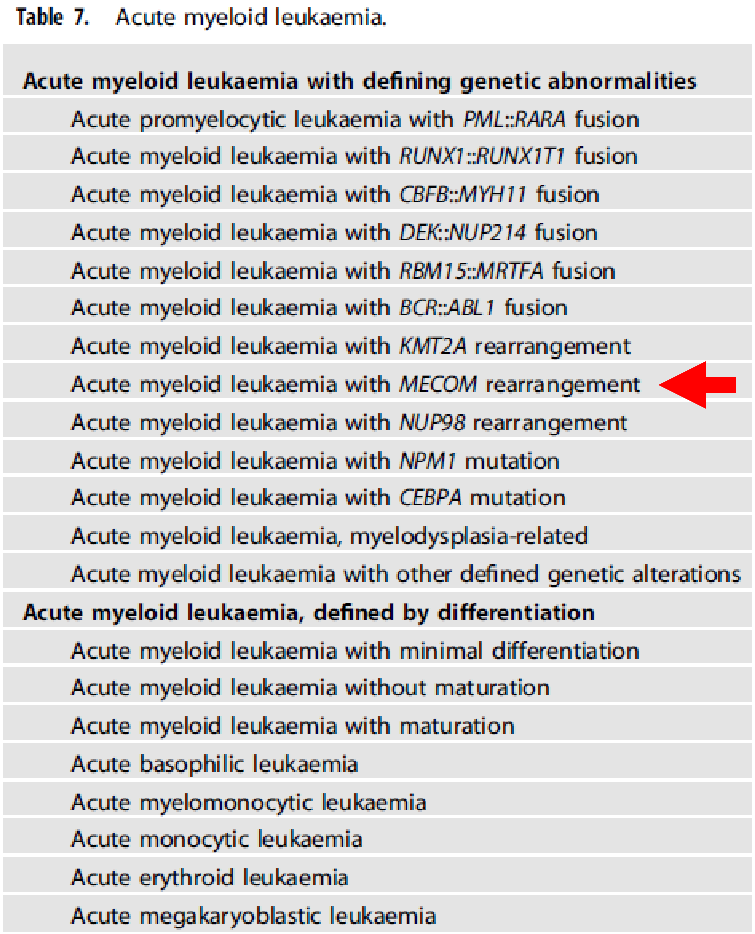
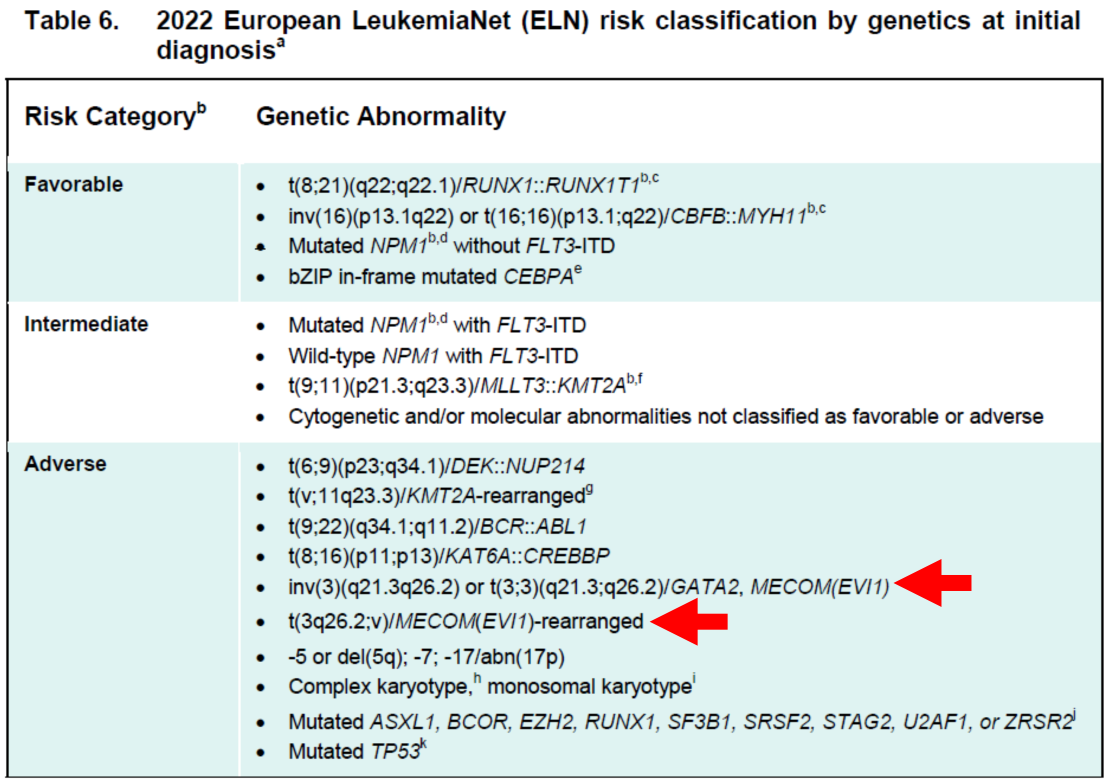


Table 7. Acute myeloid leukaemia.

Acute myeloid leukaemia with defining genetic abnormalities
Acute promyelocytic leukaemia with *PML::RARA* fusion
Acute myeloid leukaemia with *RUNX1::RUNX1T1* fusion
Acute myeloid leukaemia with *CBFB::MYH11* fusion
Acute myeloid leukaemia with *DEK::NUP214* fusion
Acute myeloid leukaemia with *RBM15::MRTFA* fusion
Acute myeloid leukaemia with *BCR::ABL1* fusion
Acute myeloid leukaemia with *KMT2A* rearrangement
Acute myeloid leukaemia with *MECOM* rearrangement
Acute myeloid leukaemia with *NUP98* rearrangement
Acute myeloid leukaemia with *NPM1* mutation
Acute myeloid leukaemia with *CEBPA* mutation
Acute myeloid leukaemia, myelodysplasia-related
Acute myeloid leukaemia with other defined genetic alterations
Acute myeloid leukaemia, defined by differentiation
Acute myeloid leukaemia with minimal differentiation
Acute myeloid leukaemia without maturation
Acute myeloid leukaemia with maturation
Acute basophilic leukaemia
Acute myelomonocytic leukaemia
Acute monocytic leukaemia
Acute erythroid leukaemia
Acute megakaryoblastic leukaemia

WHO 2022

Table 6. 2022 European LeukemiaNet (ELN) risk classification by genetics at initial diagnosis[a]



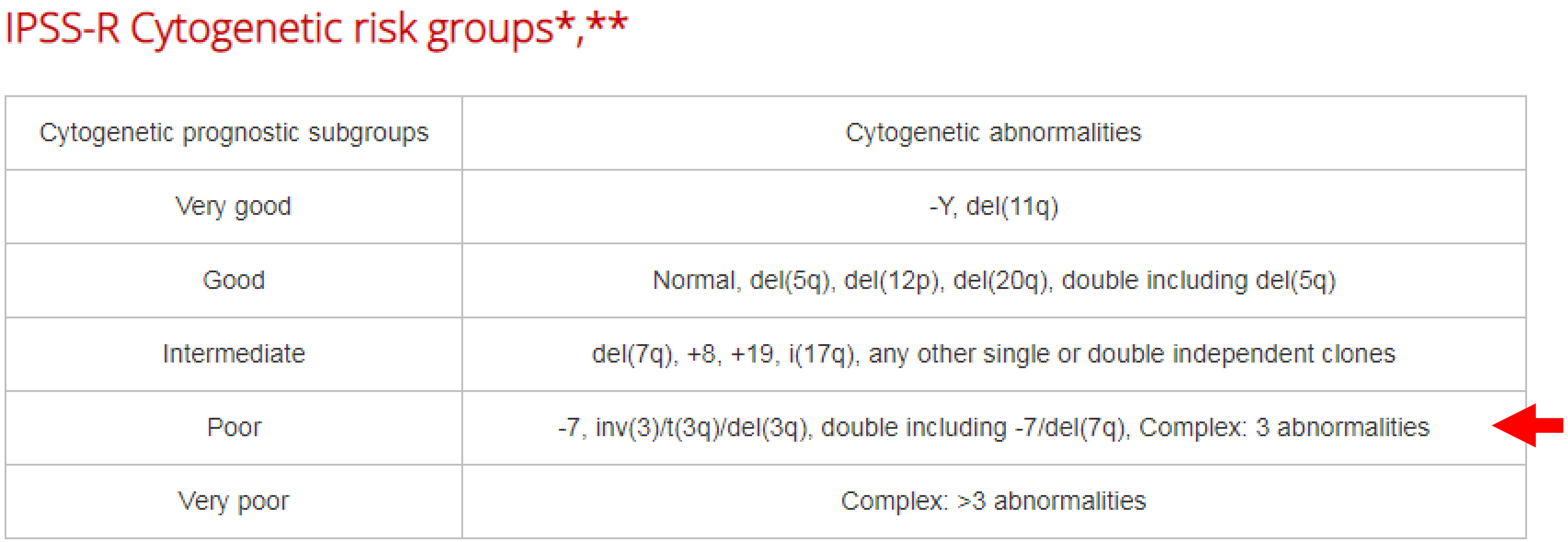
Risk Category[b]	Genetic Abnormality
Favorable	• t(8;21)(q22;q22.1)/*RUNX1::RUNX1T1*[b,c] • inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22)/*CBFB::MYH11*[b,c] • Mutated *NPM1*[b,d] without *FLT3*-ITD • bZIP in-frame mutated *CEBPA*[e]
Intermediate	• Mutated *NPM1*[b,d] with *FLT3*-ITD • Wild-type *NPM1* with *FLT3*-ITD • t(9;11)(p21.3;q23.3)/*MLLT3::KMT2A*[b,f] • Cytogenetic and/or molecular abnormalities not classified as favorable or adverse
Adverse	• t(6;9)(p23;q34.1)/*DEK::NUP214* • t(v;11q23.3)/*KMT2A*-rearranged[g] • t(9;22)(q34.1;q11.2)/*BCR::ABL1* • t(8;16)(p11;p13)/*KAT6A::CREBBP* • inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2)/*GATA2, MECOM(EVI1)* • t(3q26.2;v)/*MECOM(EVI1)*-rearranged • -5 or del(5q); -7; -17/abn(17p) • Complex karyotype,[h] monosomal karyotype[i] • Mutated *ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, or ZRSR2*[j] • Mutated *TP53*[k]

ELN 2022

Liang et Wang. Cancers. 2020; Dohner et al. Blood. 2017; Greenberg et al. Blood. 2012

Anomalie 3q26: Pronostic?

Syndrome Myélodysplasique

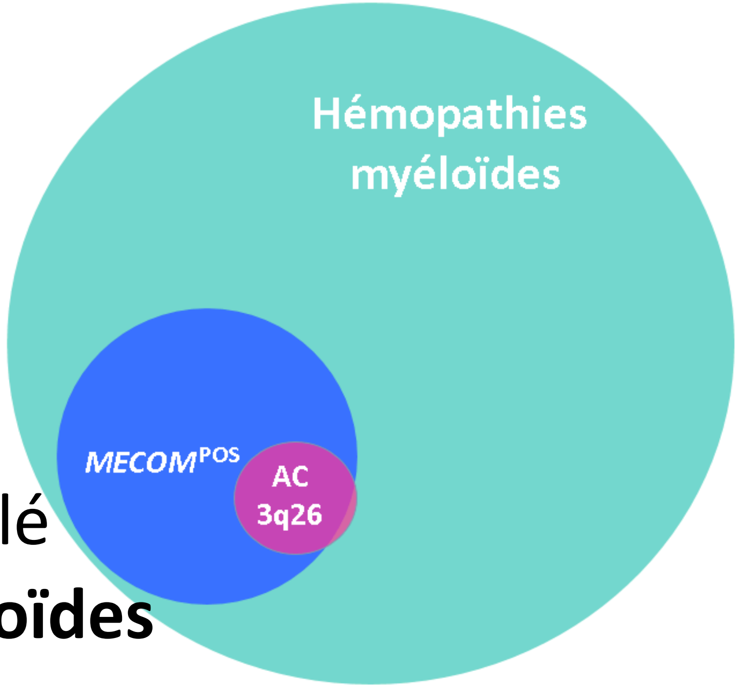


IPSS-R Cytogenetic risk groups*,**

Cytogenetic prognostic subgroups	Cytogenetic abnormalities
Very good	-Y, del(11q)
Good	Normal, del(5q), del(12p), del(20q), double including del(5q)
Intermediate	del(7q), +8, +19, i(17q), any other single or double independent clones
Poor	-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), double including -7/del(7q), Complex: 3 abnormalities
Very poor	Complex: >3 abnormalities

Greenberg PL et al. Blood. 2012 Sep

Objectifs



Objectif principal

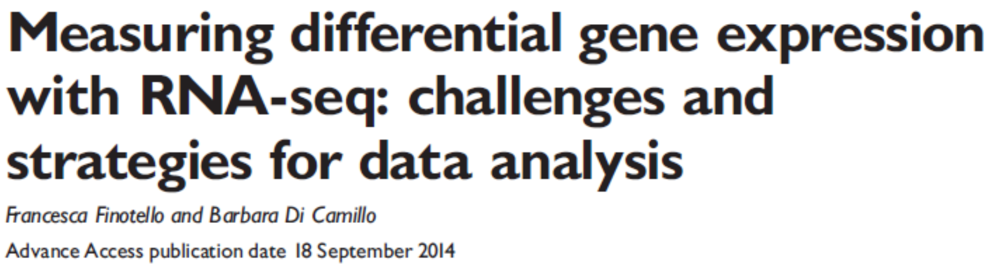
Analyse des données d'expression de *MECOM* par NGS ciblé

→**Etude dans une cohorte locale d'hémopathies myéloïdes**

Objectifs secondaires

- Caractérisation du mécanisme de dérégulation:
  - → Recherche d'anomalies chromosomiques du locus *MECOM* par FISH
- Caractérisation du profil génétique associé:
  - → Données cytogénétiques/ données moléculaires

Matériel et méthode



Measuring differential gene expression with RNA-seq: challenges and strategies for data analysis

Francesca Finotello and Barbara Di Camillo

Advance Access publication date 18 September 2014

- **Cohortes** *(mars 2019- aout 2022)*
  - Cas: n=335 prélèvement de patients hémopathies myéloïdes (moelle)
  - Témoins: n=10 témoins (moelle)

MECOM (*EVI1* E6E7)	***EIF2B1*** *FBXW2* ***PSMB2*** ***PUM1*** *TRIM27*

- **RNA seq ciblé**: données d'expression

Panel NGS ADN/ARN *Oncomine Myeloid Research Assay (ThermoFisherScientific)*

Mutations

Fusions

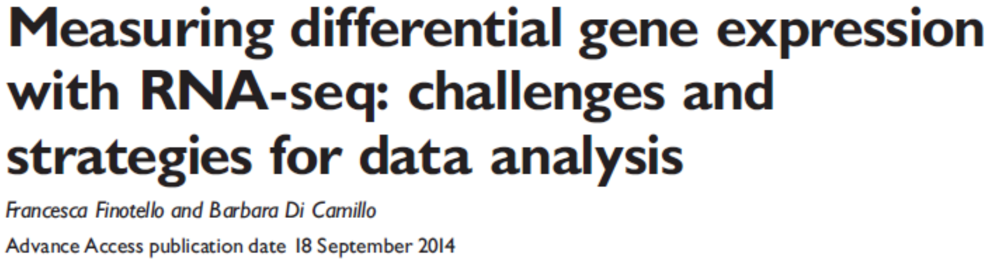
Expression

$$\text{Expression différentielle}_{\text{cible}} = \frac{\text{Amplicons e\_2\_e}_{\text{cible}}}{\text{Moyenne (Amplicons e\_2\_e}_{\text{gènes de ménage}})}$$

- Gènes de ménage retenus: *EIF2B1, PSMB2, PUM1*

  (stabilité d'expression et taux d'expression permettant de détecter de faible variation de la cible)
- Seuil de positivité (cohorte témoins): **0,2076**

Matériel et méthode



Measuring differential gene expression with RNA-seq: challenges and strategies for data analysis

Francesca Finotello and Barbara Di Camillo

Advance Access publication date 18 September 2014

- **Validation des données**: comparaison de méthode qPCR ciblée surexpression locus *MECOM*
  - Gènes de ménage: *EIF2B1, PSMB2, PUM1*
  - 5 témoins, 31 cas (22 neg et 19 pos)
  - Etablissement seuil de positivité et corrélation avec ratio NGS

    Coefficient de Spearman 0,9615 (p<0,001)

E Pellier (master 1)

MECOM (*EVI1* E6E7)	***EIF2B1*** *FBXW2* ***PSMB2*** ***PUM1*** *TRIM27*

Mutations

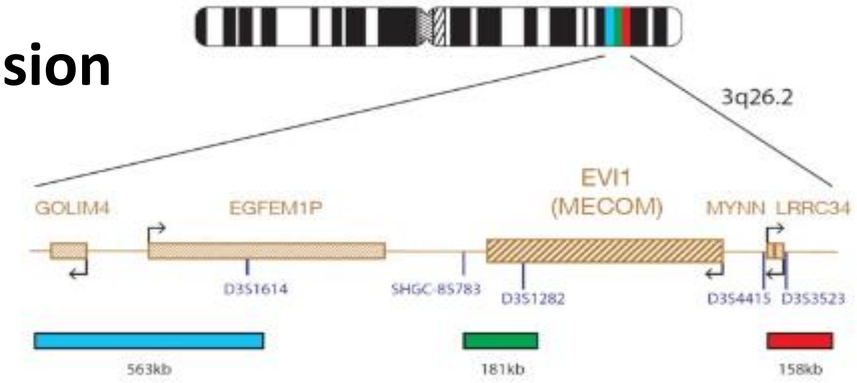
Fusions

Expression

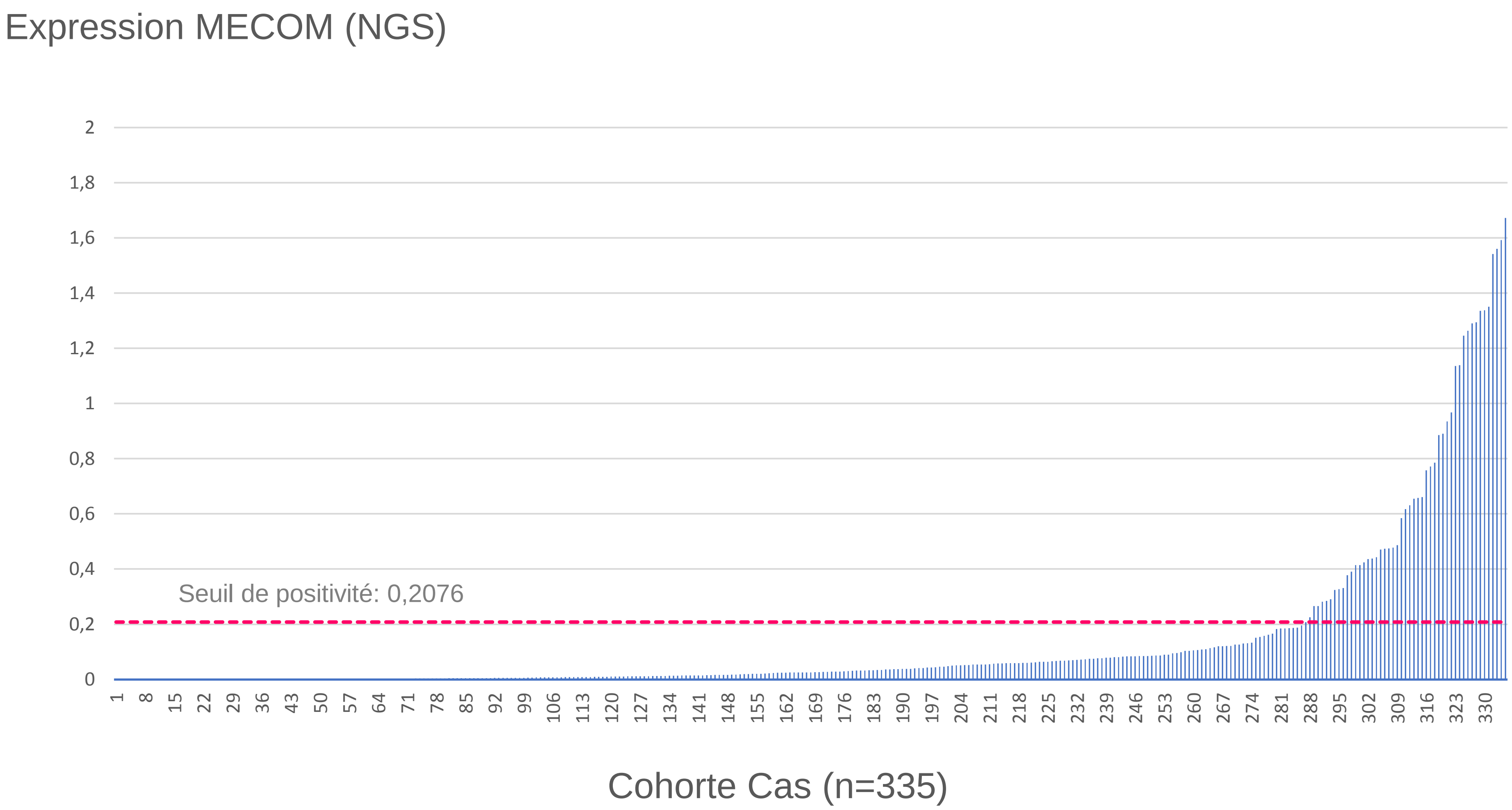
- **Mécanismes chromosomiques de dérégulation d'expression**

  Etude du locus *MECOM* par FISH

  Sonde Cytocell®

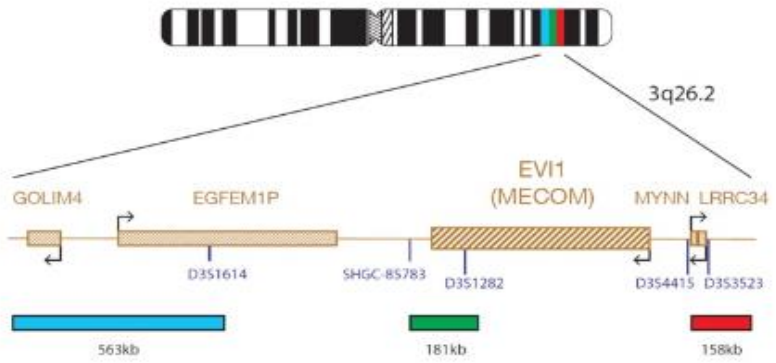

3q26.2
GOLIM4
EGFEM1P
EVI1
(MECOM)
MYNN
LRRC34
D3S1614
SHGC-85783
D3S1282
D3S4415
D3S3523
563kb
181kb
158kb

Résultats



N= 46 cas positifs

Résultats


3q26.2
GOLIM4
EGFEM1P
EVI1
(MECOM)
MYNN
LRRC34
D3S1614
SHGC-85783
D3S1282
D3S4415
D3S3523
563kb
181kb
158kb

Etude FISH: 43/46 cas

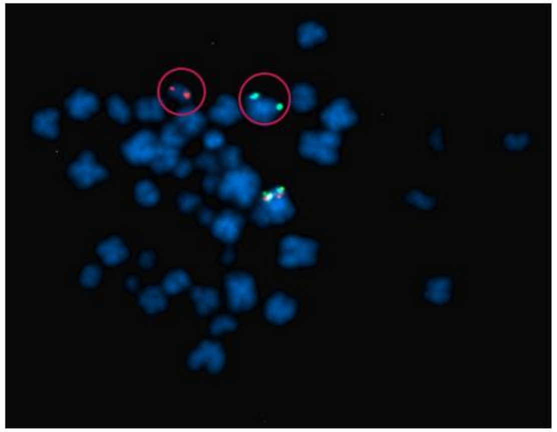
→9/43 cas avec anomalie chromosomique

- **4 anomalies de structure**
- **5 anomalies de nombre**

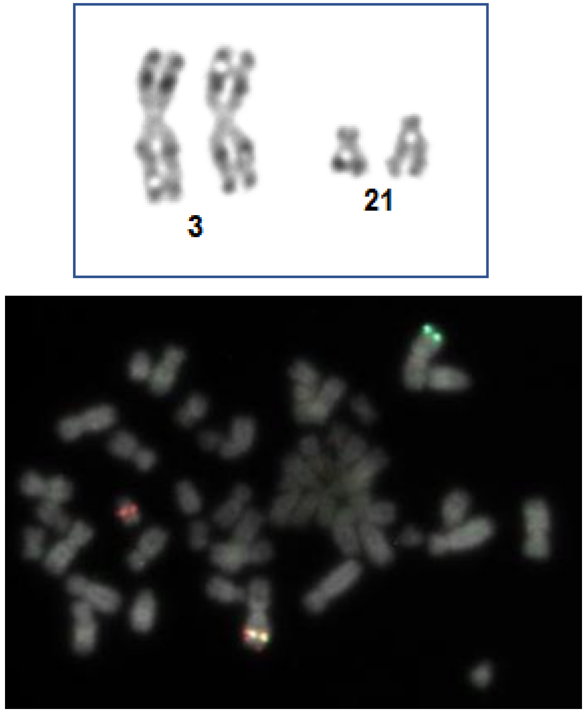
Résultats

→9/43 cas avec anomalie chromosomique

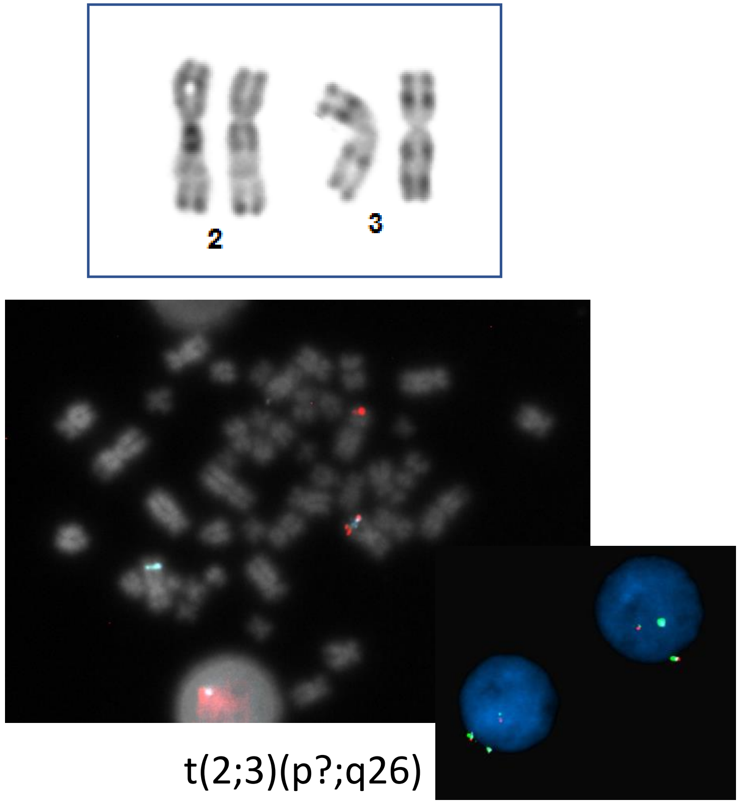
- **4 anomalies de structure:** t(3;?)(q26;?), t(3;21)(q26;q22) *RUNX1::MECOM*, t(2;3)(p?23;q26), inv(3)(q21q26)x2



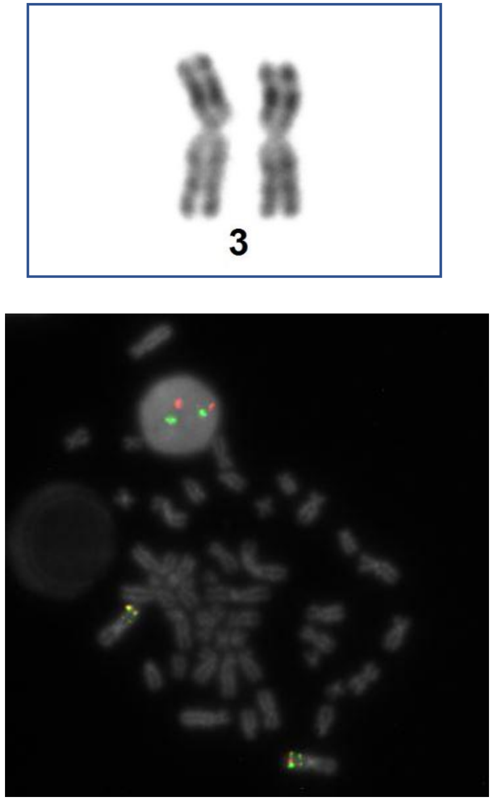
t(3;?)(q26;?)
20/25 mitoses 33% noyaux
Cryptique
SMD



t(3;21)(q26;q21)
12/26 mitoses 40% noyaux
SMD

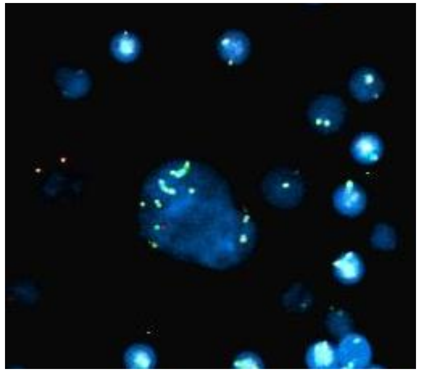


t(2;3)(p?;q26)
11/24 mitoses 33% noyaux
SMD



Inv(3)(q21q26)x2
37/39 mitoses 77% noyaux
LAM

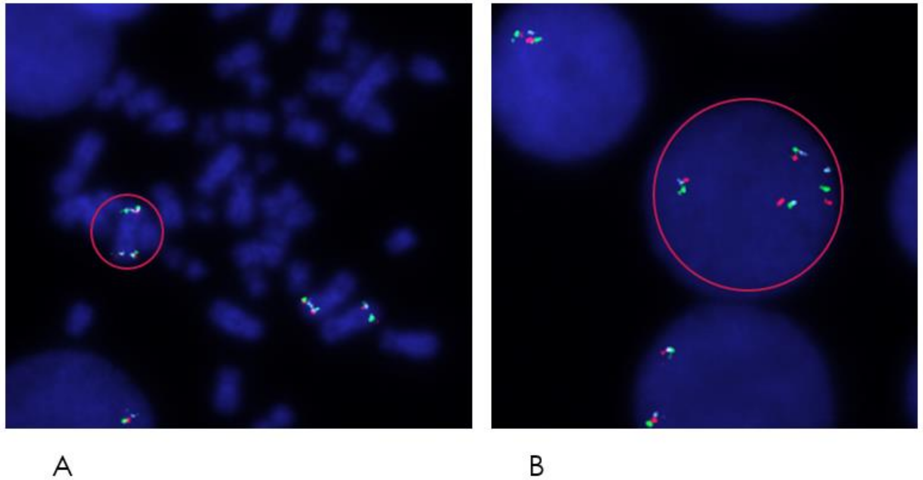
Résultats



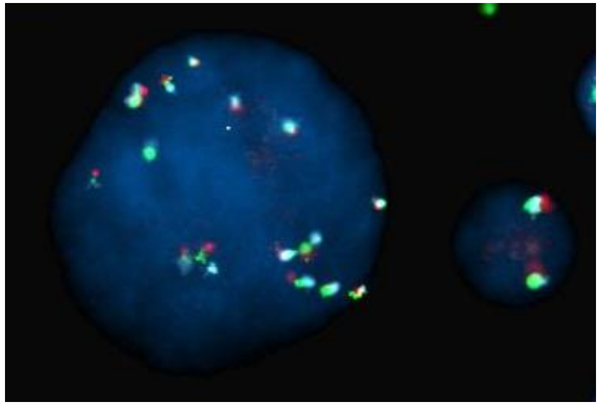
→**9/43 cas avec anomalie chromosomique**

- **5 anomalies de nombre:** augmentation du nombre de copies, clone de faible taille

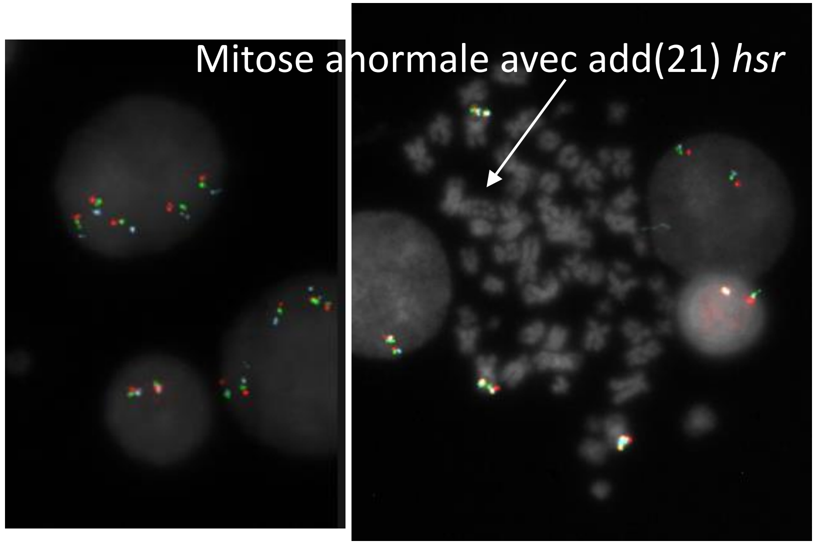
Profils douteux: faible nombre de noyaux anormaux → clone minoritaire?



i(3)(q12)
1/39 mitose 5/203 noyaux
LAM
Non vu au caryotype



Amplification
Nb de noyaux non quantifiable,
cellules reconnaissables par leur taille
SMD
Non vu au caryotype



Mitose anormale avec add(21) *hsr*

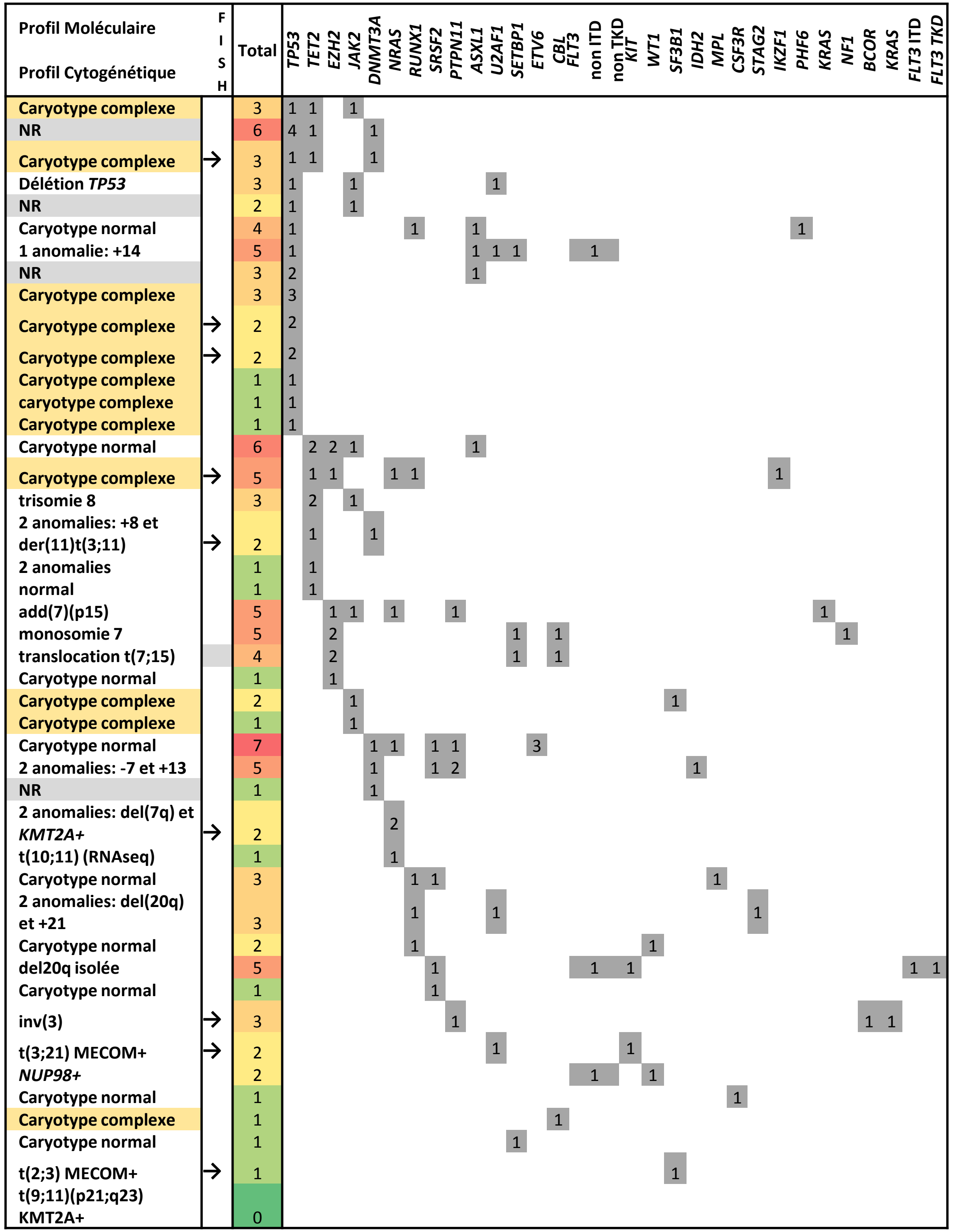
Trisomie 3 sous clonale?
1 mitose/38 ~10 noyaux/214
SMD
Non vu au caryotype

Résultats

Données complémentaires: 42/46 cas

2,63 mutations/ patient (0-7)
- *TP53*: 22 mutations, 14 patients → 5 cas profil multi-mutés
- *TET2*: 11 mutations, 9 patients
- *EZH2*: 9 mutations, 6 patients
- *JAK2*: 8 mutations, 8 patients

12/40 (30%) caryotype complexe
9/40 (22%) caryotype normal



Profil Moléculaire **Profil Cytogénétique**	**FISH**	**Total**	***TP53***	***TET2***	***EZH2***	***JAK2***	***DNMT3A***	***NRAS***	***RUNX1***	***SRSF2***	***PTPN11***	***ASXL1***	***U2AF1***	***SETBP1***	***ETV6***	***CBL***	***FLT3* non ITD non TKD**	***KIT***	***WT1***	***SF3B1***	***IDH2***	***MPL***	***CSF3R***	***STAG2***	***IKZF1***	***PHF6***	***KRAS***	***NF1***	***BCOR***	***KRAS***	***FLT3* ITD**	***FLT3* TKD**
Caryotype complexe		3	1	1		1																										
NR		6	4	1			1																									
Caryotype complexe	→	3	1	1			1																									
Délétion *TP53*		3	1			1							1																			
NR		2	1			1																										
Caryotype normal		4	1						1			1														1						
1 anomalie: +14		5	1									1	1	1			1															
NR		3	2									1																				
Caryotype complexe		3	3																													
Caryotype complexe	→	2	2																													
Caryotype complexe	→	2	2																													
Caryotype complexe		1	1																													
caryotype complexe		1	1																													
Caryotype complexe		1	1																													
Caryotype normal		6		2	2	1						1																				
Caryotype complexe	→	5		1	1			1	1																1							
trisomie 8		3		2		1																										
2 anomalies: +8 et der(11)t(3;11)	→	2		1			1																									
2 anomalies		1		1																												
normal		1		1																												
add(7)(p15)		5			1	1		1			1																1					
monosomie 7		5			2									1		1												1				
translocation t(7;15)		4			2									1		1																
Caryotype normal		1			1																											
Caryotype complexe		2				1														1												
Caryotype complexe		1				1																										
Caryotype normal		7					1	1		1	1				3																	
2 anomalies: -7 et +13		5					1			1	2										1											
NR		1					1																									
2 anomalies: del(7q) et *KMT2A+*	→	2						2																								
t(10;11) (RNAseq)		1						1																								
Caryotype normal		3							1	1												1										
2 anomalies: del(20q) et +21		3							1				1											1								
Caryotype normal		2							1										1													
del20q isolée		5								1							1	1													1	1
Caryotype normal		1								1																						
inv(3)	→	3									1																		1	1		
t(3;21) MECOM+	→	2											1					1														
NUP98+		2															1		1													
Caryotype normal		1																					1									
Caryotype complexe		1														1																
Caryotype normal		1												1																		
t(2;3) MECOM+	→	1																		1												
t(9;11)(p21;q23) KMT2A+		0																														

Résultats

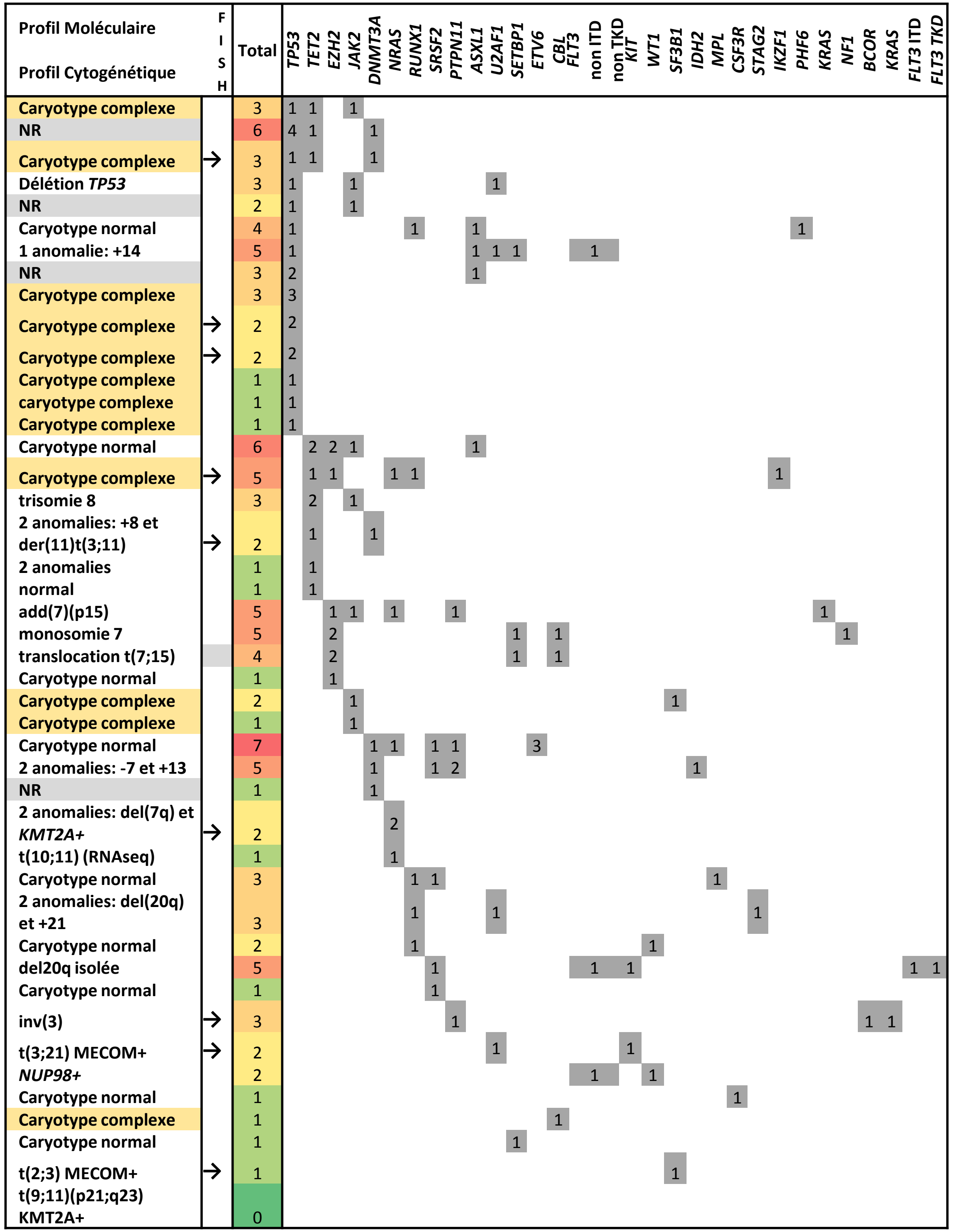
Données complémentaires: 44/46 cas

2,63 mutations/ patient (0-7)

- *TP53*: 22 mutations, 14 patients → 5 cas profil multi-mutés
- *TET2*: 11 mutations, 9 patients
- *EZH2*: 9 mutations, 6 patients
- *JAK2*: 8 mutations, 8 patients

12/40 (30%) caryotype complexe
9/40 (22%) caryotype normal

Association surexpression *MECOM*/ mutation *TP53*/ caryotype complexe



Profil Moléculaire Profil Cytogénétique	FISH	Total	*TP53*	*TET2*	*EZH2*	*JAK2*	*DNMT3A*	*NRAS*	*RUNX1*	*SRSF2*	*PTPN11*	*ASXL1*	*U2AF1*	*SETBP1*	*ETV6*	*CBL*	*FLT3* non ITD non TKD	*KIT*	*WT1*	*SF3B1*	*IDH2*	*MPL*	*CSF3R*	*STAG2*	*IKZF1*	*PHF6*	*KRAS*	*NF1*	*BCOR*	*KRAS*	*FLT3* ITD	*FLT3* TKD
Caryotype complexe		3	1	1		1																										
NR		6	4	1			1																									
Caryotype complexe	→	3	1	1			1																									
Délétion *TP53*		3	1			1							1																			
NR		2	1			1																										
Caryotype normal		4	1						1			1														1						
1 anomalie: +14		5	1									1	1	1			1															
NR		3	2									1																				
Caryotype complexe		3	3																													
Caryotype complexe	→	2	2																													
Caryotype complexe	→	2	2																													
Caryotype complexe		1	1																													
caryotype complexe		1	1																													
Caryotype complexe		1	1																													
Caryotype normal		6		2	2	1						1																				
Caryotype complexe	→	5		1	1			1	1																1							
trisomie 8		3		2		1																										
2 anomalies: +8 et der(11)t(3;11)	→	2		1			1																									
2 anomalies		1		1																												
normal		1		1																												
add(7)(p15)		5			1	1		1			1																1					
monosomie 7		5			2									1		1												1				
translocation t(7;15)		4			2									1		1																
Caryotype normal		1			1																											
Caryotype complexe		2				1														1												
Caryotype complexe		1				1																										
Caryotype normal		7					1	1		1	1				3																	
2 anomalies: -7 et +13		5					1			1	2										1											
NR		1					1																									
2 anomalies: del(7q) et *KMT2A+*	→	2						2																								
t(10;11) (RNAseq)		1						1																								
Caryotype normal		3							1	1												1										
2 anomalies: del(20q) et +21		3							1				1											1								
Caryotype normal		2							1										1													
del20q isolée		5								1							1	1													1	1
Caryotype normal		1								1																						
inv(3)	→	3									1																		1	1		
t(3;21) MECOM+	→	2											1					1														
NUP98+		2															1		1													
Caryotype normal		1																					1									
Caryotype complexe		1														1																
Caryotype normal		1												1																		
t(2;3) MECOM+	→	1																		1												
t(9;11)(p21;q23) KMT2A+		0																														

Discussion et Perspectives

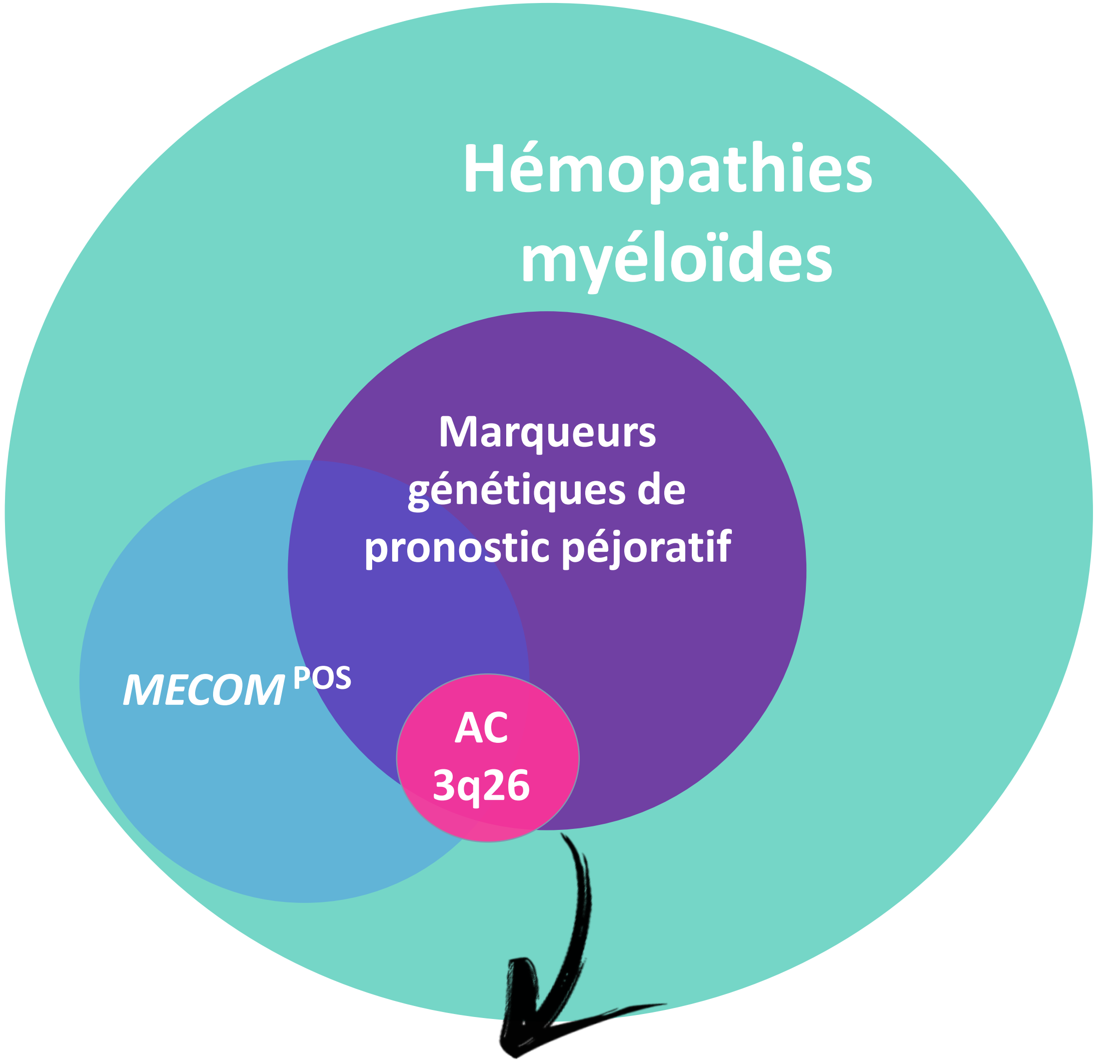
Cohorte cas:

	Fréquence surexpression *MECOM*	Fréquence AC locus *MECOM*
Cohorte (total, n=335)	**n= 46/335 (13,7%)**	**n=9/335 (2,7%)**
Cohorte (LAM, n=191)	**n=25/191 (13,1%)**	**n=4/191 (2,1%)**
Lugthart et al. 2008 (LAM, n=534)	n=41/534 (7,7%)	n=8/534 (1,5%)
Barjesteh et al. 2003 (LAM, n=319)	n=44/319 (13,8%)	n=4/319 (1,25%)
Gröschel et al. 2010 (LAM, n=1382)	n=148/1382 (10,7%)	n=27/1382 (1,95%)
Yamato et al. 2017 (LAM, n=151)	n=25/151 (17%)	n=2/151 (1,3%)
Langabeer et al. 2001 (LAM, n=336)	n=30/336 (8,9%)	n=10/336 (3%)

AC du locus: diversité +++, pas d’anomalies récurrentes

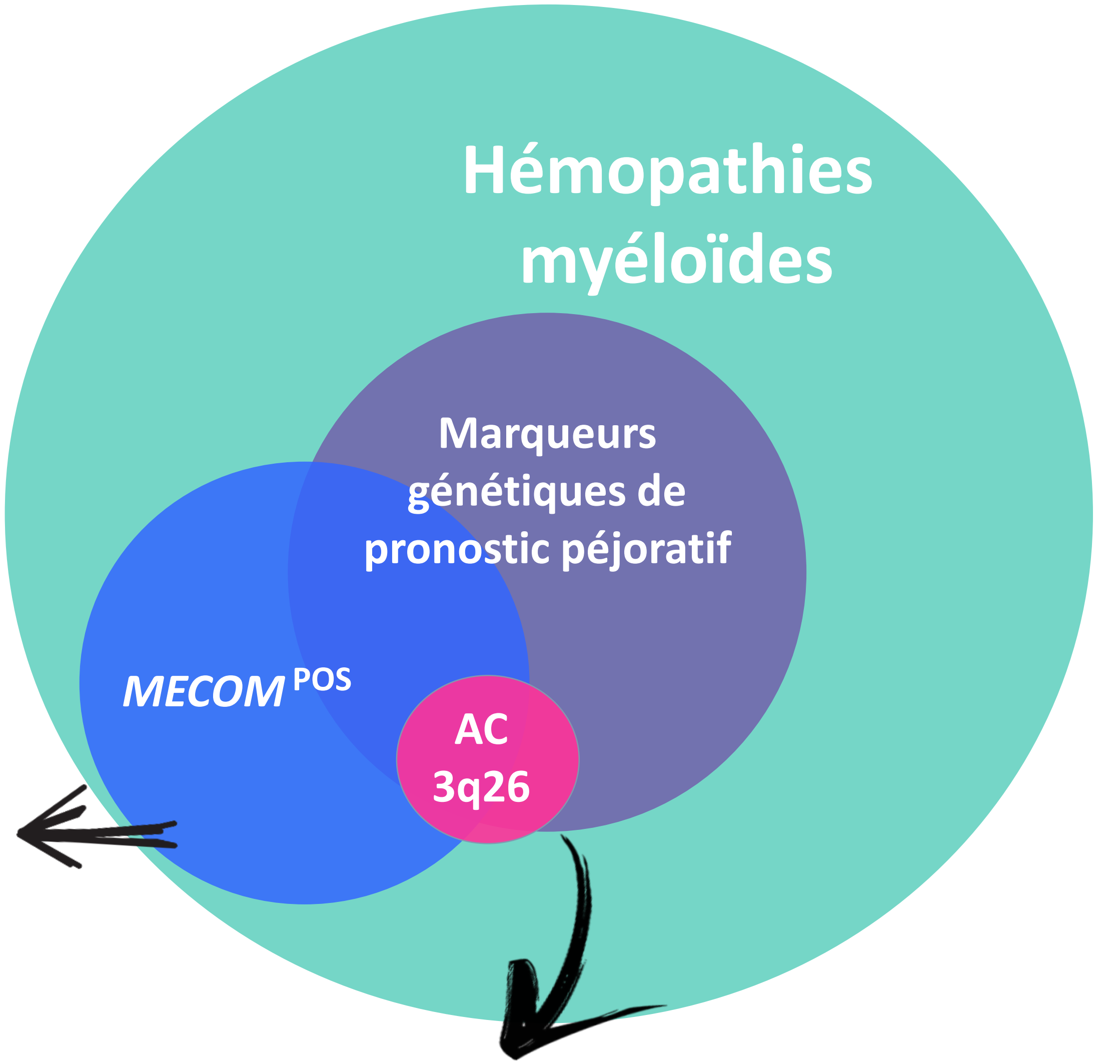
→ Détection d’anomalie dans clone de faible taille: limites des techniques de cytogénétiques conventionnelles?

Discussion et Perspectives


Hémopathies myéloïdes
Marqueurs génétiques de pronostic péjoratif
MECOM POS
AC 3q26

Entités bien définies dans les classifications pronostiques
→ Pronostic péjoratif

Discussion et Perspectives



Hémopathies myéloïdes

Marqueurs génétiques de pronostic péjoratif

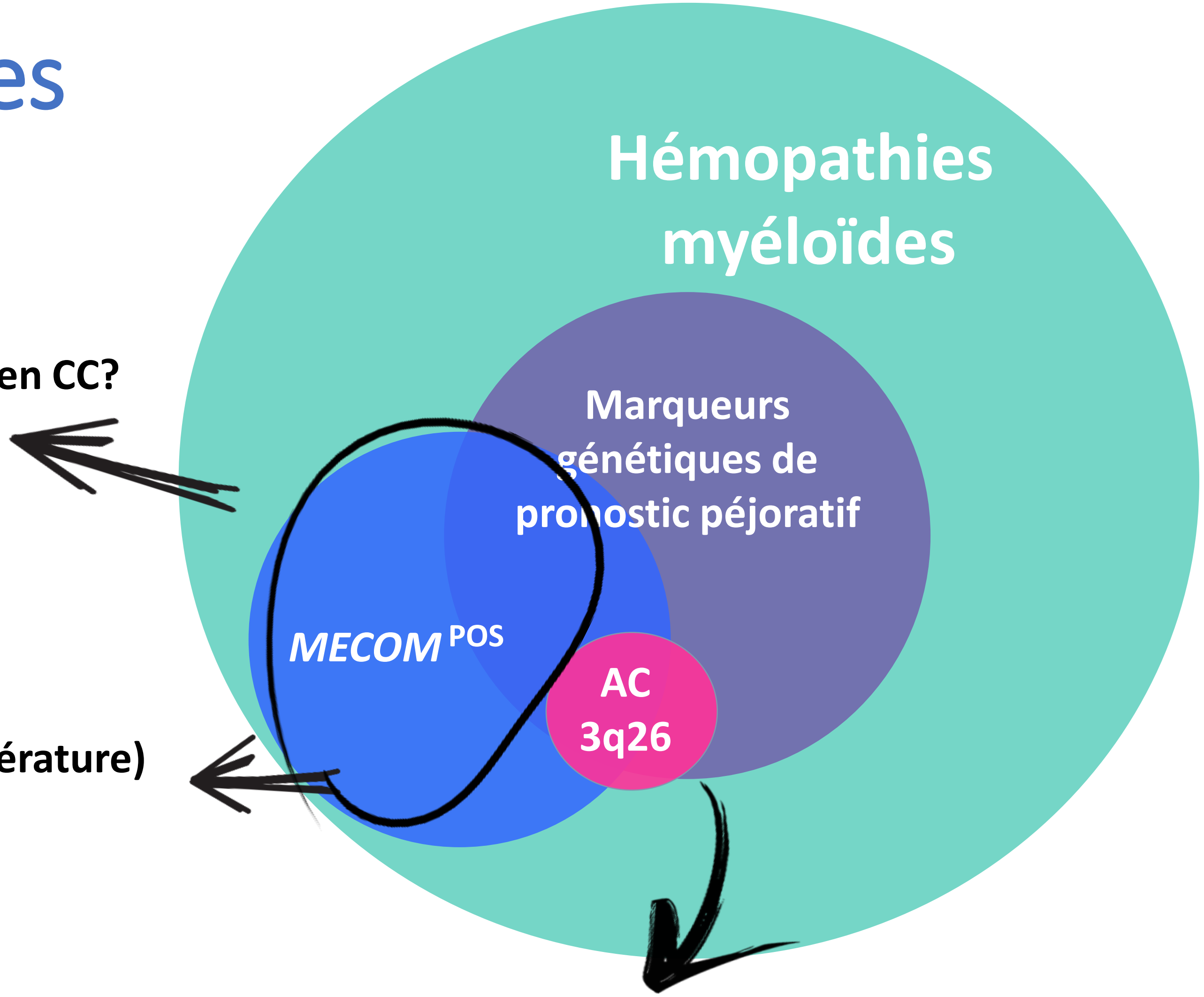
MECOM **POS**

AC 3q26

Marqueur de pronostic péjoratif (données littérature)
→ Non recherché en systématique

Entités bien définies dans les classifications pronostiques
→ Pronostic péjoratif

Discussion et Perspectives


Hémopathies myéloïdes
Marqueurs génétiques de pronostic péjoratif
MECOM POS
AC 3q26

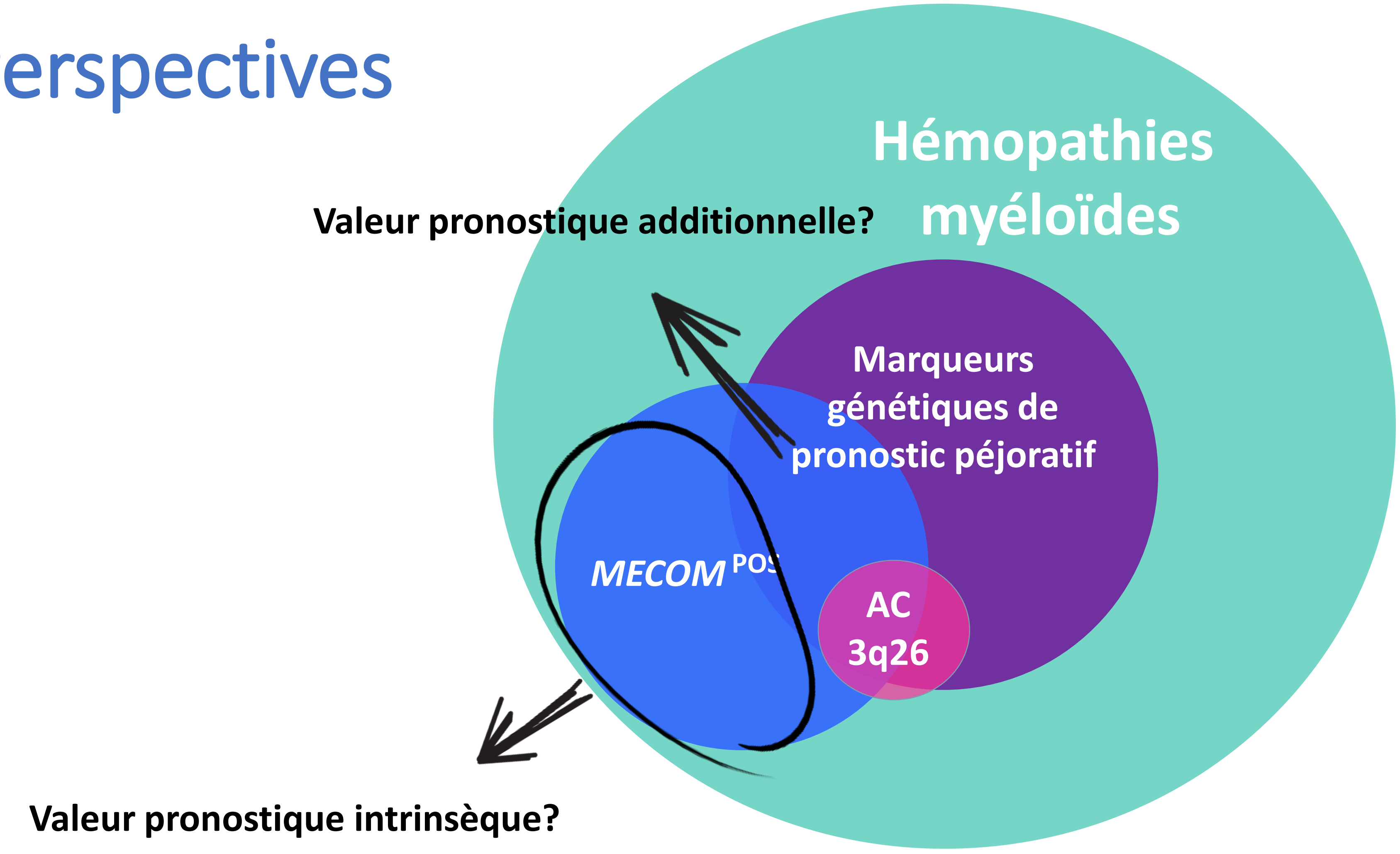
Cas non détectés

Mécanismes chromosomiques non détectés en CC?
Mécanismes autres que chromosomique ?
→ Peu étudiés

Marqueur de pronostic péjoratif (données littérature)
→ Non recherché en systématique

Entités bien définies dans les classifications pronostiques
→ **Pronostic péjoratif**

Discussion et Perspectives



Hémopathies myéloïdes

Valeur pronostique additionnelle?

Marqueurs génétiques de pronostic péjoratif

MECOM^{POS}

AC 3q26

Valeur pronostique intrinsèque?

Merci pour votre attention

Université
de Paris

BTG

MOCAE

CHU
CAEN NORMANDIE