

INTRODUCTION

L'OMS en 2008 a classé les hémopathies malignes sur des critères morphologiques, immunologiques et génétiques dans un intérêt diagnostique, pronostic et thérapeutiques. Les nouvelles technologies pangénomiques de SNP array et de séquençage de haut débit sont en

train de révéler la complexité et l'hétérogénéité génétique de ces hémopathies malignes. C'est ainsi que nous avons adapté la SNP array (Illumina) à des échantillons de patients atteints d'hémopathies malignes afin d'étudier les avantages et les limites de cette technique.

SÉLECTION DES PATIENTS

Analyse de 32 échantillons de sang [16], moelle [8] et culots fixés de cytogénétique [8] de patients atteints de LAL[7], LAM[11], SLPB[4], SMD[6] et SMP[1] et 4 témoins. Les patients sélectionnés ont présenté un minimum de 20% d'infiltration de cellules malignes : seuil de sensibilité de détection d'une mosaïque défini dans une étude préalable de SNP array. Pour 19 patients, nous avons comparé l'étude cytogénétique et la FISH réalisée soit sur un prélèvement direct ou après culture sur culot de cytogénétique.

Pour 18 patients, les données cytologiques et immunologiques sont disponibles. L'étude SNP array nous a permis d'étudier les pertes, les gains de copie et les pertes d'hétérozygotie grâce à l'étude du génotype. Cette technique ne permet pas d'étudier les translocations réciproques équilibrées.

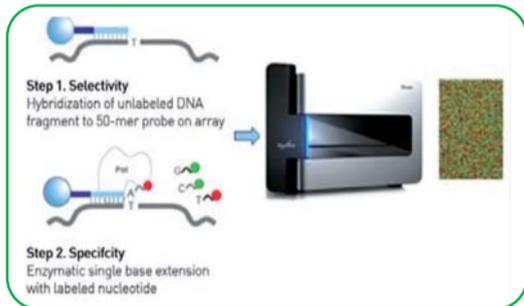
MATÉRIEL ET METHODES

Les techniques d'extractions des ADN du sang et de la moelle sont réalisées avec les kits Qiagen. Pour l'extraction des préparations fixées de cytogénétique, nous nous sommes référés à la technique publiée par Mac Kinnon et al (Molecular cytogenetics 2012,5 ;10).

Principe technique de la SNP array

La technique utilisée est celle préconisée par le fournisseur (Illumina, Human-Cyto12-SNP-Bead chip). Elle est basée sur l'intensité de fluorescence émise après hybridation de l'échantillon sur une lame. Cette lame est recouverte avec 300,000 SNP répartis sur l'ensemble du

génom. Au préalable, l'ADN de l'échantillon est amplifié, fragmenté et marqué. La lecture est réalisée par un scanner et l'interprétation est réalisée par rapport à un ADN de référence du projet HAPMAP



L'interprétation des profils génomiques en SNP array
Figure 1 :
Technique Illumina : puce HumanCytoSNP-12v1

est réalisée grâce à l'aide de 2 logiciels (karyostudio et génome studio, Illumina) permettant la détection des déséquilibres génomiques (CNV "copy number variation") et l'étude du génotype par l'intermédiaire de la détermination de la fréquence allélique B par rapport à un allèle A.

La construction génomique est hg19. La résolution utilisée est celle de 200 K b. Les CNV pourront être confirmés soit par FISH ou par qPCR selon la taille ou selon que ce CNV comporte un gène important impliqué dans les hémopathies malignes.

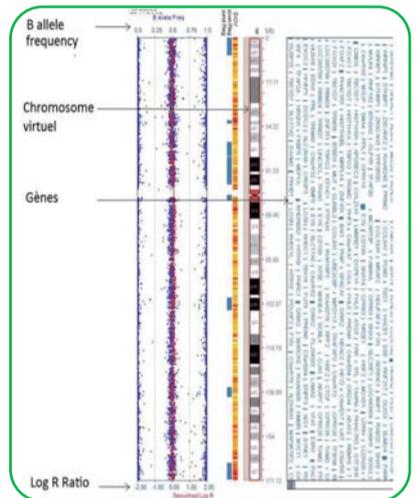


Figure 2 :
Logiciel d'interprétation Karyostudio

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dans tous les cas d'hémopathies malignes, le nombre d'anomalie observée en SNP array est supérieure au nombre observé au caryotype conventionnel. Ce nombre s'étend de 3 à 10 anomalies supplémentaires.

Il n'a été observé aucune discordance entre l'étude SNP array et les études cytogénétiques. Dans un cas d'échec du caryotype d'une LAM, l'étude SNP a détecté la présence d'une del(5) et d'une trisomie 4 évoquant une hémopathie secondaire.

Les LA avec translocations récurrentes (t(15;17), t(16;16), t(1;22)) n'ont pas montré de réarrangement associé pouvant modifier le pronostic. L'étude SNP a confirmé les hyperdiploïdies

DIAGNOSTIC	RÉSULTATS CARYOTYPES ET FISH	SNP ARRAY
LAM/AREB	43-45, XX, der [5; 11] (p10; q10), -5, -12, -14, ?der(16), -22, +mar2. ish der(5;11)(EGR1+,D5S23-,D5S721-), mar2(EGR1+)[2]	Perte de copie 4 CNV dont 2 CNV en : ■ 5p13.3p15 q13q34 (32 Mb) ■ 11p15.5p15.4 (8,2 Mb)(perte de copie interstitielle)
LAM	ND	Gain de copie ■ 21q21.1q22.3 (18 Mb) (trisomie 21)
LAM 5	47,XY, +11[20]	Gain de copie : 4 CNV dont 2 CNV en 11p15.1q23.1[10,2 Mb] (trisomie 11) et en 17q21.31[1,2 Mb](NF1)

Etude comparative caryotype conventionnel et SNP pour 3 cas de LAM

DIAGNOSTIC	CARYOTYPE + FISH	SNP ARRAY
LAT	46,XY (20)	Gain de copies : 4 CNV dont ■ 7p22.3p22.2(850Kb) Perte de copies : 1 CNV
LALB	45,X,8,del(11)(q21),der(21)(13)ishder(21)(AML1amp)[3]	Gain de copies : 6 CNV dont 1 CNV en ■ 21q21.1q22.3 [(36,5 Mb) ■ 10q25.3q26.2, Perte de copies : 8 CNV
LALB	46,XY ;t(8 ;22)(q24 ;q11) nuc ish(cMyc x2)[5'CMYCsep3'CMYC][38/200]	Anomalie C Myc non observé en SNP array
LALB	46, XY, del(13)(q14q31),add(14)(q32)[20]/46,XY[4]	Perte de copies : ■ 13q12.3q14.2q31.1[18 Mb] Mb ■ 14q32.33 [461 Kb] ■ 15q11.1q26.3[10 Mb]

Etude comparative caryotype conventionnel et SNP pour 4 cas de LAL

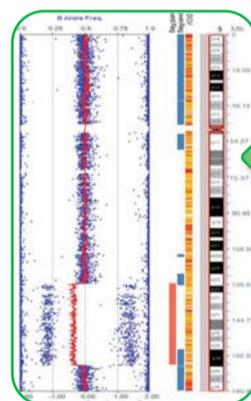
DIAGNOSTIC	SCORE DE MATUTES	SNP ARRAY
SLP B	1/5 (10% de cellules pathologiques)	Pas de déséquilibre génomiques Perte de copies : 1 CNV
SLP B	2/5 (50% de cellules pathologiques)	Gain de copies : 2 CNV dont une trisomie 12 Perte de copies : 3 CNV dont 13q14.3q14.2 [2,6 Mb] (Rb1)
SLP B	1/5	Gains de copies : 4 CNV
LLC en cours de traitement	3/5 (18% de cellules pathologiques)	Gains de copies : 4 CNV

Etude comparative caryotype conventionnel et SNP pour 4 cas de SLPB (L'étude SNP a été réalisée sur des échantillons de sang sans culture)

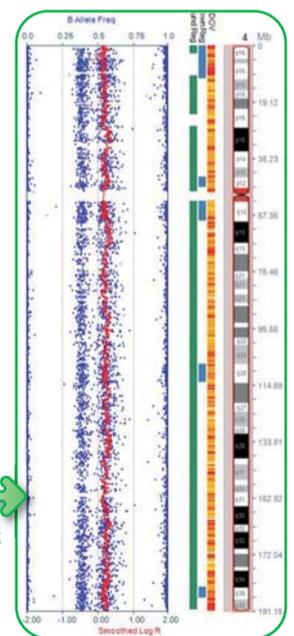
En rouge : réarrangements complexes observés en SNP array confirmés non au caryotype. Anomalie en FISH non observée en SNP array.

PATHOLOGIE	RÉSULTAT CARYOTYPES	RÉSULTAT SNP ARRAY
SMD	4,XY,der(7)t(1;7)(q10;q10)[6]/46,XY[14]	Gain de copies : 2 CNV Perte de copies : 7q11.21q36.3[97 Mb] (confirmée par FISH)
Cytopénie	46,XX,del(20)(q11q13)[13]/46,sl,t(9;12)(q13;q13)[4]/46,XX[3]	Gain de copies en 20q13.2 (1,5 Mb) Perte de copies en 20q11.22 (20,8 Mb)
SMD	46,der(2)t(2;11)(q31;p11);r(11)(7)/46,XX[4]	Perte de copies 3 CNV dont 2 en 11p13 p12 (Wt1) (8,21 Mb) 11 q14.1 q25 (ATM ; MLL) (55Mb) Gain de copies : 6q27 (< 200 Kb)(MLLT4) 6q27

Etude comparative caryotype conventionnel et SNP pour 4 cas de SLPB



Etude SNP d'une LAM en échec au caryotype
arr(Hg19)5q23q34[126,355,334-167,773,074]x 1 correspondant à une del(5q) au caryotype confirmée par la technique FISH



arr(Hg19)4p16.4q35.2[48,283,880-190,880,409] correspondant à une trisomie 4 au caryotype confirmée par la technique FISH avec la sonde CEP4

Les grands réarrangements sont tous confirmés en SNP array. L'étude sur des culots cytogénétiques permet d'identifier des marqueurs chromosomiques de plus petite taille et d'origine chromosomique inconnue. Ces régions peuvent comporter des gènes à impact diagnostique ou pronostic.

Comme attendu, nous n'avons répertorié aucun point de cassure de translocation réciproque équilibré et dans certains cas la FISH est plus sensible que la SNP comme ce réarrangement c Myc non détecté en SNP array.

CONCLUSION

Dans cette étude nous avons montré que la SNP array est applicable aux hémopathies malignes avec une bien meilleure résolution que le caryotype.

L'absence de biais de prolifération clonale liée à la culture cellulaire du caryotype associée à un taux très faible d'échec technique, rendent cette technique très performante.

L'un des intérêts majeurs est son application sur des culots fixés de cytogénétique permettant non seulement une étude objective des anomalies observées mais également l'identification de marqueurs chromosomiques d'origine inconnue.

L'interface de cette technologie avec les bases de données génomiques permettent de

mieux appréhender les gènes impliqués dans les hémopathies facilitant dans certains cas le diagnostic tout en apportant des éléments pronostics.

Les limites restent l'absence de détection de mosaïques faibles, l'absence de classification clonale et subclonale pouvant parfois impacter le pronostic et l'absence de détection d'anomalies équilibrées, ce qui donne toute la place au séquençage de haut débit.

Il est également à noter que la FISH est plus sensible que la SNP array pour la recherche de réarrangements et notamment pour des réarrangements CMyc.