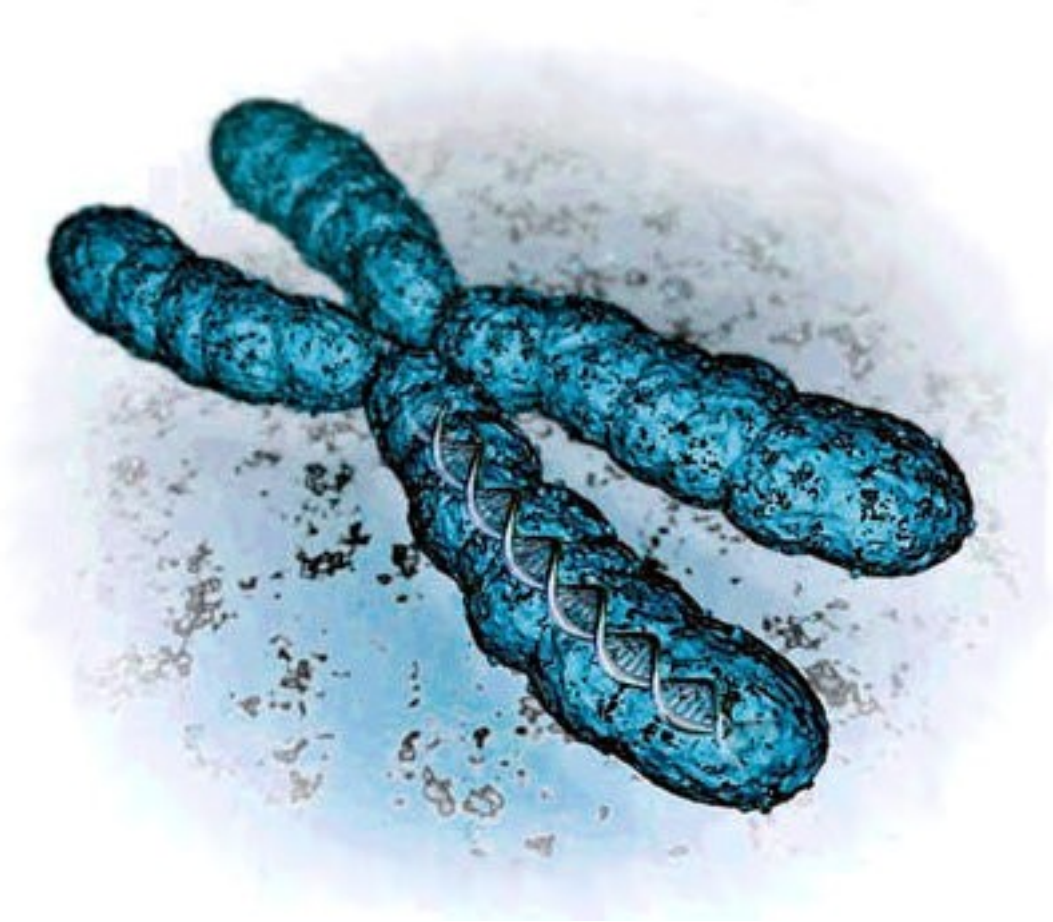
Sylvain Mareschal [@etu.univ-rouen.fr]

Anomalies chromosomiques



Thèse de Claire Lemaitre (2008), Université Claude Bernard – Lyon 1
Réarrangements chromosomiques dans les génomes de mammifères : caractérisation des points de cassure

CC BY NC

Introduction
Plan du cours

Sylvain Mareschal (novembre 2013) (cc) BY-NC

CM : 2h + 2h + 1h

Introduction

Altérations du nombre de copie
Amplifications, délétions (*G-banding, CGH, FISH en interphase, QMPSF, CNV-seq)*

Pertes d'hétérozygotie
Disomies uniparentales (*RFLP, SNP-array)*

Translocations
Gènes de fusions, échanges de promoteurs, inversions (*FISH en métaphase, SKY, LDI-PCR, NGS)*

Anomalies exotiques
Episomes, chromosomes baladeurs, aneuploïdie, chromothripsis

Challenges en oncologie
Clonalité, cellularité, anomalies constitutionnelles, complexité

Conclusion

TD : 1h

Analyse de figures → **Contrôle Continu**

TP : 2h

Banques de données
Somatique (ceci) + constitutionnel (Pascaline Gaildrat)

Visite Centre Henri Becquerel : 2h

PGM + Cytogénétique

Introduction

Anomalies somatiques et cancers

Sylvain Mareschal (novembre 2013) (cc) BY-NC

Un équilibre fragile ...

Prolifération cellulaire
Cassures de l'ADN (génotoxiques ...)
Mutations (erreurs de réplication ...)

Renouvellement cellulaire
Réparation (MMR, NER, BER ...)
Apoptose

... dans un génome très tolérant
~2 % d'ADN transcrit dans le génome humain
~1 % d'ADN exonique dans le génome humain
Code génétique redondant (mutations synonymes)
Génome diploïde (2 copies de chaque chromosome)

Déséquilibre naturel ...
Avec l'âge, accumulation :
- des expositions aux génotoxiques (radiation naturelle, alimentation ...)
- des anomalies non / mal réparées

... ou non ...
Prédispositions génétiques (inactivation de TP53 dans le syndrome de Li-Fraumeni ...)
Anomalies induites par un pathogène (Papillomavirus, hépatite B ...)
Expositions aux génotoxiques (tabac, chimio-thérapies, irradiations ...)

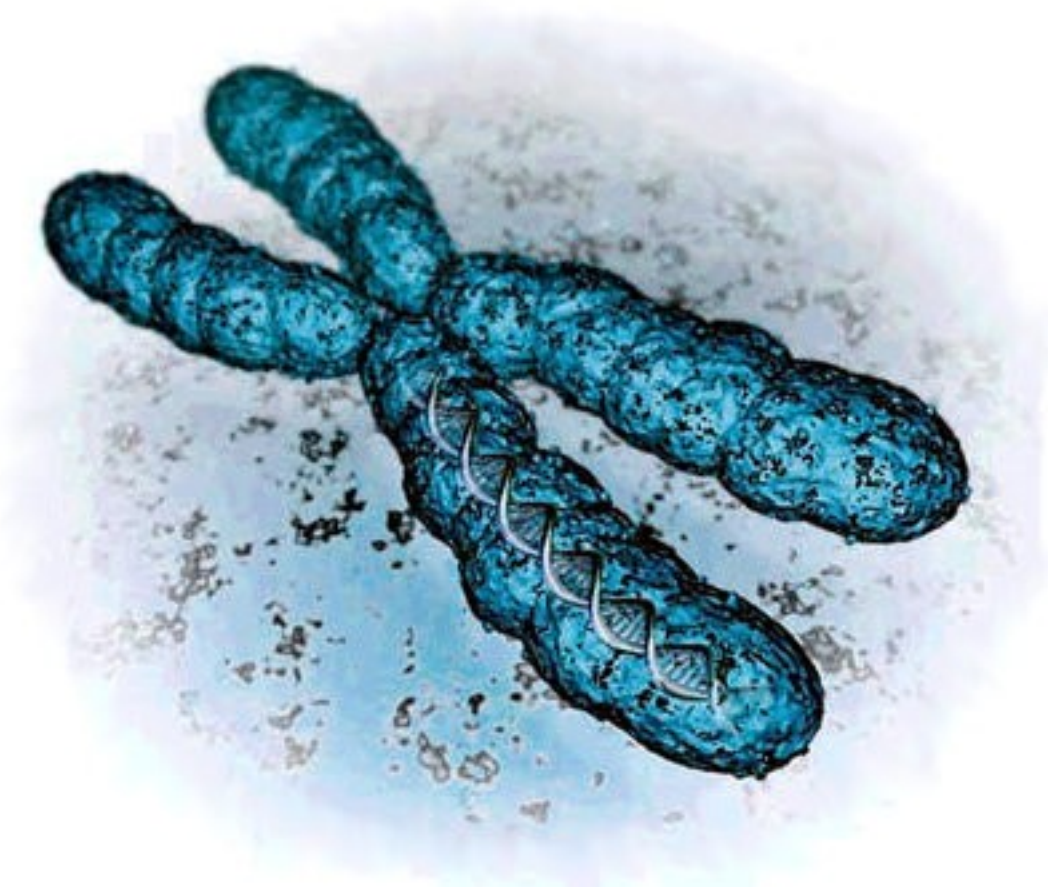
... qui peut s'emballer ...
Peut d'effet tant que ne touche qu'une cellule isolée
Emballement si touche un oncogène ou un gène suppresseur de tumeur (GST) :
- Apoptose et cycle cellulaire (prolifération)
- Différenciation cellulaire (prolifération)
- Adhésion cellulaire (dissémination)
- Réparation de l'ADN (nouvelles anomalies)

Effets multiples si touche un facteur de transcription

... par effet de sélection
Réplication des génomes altérés en priorité (avantages sélectifs)
Dilution des anomalies silencieuses
Accumulation accélérée des anomalies dans ces génomes

Anomalies chromosomiques

1. Altérations du nombre de copies



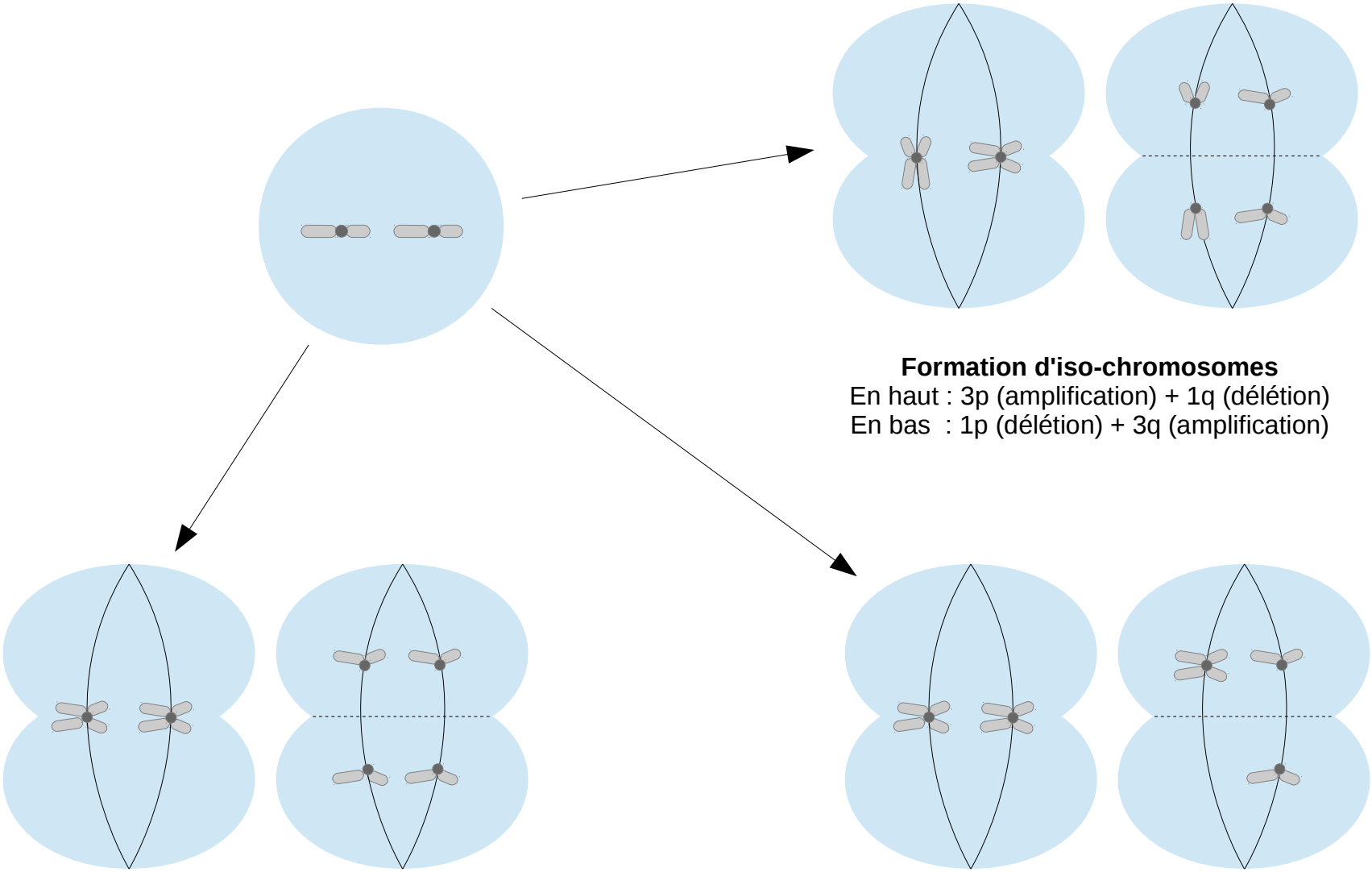
CC BY NC

1. Anomalies du nombre de copies

Sylvain Mareschal (novembre 2013) (cc) BY-NC

1.1. Mécanismes

1.1.1. Anomalies de mitose



Formation d'iso-chromosomes
En haut : 3p (amplification) + 1q (délétion)
En bas : 1p (délétion) + 3q (amplification)

Mitose normale
En haut : 2p + 2q
En bas : 2p + 2q

Gain / Perte de chromosome
En haut : 3p + 3q (amplification)
En bas : 1p + 1q (délétion)

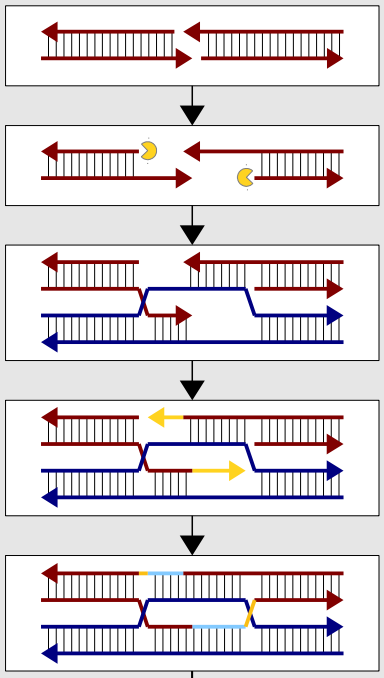
1. Anomalies du nombre de copies

Sylvain Mareschal (novembre 2013)
(cc) BY-NC

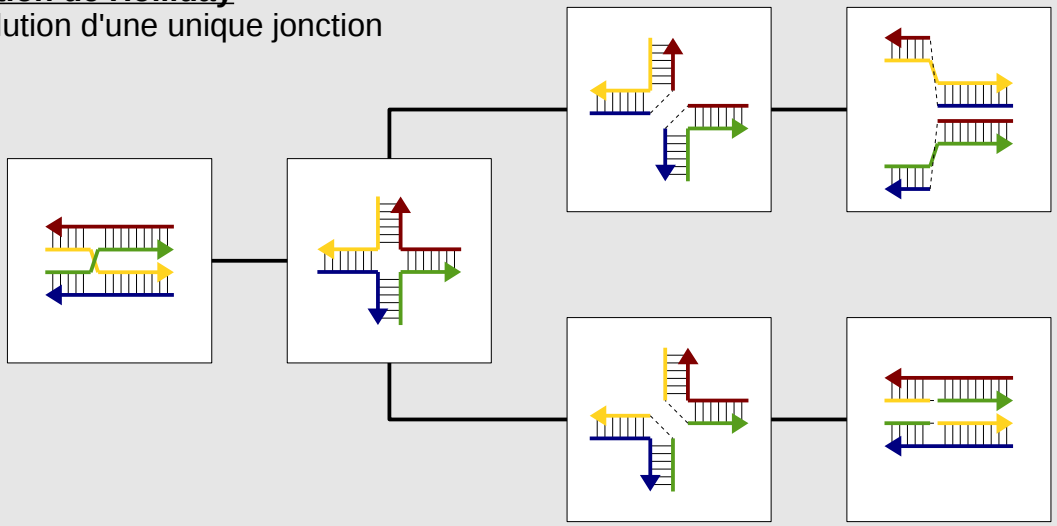
1.1. Mécanismes

1.1.2. Cassures et recombinaison

Crossing-over
Modèle "Double chain break repair"
Stahl et al. Genetics (1994)



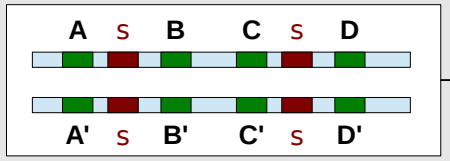
Jonction de Holliday
Résolution d'une unique jonction



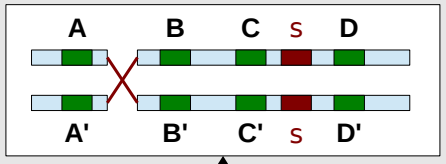
Résolution sans échange

Résolution avec échange

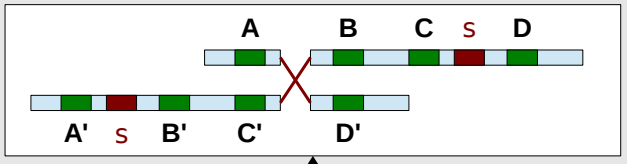
Crossing-overs inégaux
Entre 2 chromatides (mitose)
Entre 2 chromosomes homologues



échange d'allèles



délétion + amplification en tandem



Recombinaison non-homologue (translocations déséquilibrées)
Absence de réparation (délétions)

Sylvain Mareschal (novembre 2013) (cc) BY-NC

Syndrome Myelodysplasique (MDS)

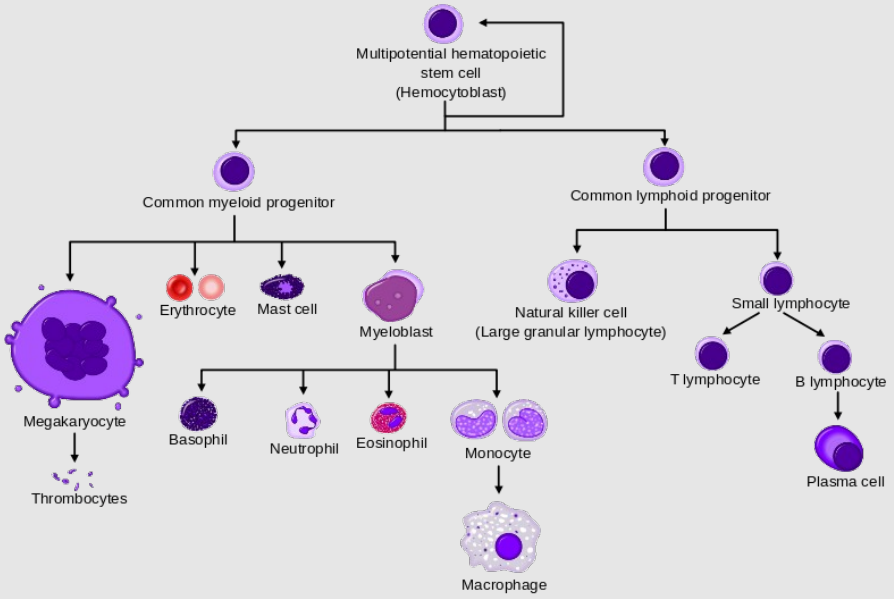
Lignée myeloïde

Hématopoïèse
Différenciation progressive (CSH > progéniteurs > ...)
Moelle osseuse + sites spécialisés (rate, thymus ...)

Globules rouges
Erythrocytes (globules rouges)

Une partie des globules blancs
Basophiles & Mastocytes (inflammation)
Neutrophiles (phagocytose)
Eosinophiles (anti-parasitaires)
Macrophages & Monoctes (phagocytose, présentation de l'AG)

Plaquettes



http://en.wikipedia.org/wiki/File:Hematopoiesis_simple.svg
Original by A. Rad, modified by Mikael Häggström (CC by-sa)

Dysplasie

Anomalies du développement
Cellules circulantes non différenciées (blastes)

Clinique

Cytopénie
Diminution d'un ou plusieurs types d'hématocytes :
- Anémie transfusion-dépendante généralement (fatigue)
- Neutropénie (infections opportunistes)
- Thrombocytopénie (troubles de la coagulation)

Epidémiologie

Age médian : 70 ans
Plus fréquent chez les hommes
Également induit par chimio et radio-thérapies

MDS	3 à 5 pour 100 000 personnes (USA 2003)
tous cancers	143 pour 100 000 personnes (USA 2008)

Pronostic très variable (selon anomalies observées)

Complications

Leucémie Aiguë Myeloblastique (AML)
Accumulation des altérations génomiques
Prolifération des cellules anormales dans la moelle
Cytopénie généralisée

WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (2008)

1. Anomalies du nombre de copies

Sylvain Mareschal (novembre 2013) (cc) BY-NC

1.2. Exemple : syndromes myelodysplasiques (MDS)

1.2.2. Anomalies récurrentes et diagnostique

+8	10 %
-7 / del(7q)	10 %
-5 / del(5q)	10 %
del(20q)	5-8 %
-Y	5 %
-13 / del(13q)	3 %
del(11q)	3 %
del(12p)	3 %
del(9q)	1-2 %

WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues, p93 (2008)

+ Anatomo-pathologie
smear sang ou moelle osseuse

lourd, faux négatifs

+ Clinique
cytopénie (anémie surtout)

Syndrome Myelodysplasique (MDS)

"+8" <u>participe</u> au diagnostique
90 % des MDS sans (50 % des MDS induites par la chimio-thérapie)
Également observée dans d'autres leucémies
Simple à observer [cf §1.2.3]

Effets méconnus
Nombreux gènes cibles (MYC, MOS ...)
Anomalie secondaire plus visible ?

"-7" <u>pose</u> le diagnostique
En présence de signes cliniques (cytopénie), même sans indice morphologique
Simple à observer (caryotype de routine, QMPSF ci)

Sous-typage tumoral
Combinaison d'anomalies définit un phénotype

1. Anomalies du nombre de copies

Sylvain Mareschal (novembre 2013) (cc) BY-NC

1.2. Exemple : syndromes myelodysplasiques (MDS)

1.2.3. Mise en évidence d'une trisomie 8 par G-banding

Culture cellulaire (sang, moelle, biopsie …)

Arrêt de la mitose en métaphase (colchicine)

Filtration et fixation

Étalement sur lames de verre

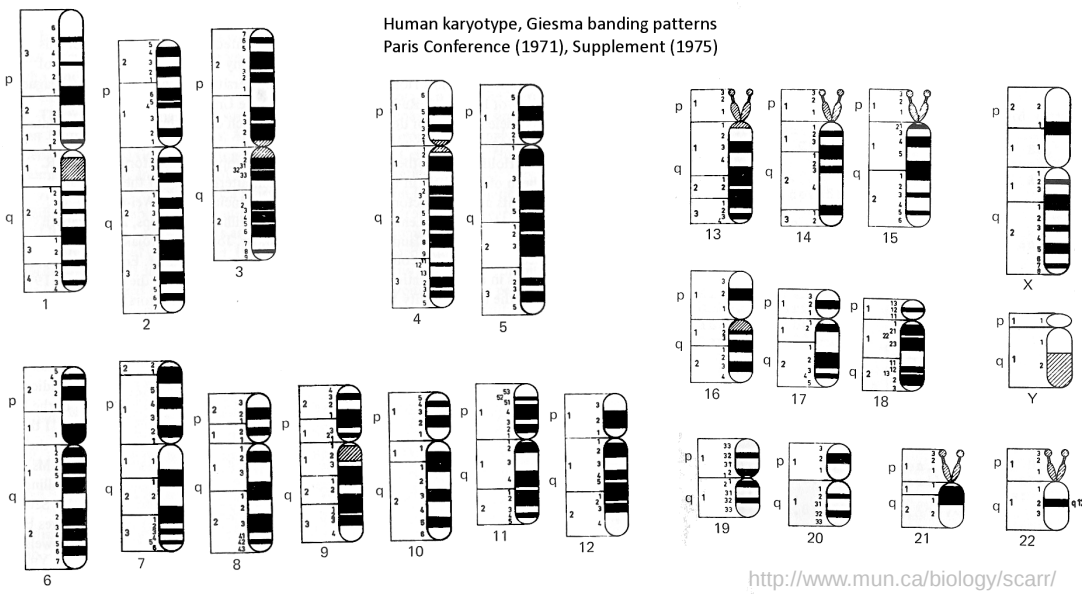
Coloration (Quinacrine, Giemsa)

Observation au microscope

Identification par taille et bandes

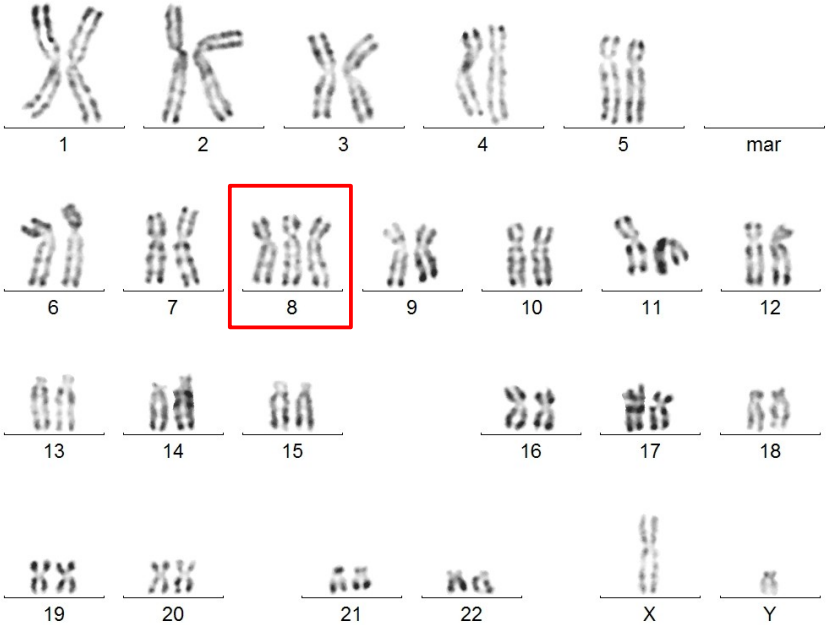
Recherche d'anomalies

Formule sur 20 mitoses
48,XY,<2n>,+8 [20]



http://www.mun.ca/biology/scarr/

Centre Henri Becquerel



Centre Henri Becquerel

1. Anomalies du nombre de copies

Sylvain Mareschal (novembre 2013)
BY-NC

1.2. Exemple : syndromes myelodysplasiques (MDS)

1.2.4. Mise en évidence d'une monosomie 7 par QMPSF

Quantitative MultiPlex PCR of Short fluorescent Fragments (QMPSF)

PCR quantitative

Amplification d'ADN à partir d'un couple de primers fluorescents

```
←ATCGATCGATCGACTTTGCGAGATCGATGC...
...TAGCTAGCTAGCTGAAACGCTCTAGCTACG→
```

```
        GCTAGC→
←ATCGATCGATCGACTTTGCGAGATCGATGC...

...TAGCTAGCTAGCTGAAACGCTCTAGCTACG→
                        ←ATCGAT
```

```
        GCTAGCTAGCTGAAACGCTCTAGCTACG→
←ATCGATCGATCGACTTTGCGAGATCGATGC...

...TAGCTAGCTAGCTGAAACGCTCTAGCTACG→
←ATCGATCGATCGACTTTGCGAGATCGAT
```

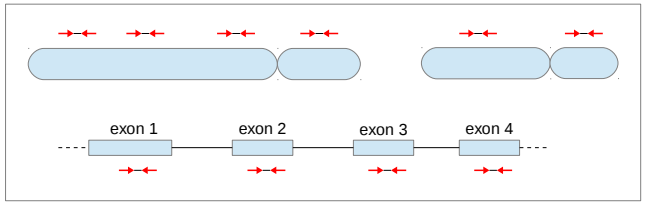
```
        CGATCGATCGACTTTGCGAGATCGAT
        GCTAGCTAGCTGAAACGCTCTAGCTACG→

        GCTAGCTAGCTGAAACGCTCTAGCTACG→
←ATCGATCGATCGACTTTGCGAGATCGATGC...

←ATCGATCGATCGACTTTGCGAGATCGAT
...TAGCTAGCTAGCTGAAACGCTCTAGCTACG→

        GCTAGCTAGCTGAAACGCTCTAGCTA
←ATCGATCGATCGACTTTGCGAGATCGAT
```

Mesure de fluorescence après un nombre de cycles fixe

Multiplex

PCR limitée en taille (~500 pb)

Sélection de sites ponctuels répartis sur la cible

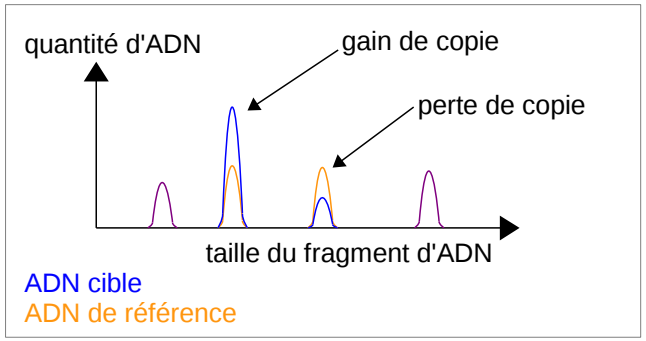


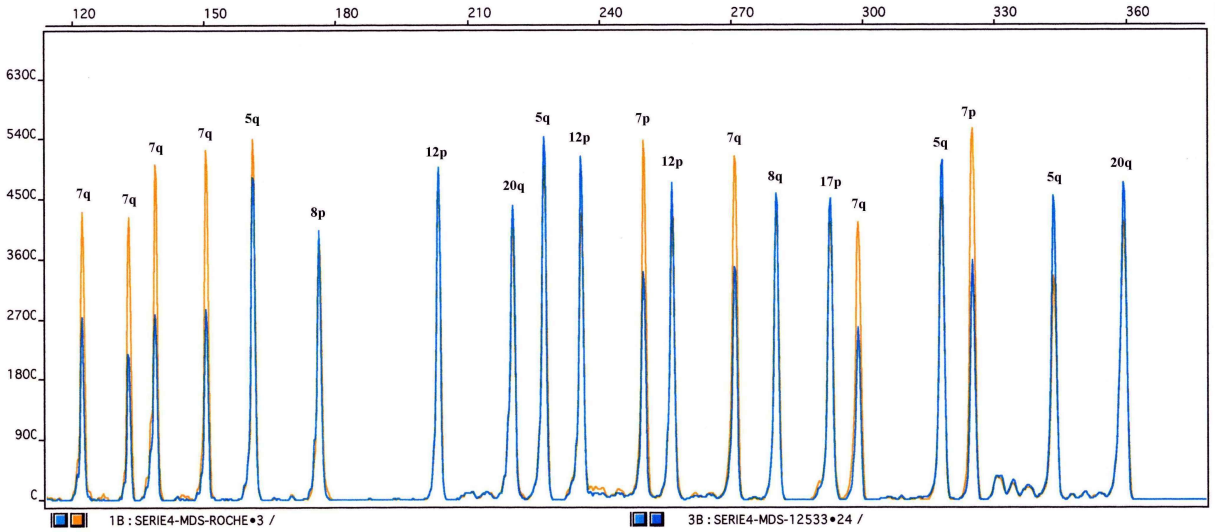
Analyse de fragments

Electrophorèse électronique

Comparaison avec un ADN de référence

Normalisation sur des loci de référence





Sylvain Mareschal (novembre 2013) (cc) BY-NC

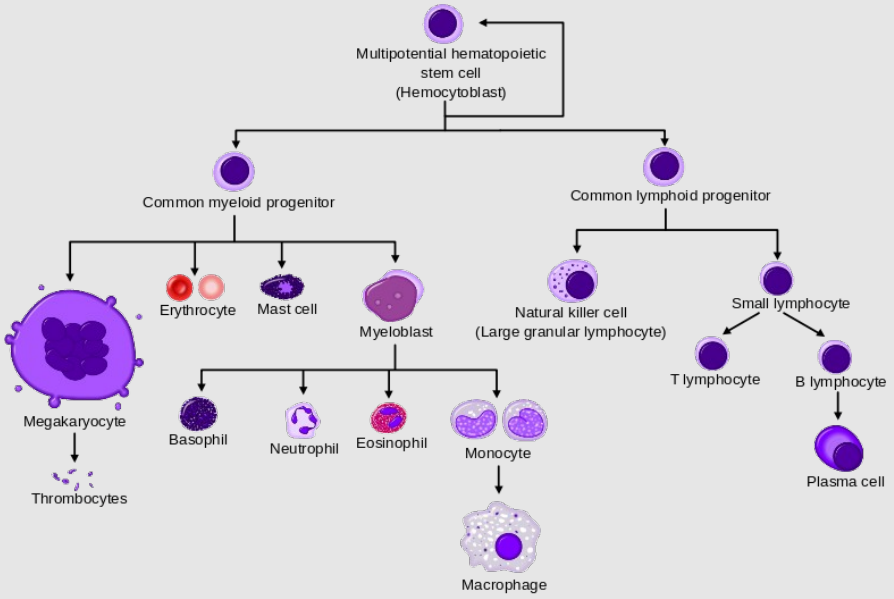
Lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL)

Lignée lymphoïde

Cellules de l'immunité innée
Lymphocytes NK (cyto-toxicité)

Cellules de l'immunité acquise
Lymphocytes B (production d'anti-corps)
Lymphocytes T (cyto-toxicité, régulation)

Sous-typage par profilage transcriptomique
Alizadeh et al, Nature (2000)
Activated B Cell like (ABC)
Germinal Center B cell like (GCB)



http://en.wikipedia.org/wiki/File:Hematopoiesis_simple.svg
Original by A. Rad, modified by Mikael Häggström (CC by-sa)

Formation de tumeurs

Accumulation de cellules
Cellules immortalisées, forte prolifération

Étiologie incertaine

Clinique

Masse(s) tumorale(s)
Généralement issue d'un ganglion lymphatique

Peu de symptômes

Epidémiologie

Age median > 70 ans, mais des jeunes également
Favorisé par une immuno-dépression (SIDA)
25 à 30 % des lymphomes non-hodgkiniens

DLBCL	7,5 pour 100 000 personnes (USA 2013)
tous cancers	143 pour 100 000 personnes (USA 2008)

survie à 5 ans ~ 60% pour les GCB, 35% pour les ABC

Transformations

Lymphomes folliculaires
Lymphomes indolents pouvant se transformer en DLBCL (GCB)
Traitements efficaces, mais rechutes fréquentes
Translocation t(14;18) dans 80 % des cas

WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (2008)

1. Anomalies du nombre de copies

Sylvain Mareschal (novembre 2013) (cc) BY-NC

1.3. Exemple : lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL)

1.3.2. Mise en évidence d'une amplification de BCL6 par FISH en interphase

Cellules fixées sur lame de verre
interphase = phase la plus fréquente du cycle

Mise en évidence des noyaux
DAPI

Hybridation de sondes fluorescentes
BAC (10^5 bp) ou FOSMID (10^4 bp)

Observation au microscope à fluorescence

Recherche d'anomalies
Translocations, inversions ... [cf §3]
Anomalies du nombre de copies

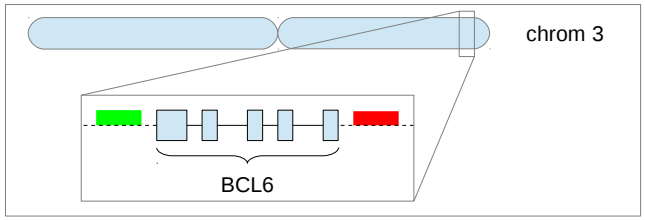
Voir visite CHB

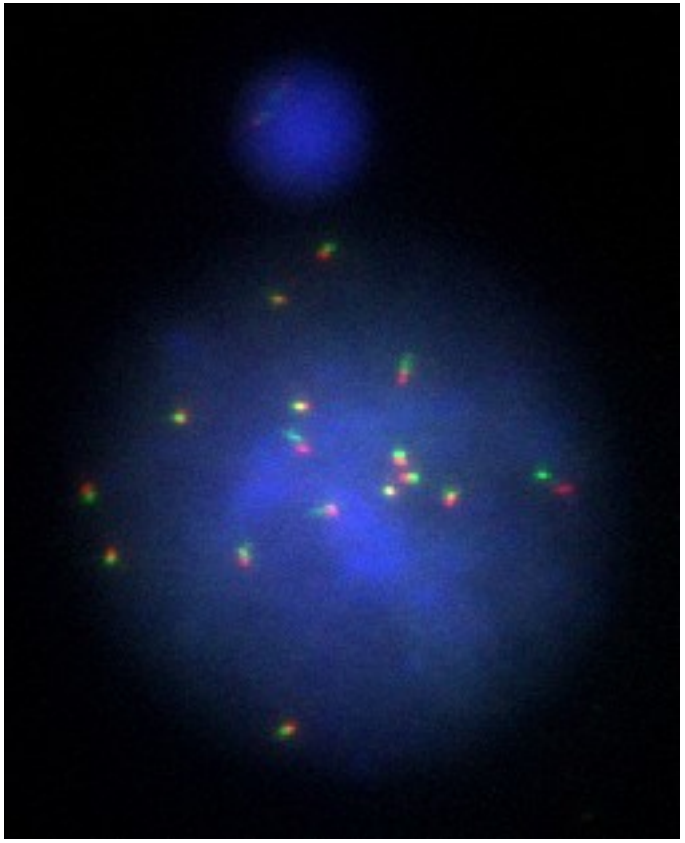
BCL6 : B-Cell Lymphoma protein #6
Facteur de transcription (répresseur)

Inhibiteur d'apoptose
Lymphocytes B activés :
- Hyper-Mutation Somatique (SHM)
- Changement de classe d'Ig (recombinaison)

Événements détectés par TP53

Fréquemment transloquée
Translocations dans 40% des DLBCL
Partenaires multiples, sondes « break apart »





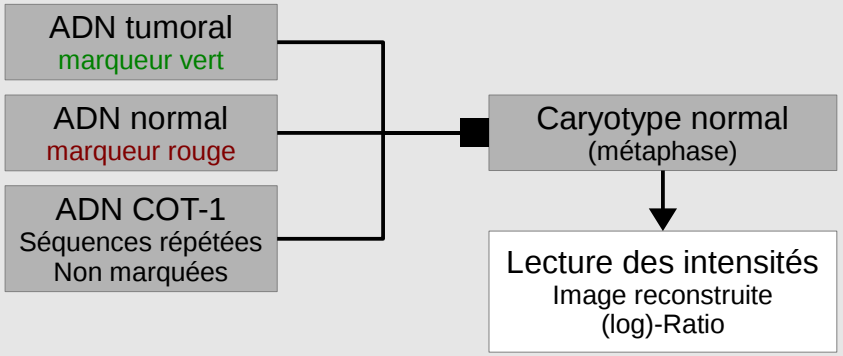
1. Anomalies du nombre de copies

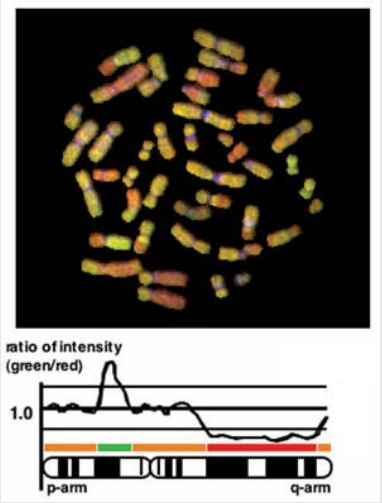
Sylvain Mareschal (novembre 2013) (cc) BY-NC

1.3. Exemple : lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL)

1.3.3. Mise en évidence d'une délétion de CDKN2A par CGH-array [1]

Comparative Genomic Hybridization (CGH)
Technique historique





http://www.aist.go.jp

Kallioniemi et al. (1992)
Science. Oct 30;258(5083):818-21.
Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors.

Hybridation compétitive
Avantage contre les polymorphismes

Résultats visuels et numériques
Régions à dominante verte ou rouge
Calcul des log-ratios

Pas de culture cellulaire
Avantage pour les tumeurs solides
Plus fidèle à la réalité

CGH-array

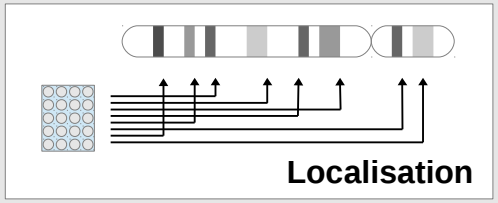
Fragmentation du génome
Enzymes de restriction
Sonication

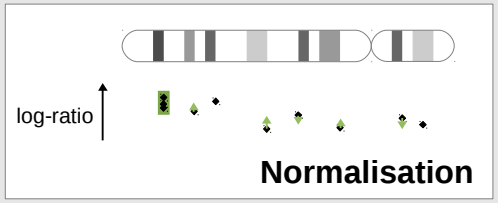
Hybridations compétitives
Un ADN cible (vert)
Un ADN référence (rouge)
Compétition par sonde

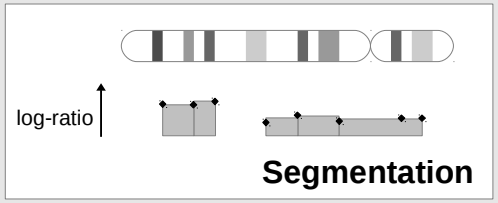
Localement sur le génome
Historiquement BAC (10^3)
60-mer généralement (10^6)
Répartis sur la cible :
- génome complet
- région d'intérêt

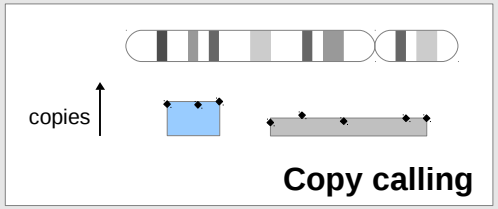
Deux scans successifs
Fluorescences verte et rouge
Sondes de position
Sondes contrôle (QC)

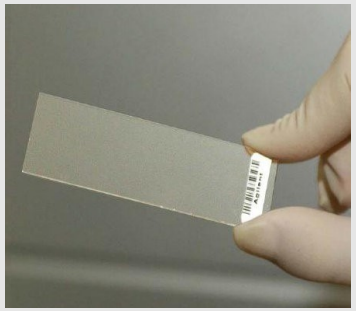
Calcul des log-ratios
$M = \log_2(F_{vert} / F_{rouge})$
$M > 0$: amplification
$M < 0$: délétion

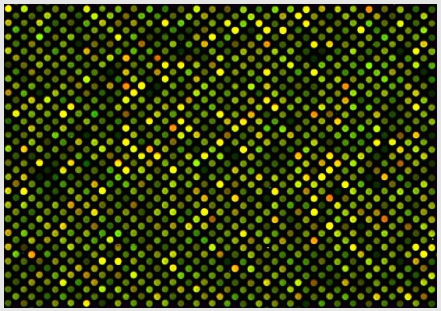












1. Anomalies du nombre de copies

Sylvain Mareschal (novembre 2013) BY-NC

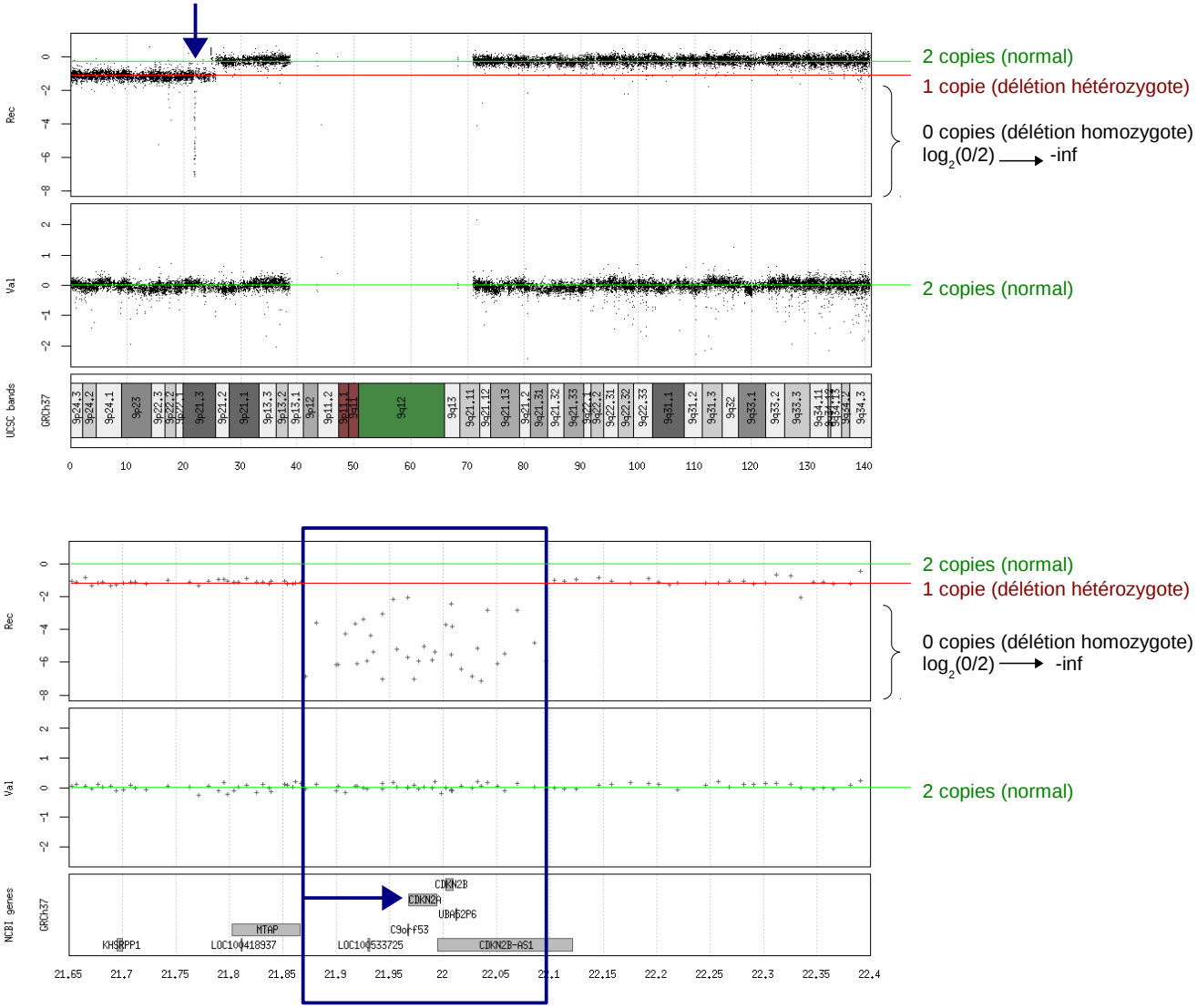
1.3. Exemple : lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL)

1.3.3. Mise en évidence d'une délétion de CDKN2A par CGH-array [2]

CDKN2A : Cyclin-Dependant KiNase #2A

Suppresseur de tumeur
Plusieurs transcrits :
- inhibition de CDK4 (cycle cellulaire)
- stabilisation de TP53 (apoptose)

Fréquemment délété
DLBCL : 30% des ABC, 5% des GCB
Autres tumeurs également



1. Anomalies du nombre de copies

1.4. CNV-seq

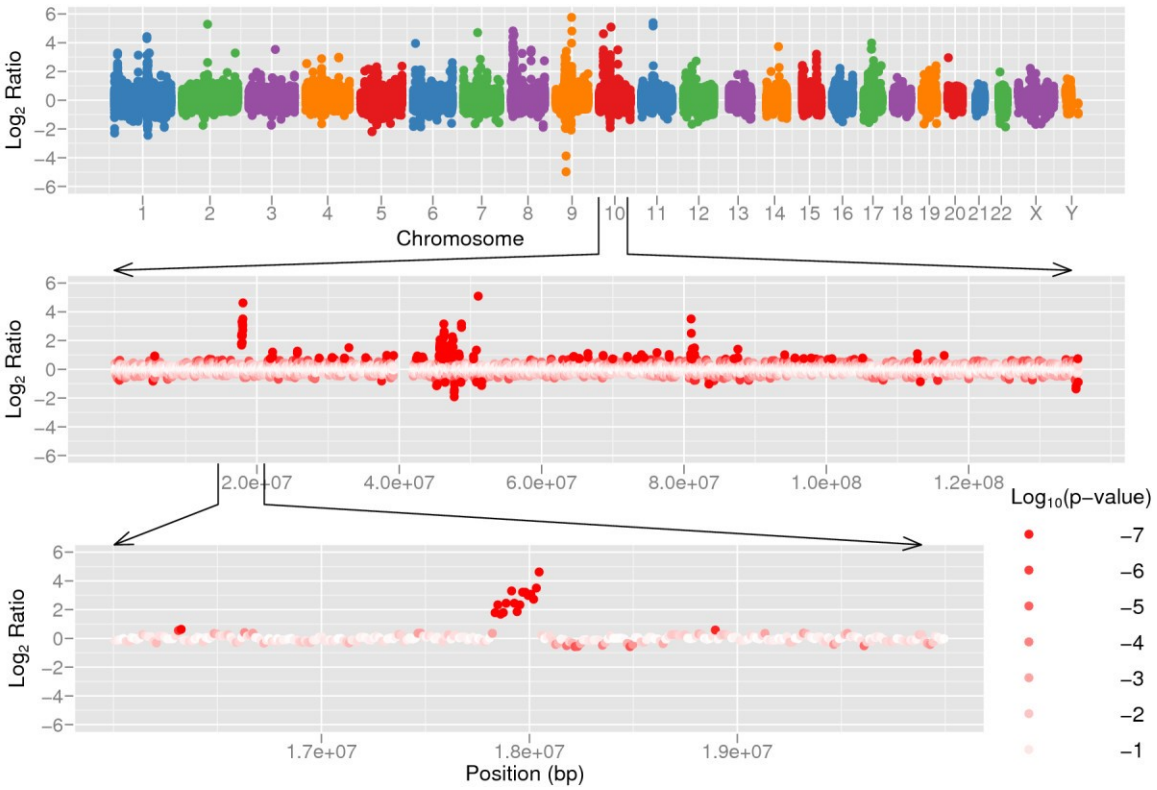
Sylvain Mareschal (novembre 2013)
(cc) BY-NC

CNV-seq
Xie & Tammi (2009) BMC Bioinformatics. Mar 6;10:80
CNV-seq, a new method to detect copy number variation using high-throughput sequencing.

Séquençage
Échantillon cible
Échantillon de référence
Alignement des *reads*

Calcul du log-ratio
Fenêtre glissante le long du génome
Nombre de *reads* cible / référence

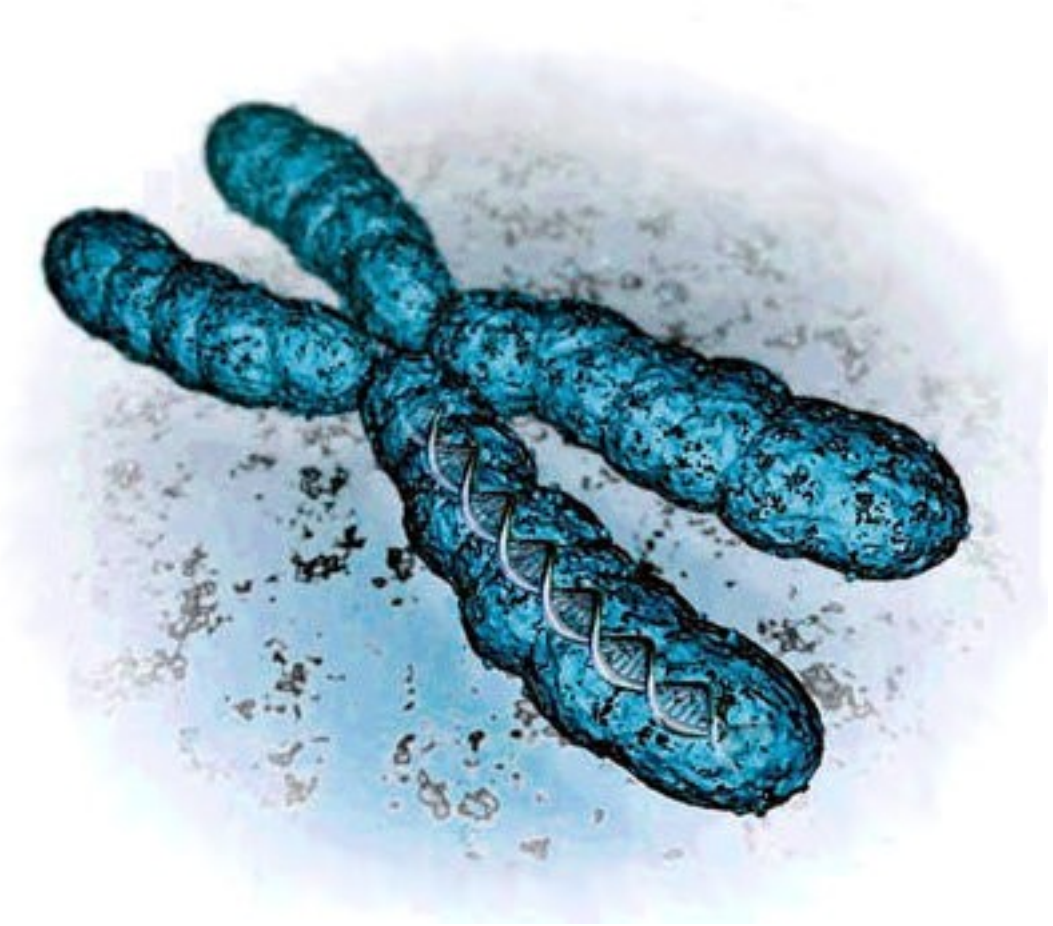
Choix d'une fenêtre optimale
Fixe la précision (r=0.6, 15 / 10 copies)
Fixe la significativité (alpha)
Dépend de la profondeur



Xie & Tammi 2009

Anomalies chromosomiques

2. Pertes d'hétérozygotie



CC BY NC

2. Pertes d'hétérozygotie

2.1. Disomie Uni-Parentale (UPD)

2.1.1. Isodisomie

Sylvain Mareschal (novembre 2013)
(cc) BY-NC

Isodisomie

Robinson, Bioessays (2000)
Mechanisms leading to uniparental disomy and their clinical consequences.

Définition
UPD : perte d'hétérozygotie sans perte de copie
Isodisomie : 2 chromosomes identiques

A. Compensation
Duplication du chromosome restant après une perte

B. Recombinaison homologue
Crossing-over durant la mitose = régions en situation d'isodisomie

Hypothèse « two-hits »

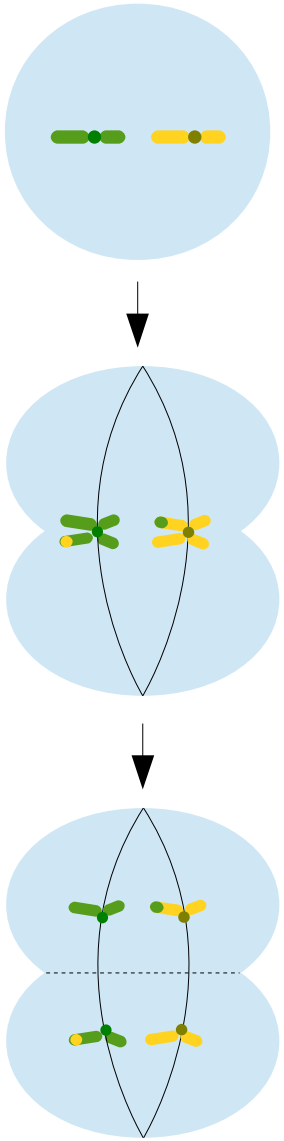
Corrolaire à « l'hypothèse de Knudson »
Une anomalie ponctuelle touche un seul chromosome
Inactivation d'un GST : 2 versions à inactiver (récessivité)
UPD : extension d'une mutation au 2eme allèle
Note : une délétion donnera le même résultat

JAK2 et MPD

Syndromes Myelo-prolifératifs (MPD)
Excès d'hématocytes (≠ MDS)

JAK 2 : Janus Kinase #2
Kinase : ajout d'un phosphate (transmission du signal)
Cascade de réponse à l'erythropoiétine (EPO), THPO, IL3 ...

JAK2 V617F
Activation permanente de la cascade
~90% des Polycythaemia Vera
~50% des Primary MyeloFibrosis et Essential Thrombocythaemia



2. Pertes d'hétérozygotie

2.1. Disomie Uni-Parentale (UPD)

2.1.2. Hétérodisomie

Hétérodisomie

Robinson, Bioessays (2000)
Mechanisms leading to uniparental disomy and their clinical consequences.

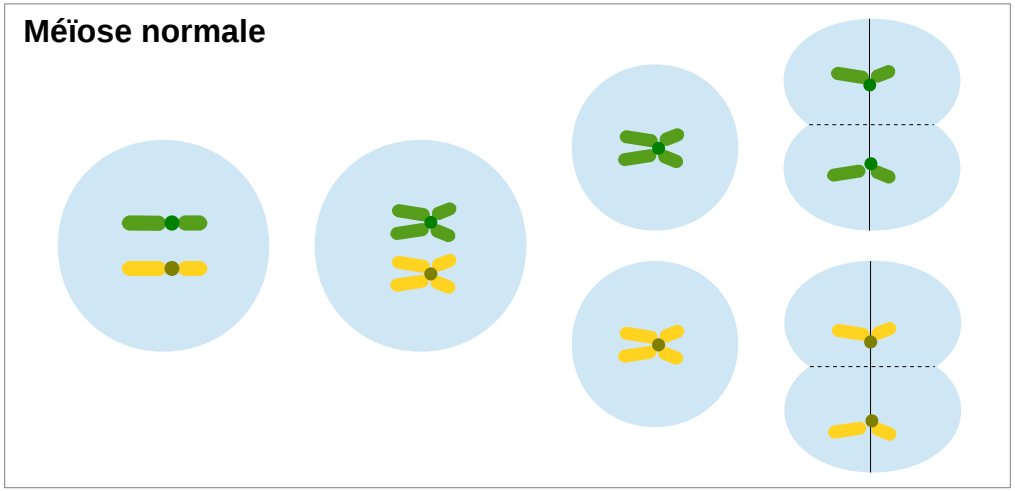
Définition
2 chromosomes homologues issus du même parent

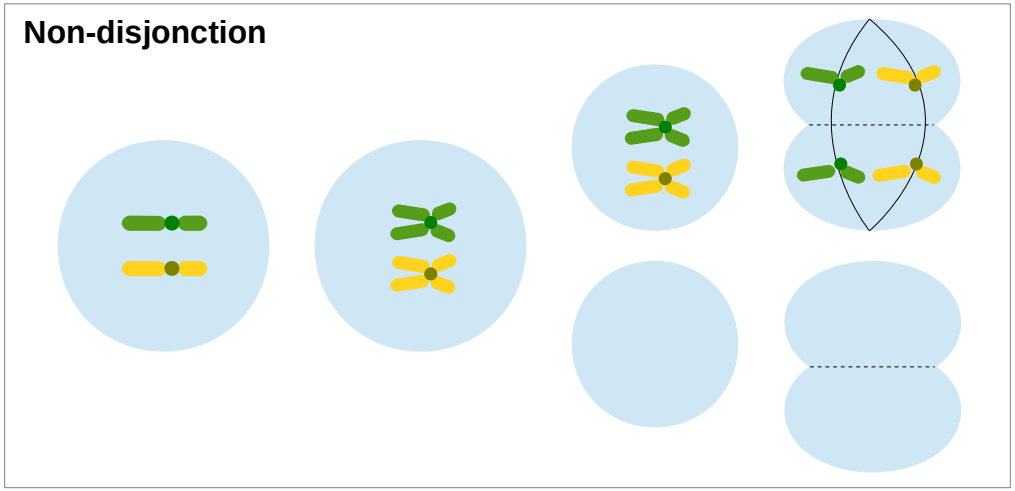
A. Anomalie de méïose
Non-disjonction durant la méïose
Fécondation complémentaire (2 + 0)

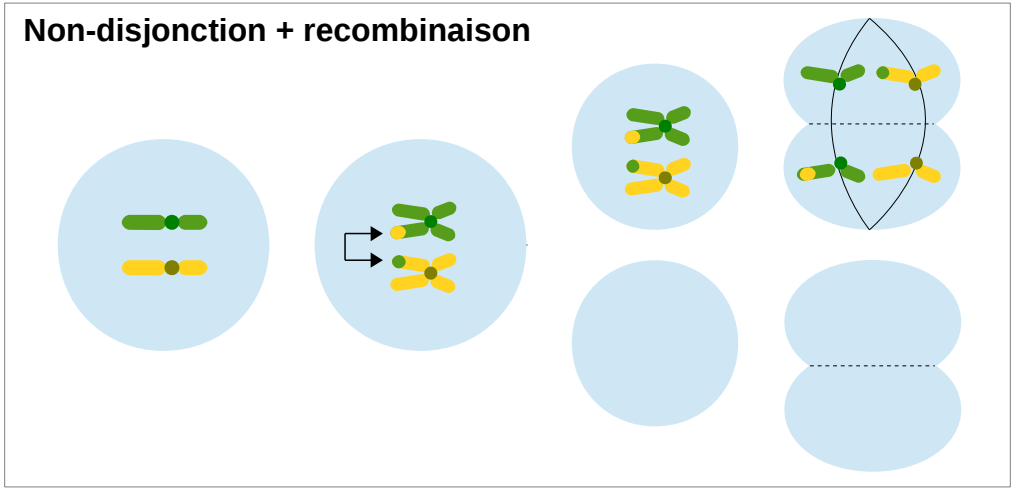
B. Trisomie mal résolue
Avortement spontané si non résolue
Perte aléatoire d'un des 3 chromosomes

Mosaïcisme chromosomique
Non-disjonction + crossing-over
= (hétéro + iso) disomies

Effets peu étudiés
Régulation transcriptomique par effet d'empreinte







(cc) BY-NC
Sylvain Mareschal (novembre 2013)

2. Pertes d'hétérozygotie

Sylvain Mareschal (novembre 2013) (cc) BY-NC

2.2. Mise en évidence

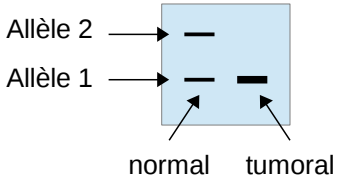
2.2.1. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Objectif : différencier les deux allèles
Cas normal : un allèle de chaque parent
Recherche d'un polymorphisme variant entre les parents

Enzymes de restriction
Endonucléases, coupent les deux brins d'ADN
Sites de restriction fixes (4 à 8 bp, fréquence ~ 4^n bp)
Nombreuses enzymes disponibles

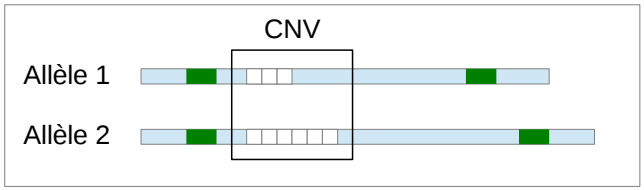
Southern blot
Hybridation d'une sonde complémentaire marquée
Marquage radioactif historiquement
Migration sur gel

Analyse comparative
Même locus sur ADN normal et tumoral

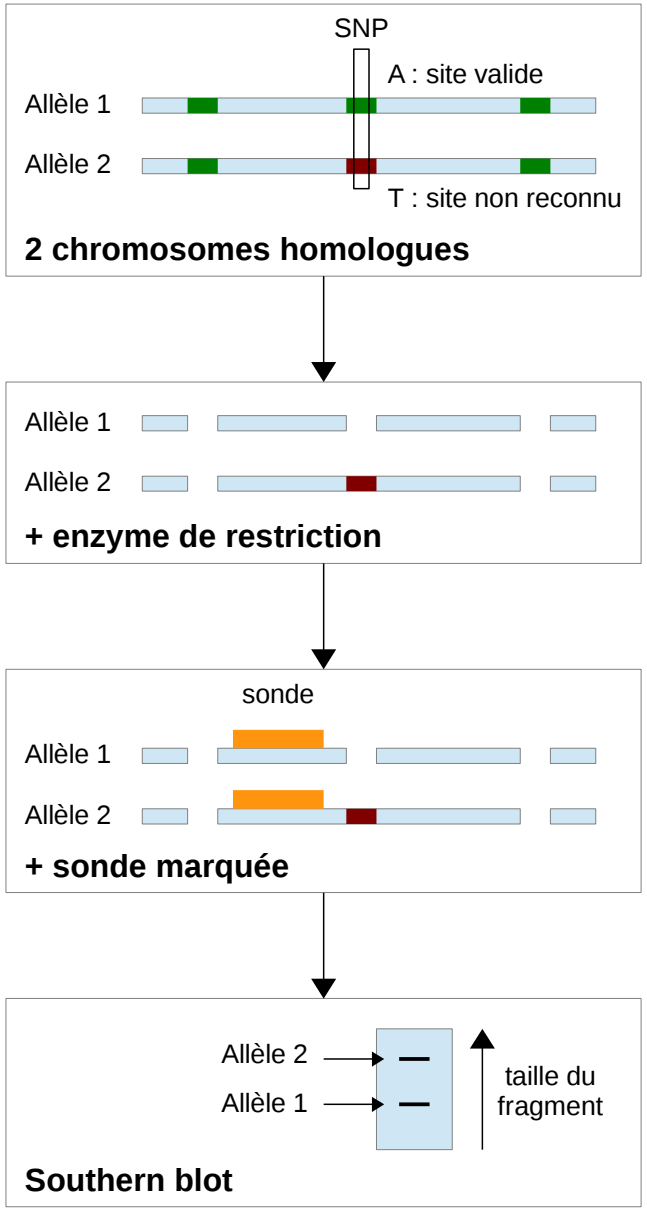


Conclusion pour un locus

Variante : CNV
Utilisation d'une répétition en tandem ou d'une délétion



Evolution : PCR
Utilisation de primers choisis plutôt que sites de restriction
Plus besoin de marquage spécifique (BEt)



2. Pertes d'hétérozygotie

2.2. Mise en évidence

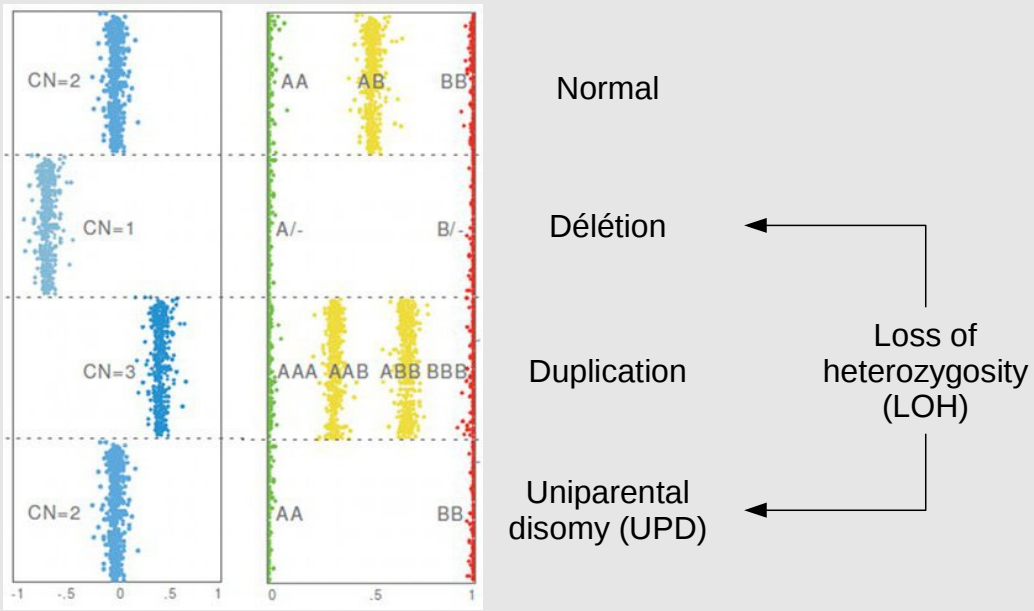
2.2.2. SNP-array

Sylvain Mareschal (novembre 2013)
(cc) BY-NC

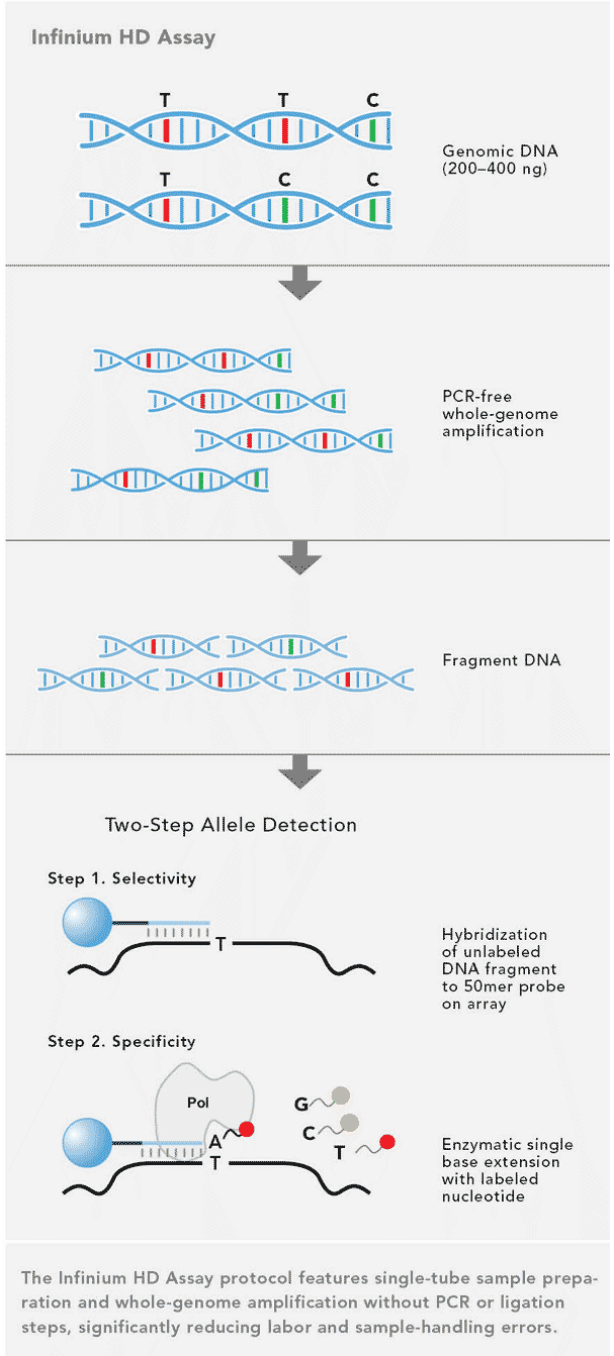
Génotypage haut débit
HumanOmni illumina 1 à 5 10^6 SNP

Un fluorochrome par allèle
Un échantillon par puce
Exemple *illumina Infinium*

Résultats plus complets
Single Nucleotide Polymorphisms
Copy Number Variations
Uniparental disomies



http://www.hmds.info/Content/DiagMethods/Techniques/SNParray/SNParray.aspx



http://www.illumina.com/technology/infinium_hd_assay.ilmn