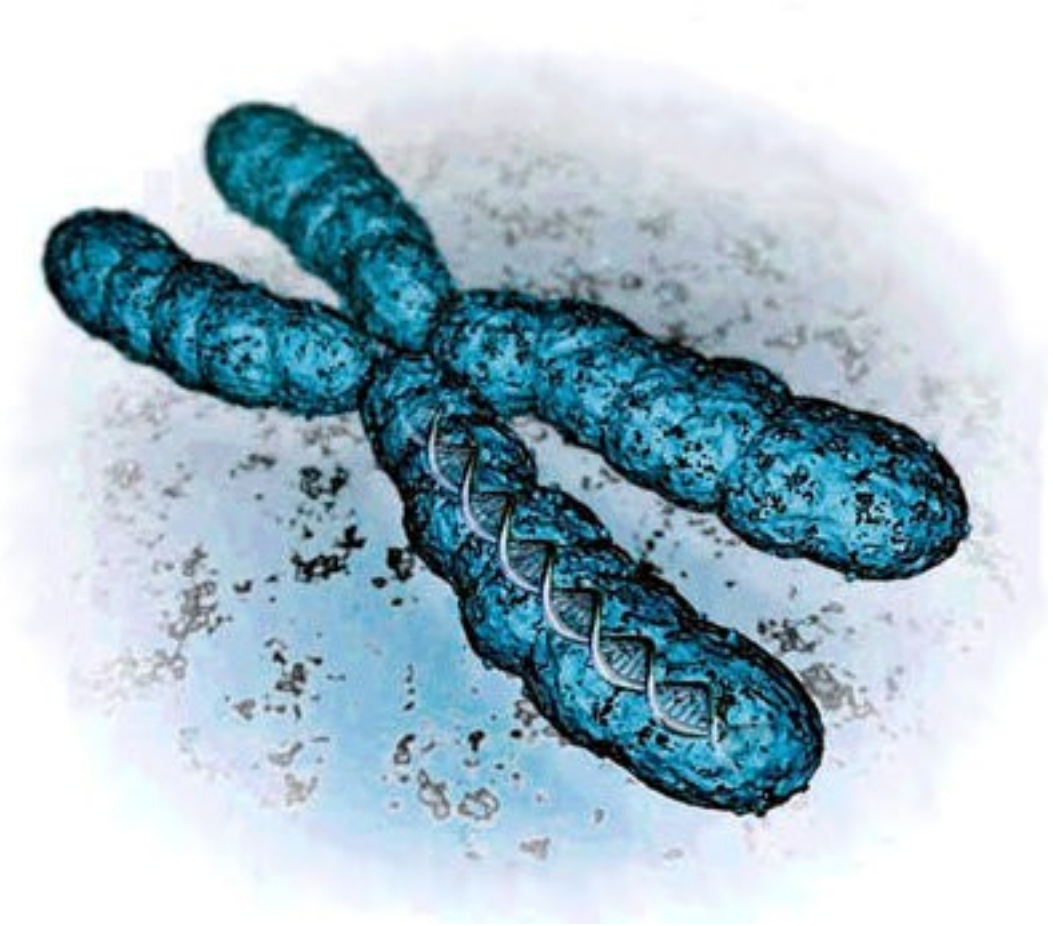
Anomalies chromosomiques

3. Translocations



CC BY NC

3. Translocations

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

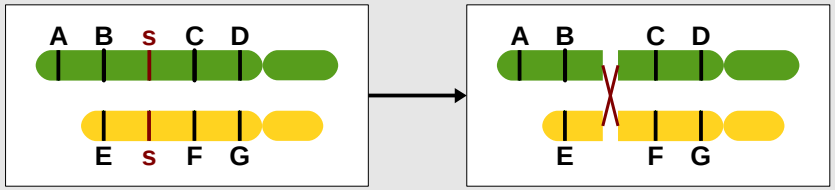
3.1. Mécanismes : cassures et recombinaison

Crossing-overs

Voir cours sur les altérations du nombre de copies

Recombinaison non-homologue

Entre 2 chromatides de 2 chromosomes différents
Durant la mitose (somatique) ou la méïose (constitutionnel)

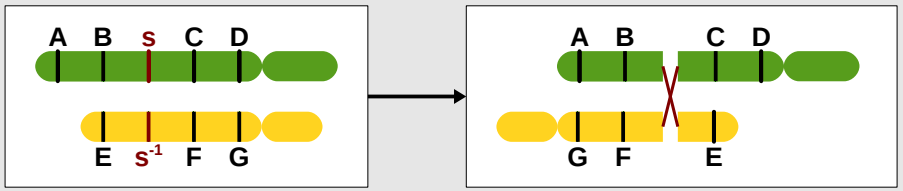


Translocation déséquilibrée

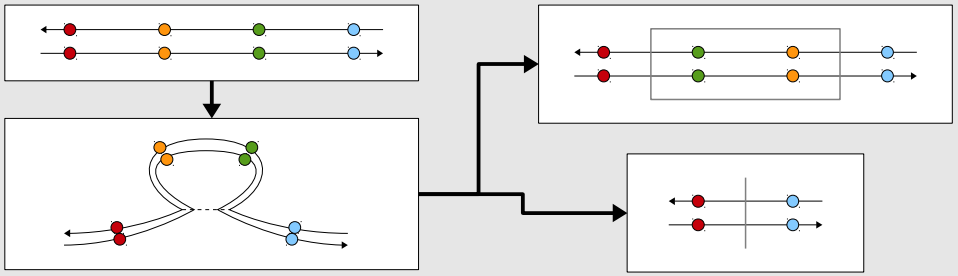
Crossing-over équilibré en théorie
Second événement :
- méïose et fécondation
- perte d'un des deux chromosomes réarrangés

Inversions

Translocation inversée



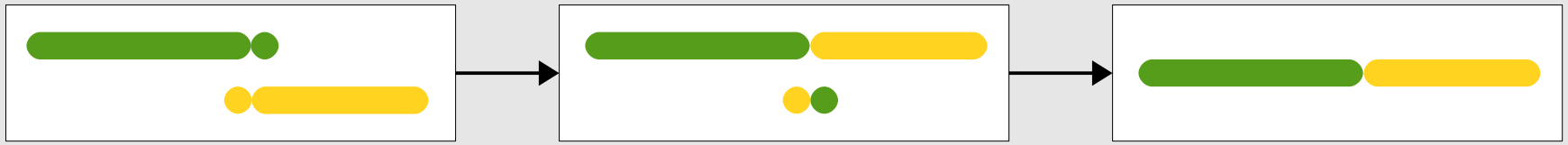
Auto-recombinaison



Translocation de Robertson

Définition

Translocation centromérique
Implique 2 chromosomes acrocentriques (13, 14, 15, 21, 22, Y)



Translocation déséquilibrée

Le chromosome issu des bras courts est rapidement perdu

Génomique constitutionnelle

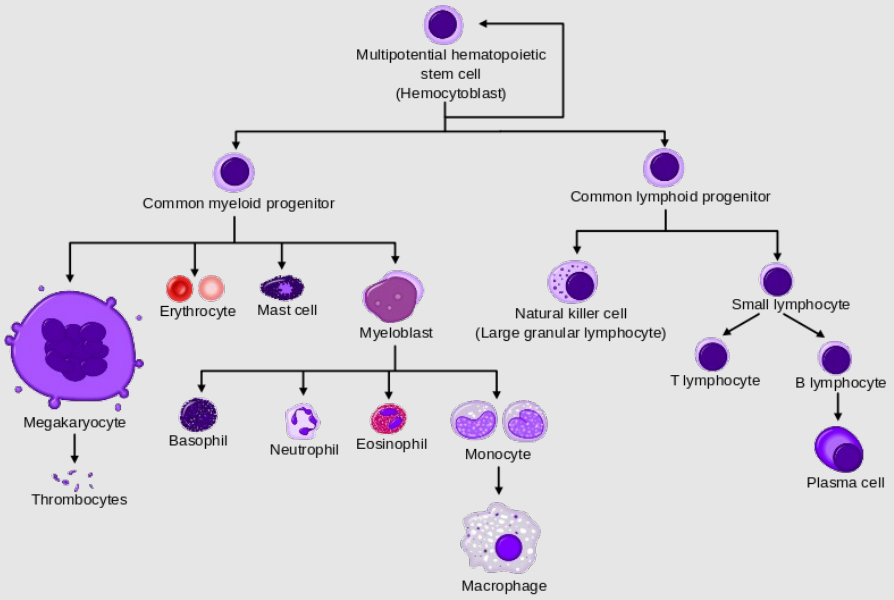
Phénomène à l'origine de trisomies chez la descendance

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

Leucémie Myeloïde Chronique (CML)

Deux lignées

Cellule Souche Hématopoïétique
Lignée meyloïde majoritairement (~70%)



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

Epidémiologie

Age median : 60 ans

CML	1 à 2 pour 100 000 personnes (USA 2003)
tous cancers	143 pour 100 000 personnes (USA 2008)
Sans traitement	survie médiane de 2 à 3 ans
Depuis le Glivec	survie à 5 ans ~ 90%

Phase chronique (CP)

Leucocytose
Neutrophiles, basophiles, eosinophiles
Quantités élevées de cellules normales (sang et moelle)
Modérée, asymptomatique dans 30% des cas

Splénomégalie

Phase accélérée (AP)

Aggravation des symptômes
Critères de numération
Annonce la phase blastique

Clonalité
Apparition de clones dominants

Phase blastique (BP)

Envahissement de blastes
Apparition de cellules non-différenciées

Envahissement extra-médullaire
Ossature, peau, système nerveux central

Progression rapide

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

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

Chromosome de Philadelphie

1845 : description clinique de la LMC
Dr David Craigie, Edinburgh Medical and Surgical Journal

1960 : un nouveau chromosome (Ph1)
Confusion avec le chromosome 21 (Syndrome de Down)
Novell & Rutherford (1960) Science 132, 1497
A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia.

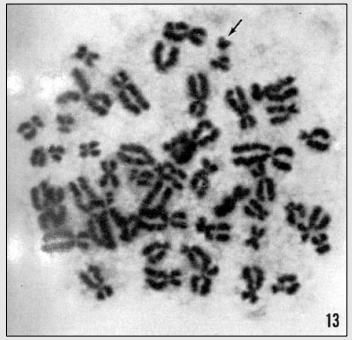
197- : chromosome banding
Q-banding (1970), G-banding (1971) ...
Identification du chromosome 22

1973 : translocation 9;22
J Rowley (1973) Nature 243, 290
Translocation réciproque

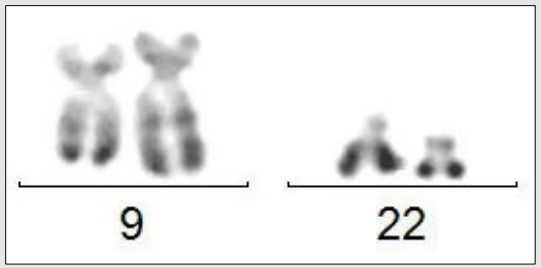
1982 : ABL
De Klein (1982) Nature 300, 765

1984 : BCR
Grofen (1984) Cell 36, 93

1993 : développement de l'imatinib
1998 : premiers tests cliniques du Glivec



Novell & Rutherford (1960)



Centre Henri Becquerel

Gaery (2000) BJH 110, 2 - *The story of chronic myeloid leukaemia*

Translocation 9:22 (BCR-ABL1)

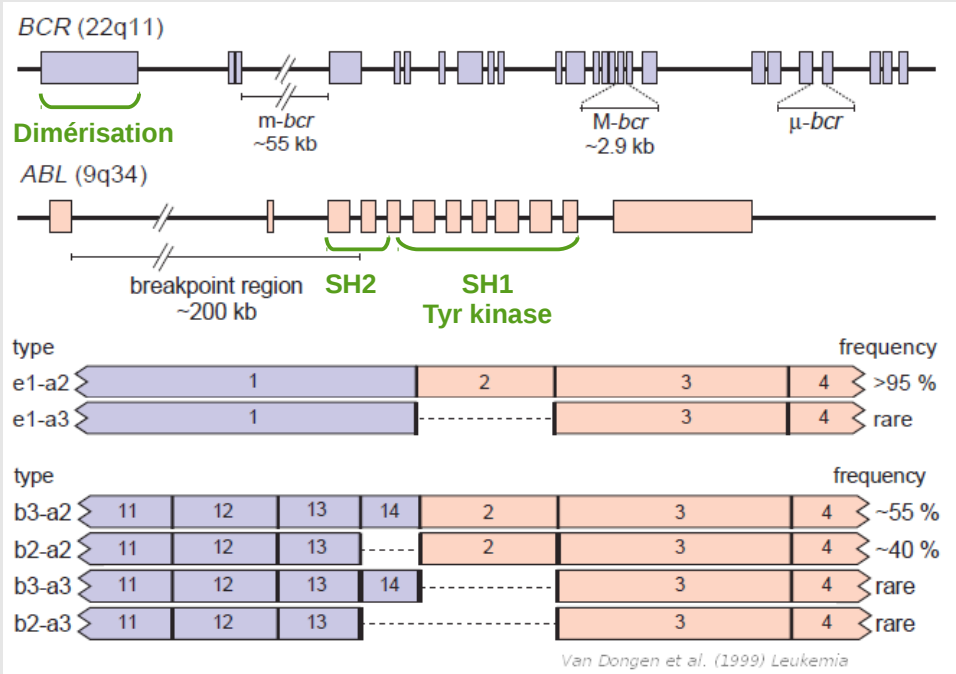
90 % des LMC, outil diagnostique [cf 3.2.5]

BCR : Breakpoint Cluster Region
Kinase, rôle inconnu

ABL1 : Abelson's oncogene #1
Kinase, division / différenciation cellulaire, réparation de l'ADN ...

Fusion BCR-ABL1
Dimérisation grâce à l'exon 1 de BCR
Auto-phosphorylation par le domaine SH1
Activation permanente de la cascade

Cible thérapeutique
Développement de l'imatinib par criblage



3. Translocations

Sylvain Mareschal (novembre 2013) BY-NC

3.2. Exemple : t(9;22) dans les LMC

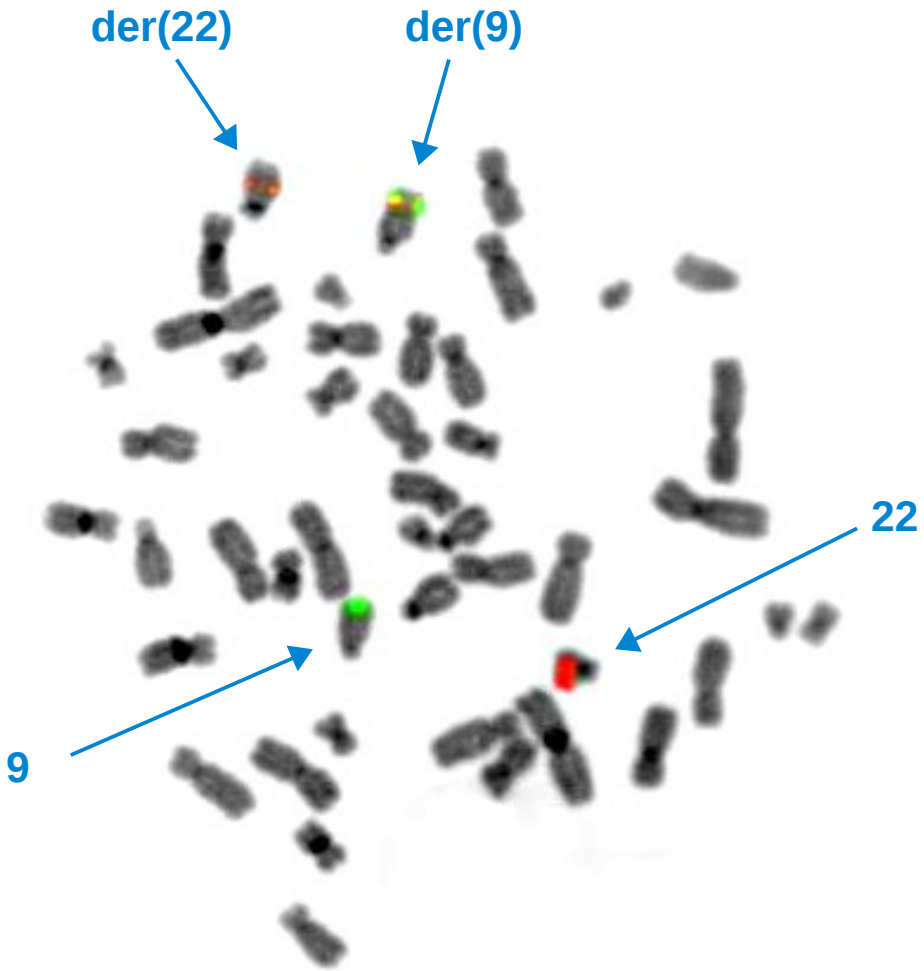
3.2.3. Mise en évidence par FISH en métaphase

Caryotype conventionnel
Culture cellulaire, bloquage en métaphase

Sondes fluorescentes
BCR en rouge
ABL en vert

Différence avec l'interphase

– culture cellulaire
+ identification du chromosome hôte



3. Translocations

3.2. Exemple : t(9;22) dans les LMC

3.2.4. Au delà de la FISH en métaphase : FISH multiplex

Caryotype conventionnel
Culture cellulaire, bloquage en métaphase

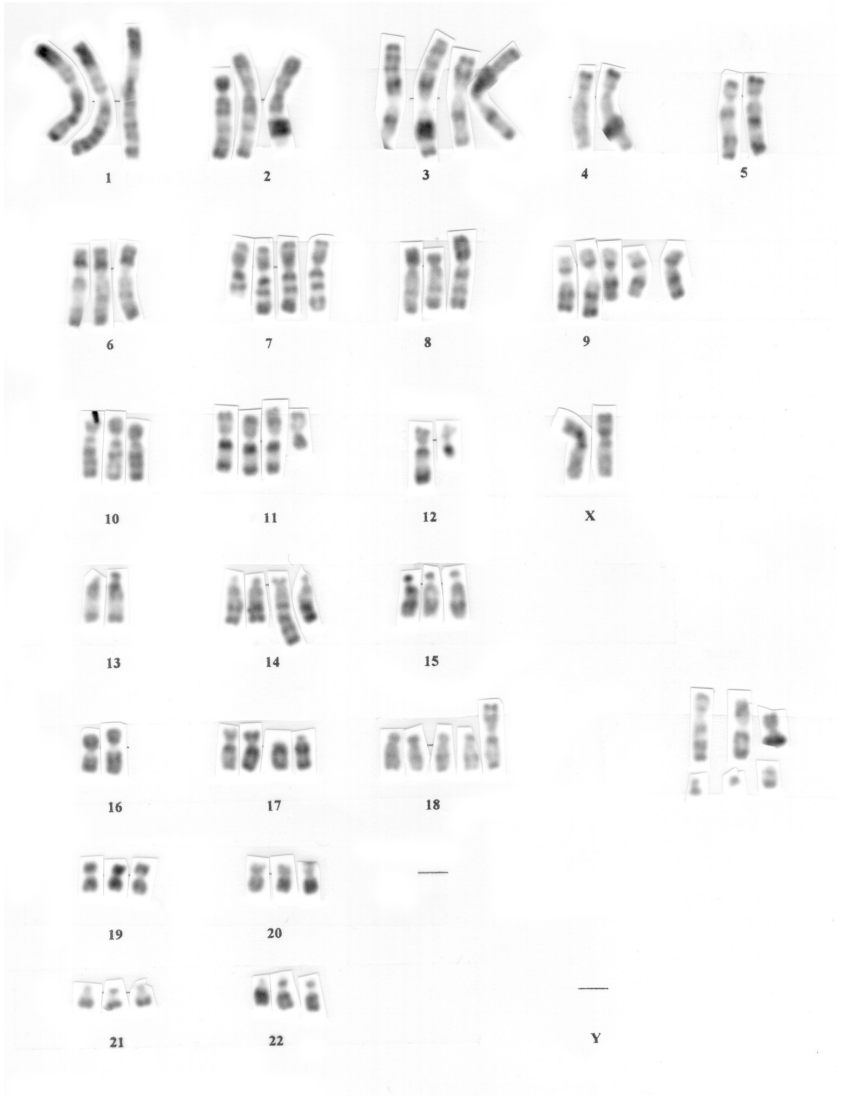
Mélange de Sondes fluorescentes
4 ou 5 couleurs, différentes combinaisons

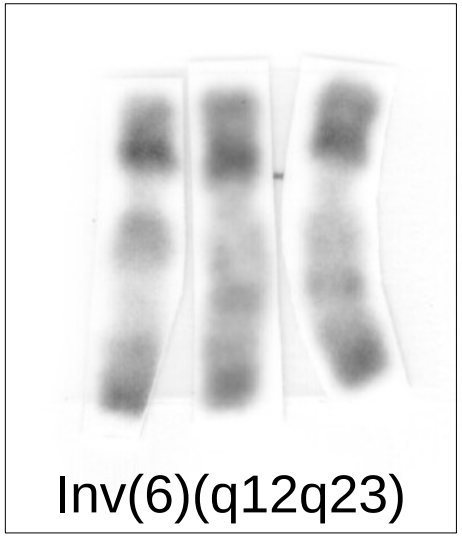
Précise les caryotypes
Moins de « marqueurs »
Translocations complexes

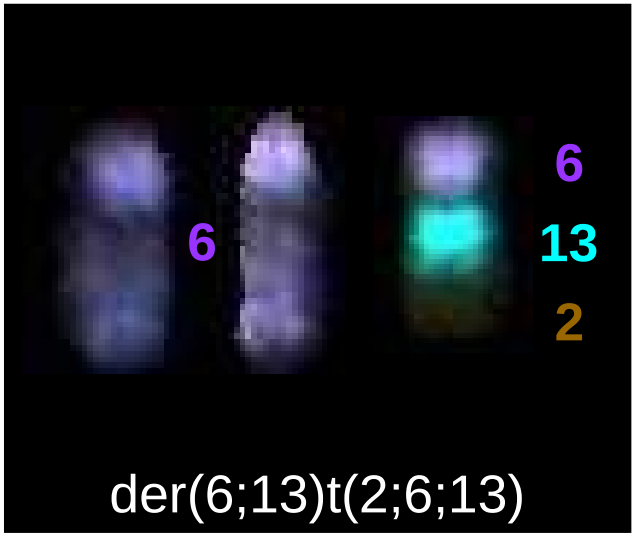
Multiplex FISH (M-FISH)
Speicher et al. (1996) Nat Genet. Apr;12(4):368-75.

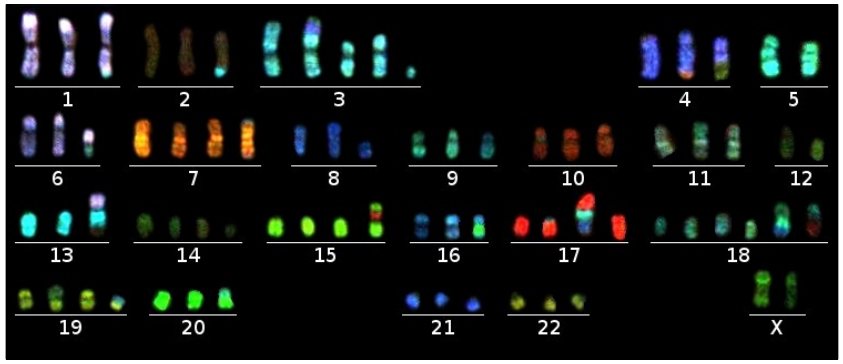
Spectral KaryotYping (SKY)
Schröck et al. (1996) Science. Jul 26;273(5274):494-7.

COmbined Binary Ratio labelling (COBRA)
Tanke et al. (1999) Eur J Hum Genet. Jan;7(1):2-11.









3. Translocations

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

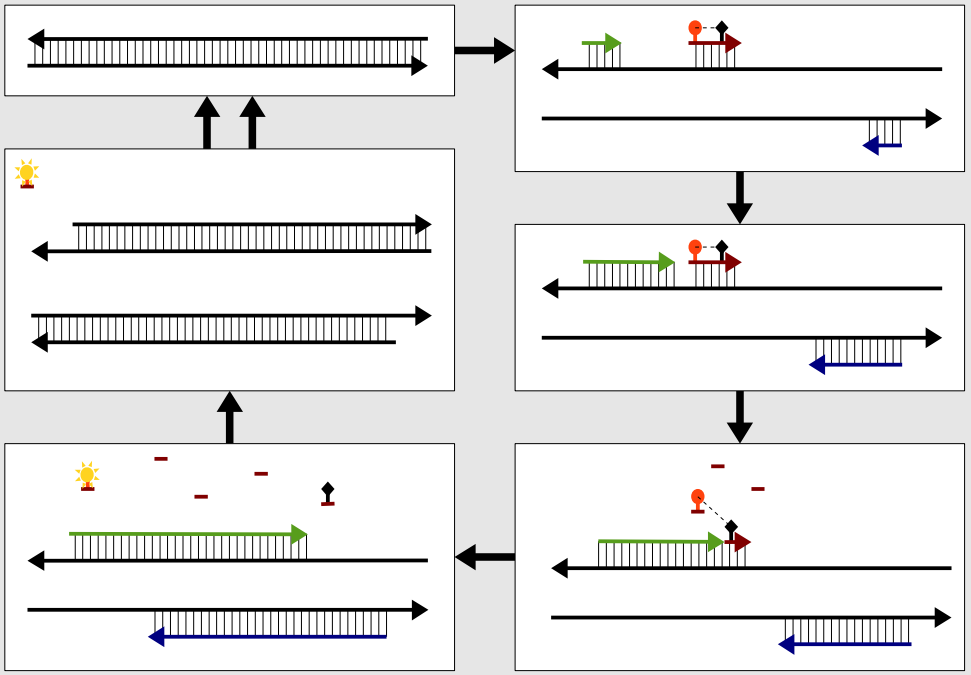
3.2. Exemple : t(9;22) dans les LMC

3.2.5. Application diagnostique par TaqMan

TaqMan

RT-PCR quantitative

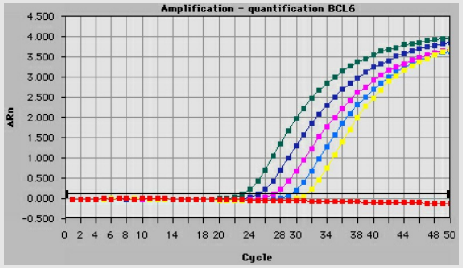
2 primers + sonde (reporter + quencher)

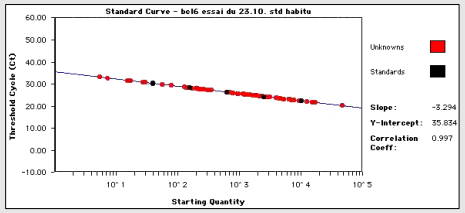


Quantification par étalonnage

Ct = nombre de cycles au dépassement du seuil

Comparaison à une gamme étalon

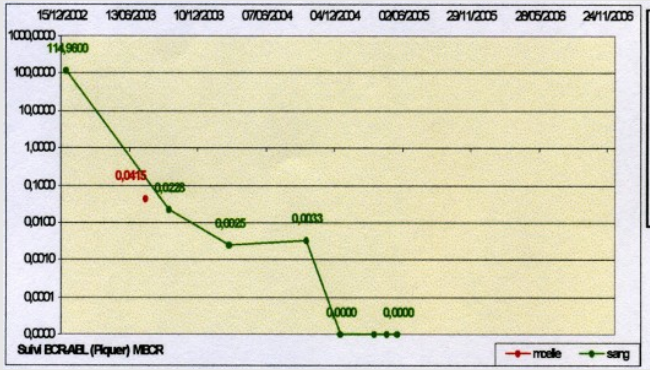




Suivi de la « maladie résiduelle »

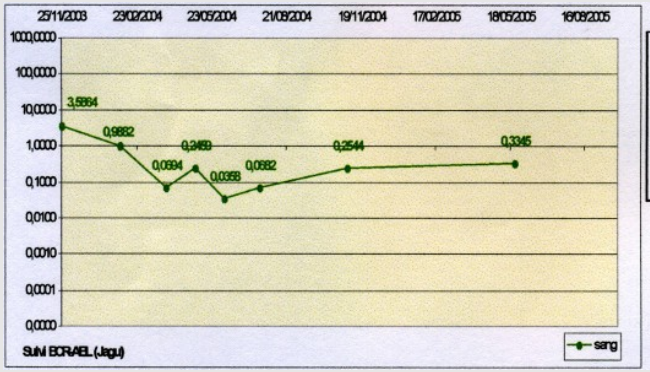
Bio-marqueur de la CML

Évaluation de la charge tumorale circulante



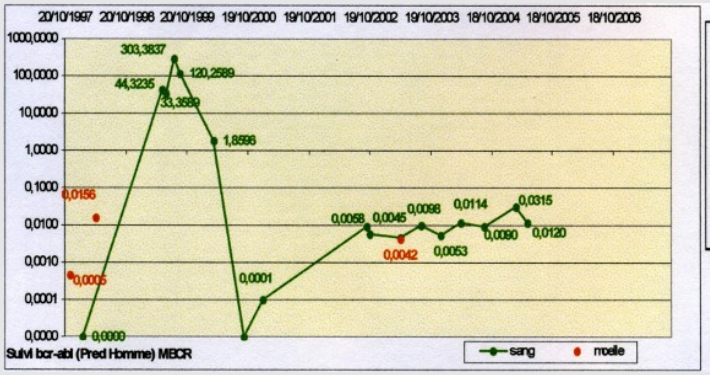
30/12/2002	sang	114,9600
24/07/2003	moelle	0,0415
24/09/2003	sang	0,0228
02/03/2004	sang	0,0025
20/09/2004	sang	0,0033
20/09/2004	moelle	
20/12/2004	sang	0,0000
18/03/2005	sang	0,0000
20/04/2005	sang	0,0000
20/05/2005	**sang**	**0,0000**

Traitement efficace



25/11/2003	sang	3,5864
03/02/2004	sang	0,9882
30/03/2004	sang	0,0694
04/05/2004	sang	0,2459
08/06/2004	sang	0,0358
20/07/2004	sang	0,0682
02/11/2004	sang	0,2544
24/05/2005	sang	0,3345

Résistance au traitement



01/10/2002	sang	0,0090
14/10/2002	sang	0,0058
15/04/2003	sang	0,0045
15/04/2003	moelle	0,0042
18/08/2003	sang	0,0098
16/12/2003	sang	0,0053
13/04/2004	sang	0,0114
01/09/2004	sang	0,009
08/03/2005	sang	0,0315
18/05/2005	**sang**	**0,012**

Rechute

Centre Henri Becquerel

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

P. Bertrand et al (2007) Leukemia 21, 515

Observation : t(8q24) dans les DLBCL
Mis en évidence par G-banding [cf §1.2.3]
Lymphomes B diffus à grandes cellules [cf §1.3.1]

Translocation de MYC connues
t(8;14)(q24;q32) entre MYC et IGH
Même schéma que pour la t(14;18)
~90% des lymphomes de Burkitt

MYC : MYelocytomatosis viral onCogene homolog
Facteur de transcription
Cycle cellulaire, apoptose, différenciation

Quels partenaires ?
Loci partenaire inconnus (9p13, 2p15, 7p12 ...)
Précision par FISH et LDI-PCR

Leukemia (2007) 21, 515–523
© 2007 Nature Publishing Group All rights reserved 0887-6924/07 $30.00
www.nature.com/leu

ORIGINAL ARTICLE

Mapping of *MYC* breakpoints in 8q24 rearrangements involving non-immunoglobulin partners in B-cell lymphomas

P Bertrand, C Bastard, C Maingonnat, F Jardin, C Maisonneuve, M-N Courel, P Ruminy, J-M Picquenot, H Tilly

Groupe d'Etude des Proliférations Lymphoïdes, Centre Henri Becquerel, INSERM U614, IFRMP23, Rouen, France

3. Translocations

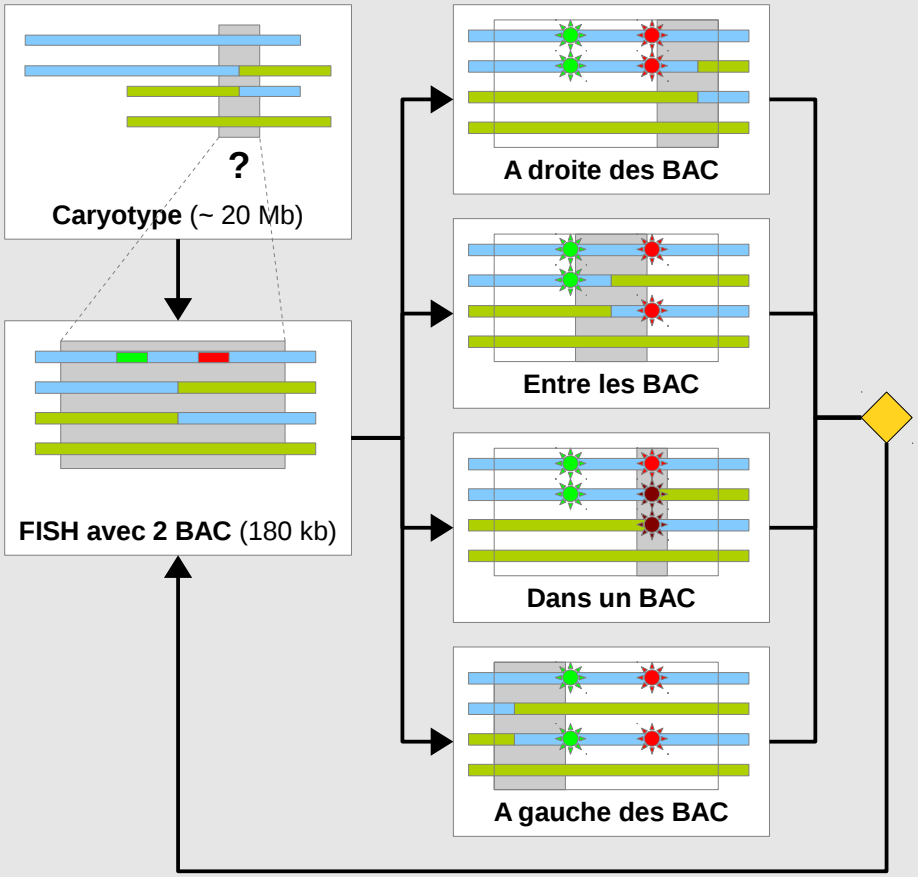
Sylvain Mareschal (novembre 2013) (cc) BY-NC

3.3. Exemple : t(MYC) et DLBCL

3.3.2. Marche cytogénétique

Principe

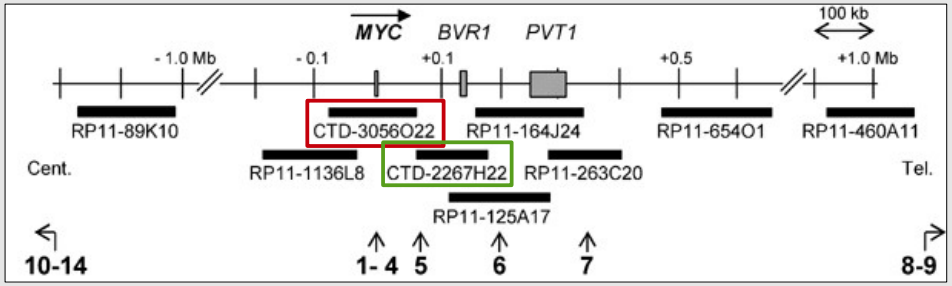
Objectif : préciser la cassure
Travail sur un partenaire à la fois (bleu ici)
Utilisation de sondes « break apart » en FISH
Rapprochement progressif des sondes

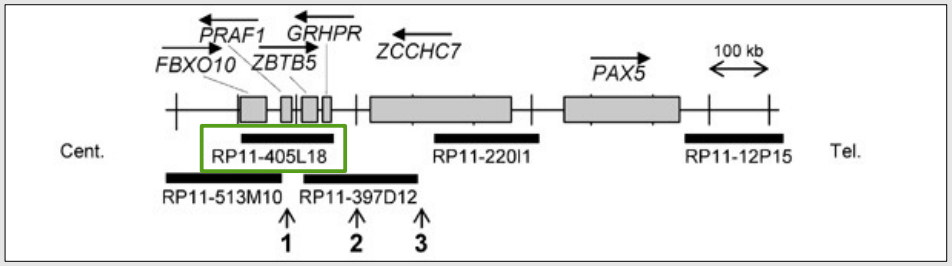


Réduction de la région par cycles (~ 3 semaines)
Utilisation de FOSMID (40 kb)
Utilisation de sondes chevauchantes

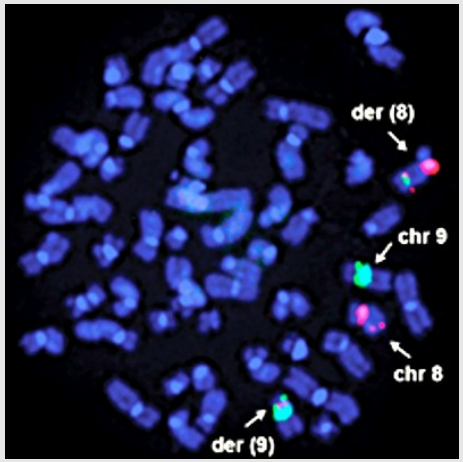
Résultats

Figures extraites de P. Bertrand et al (2007) Leukemia 21, 515

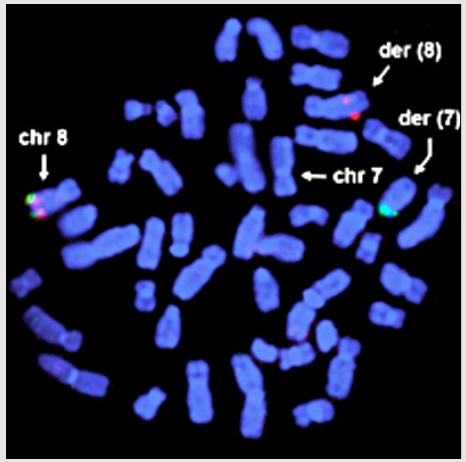




Cas #1 : une sonde
- centromère 8
- CTD-3056O22 (MYC)
- centromère 9
- RP11-405L18 (PAX5)



Cas #5 : deux sondes
- CTD-3056O22 (MYC)
- CTD-2267H22 (MYC)



3. Translocations

Sylvain Mareschal (novembre 2013) BY-NC

3.3. Exemple : t(MYC) et DLBCL

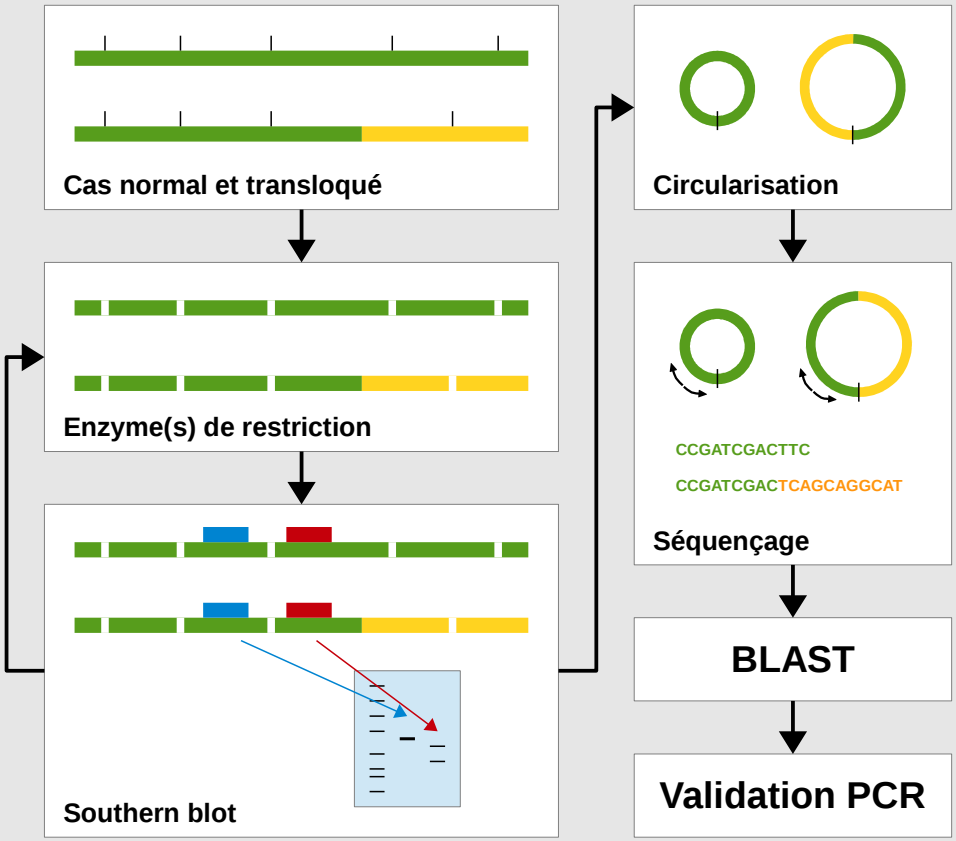
3.3.3. LDI-PCR

Long-Distance Inverse PCR

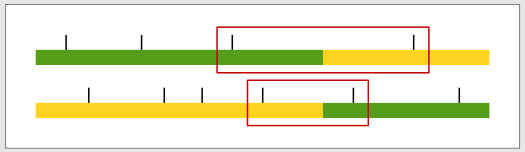
A la recherche du second partenaire

Point de cassure connu chez un partenaire (vert ici)

Pas d'*a priori* sur le second partenaire

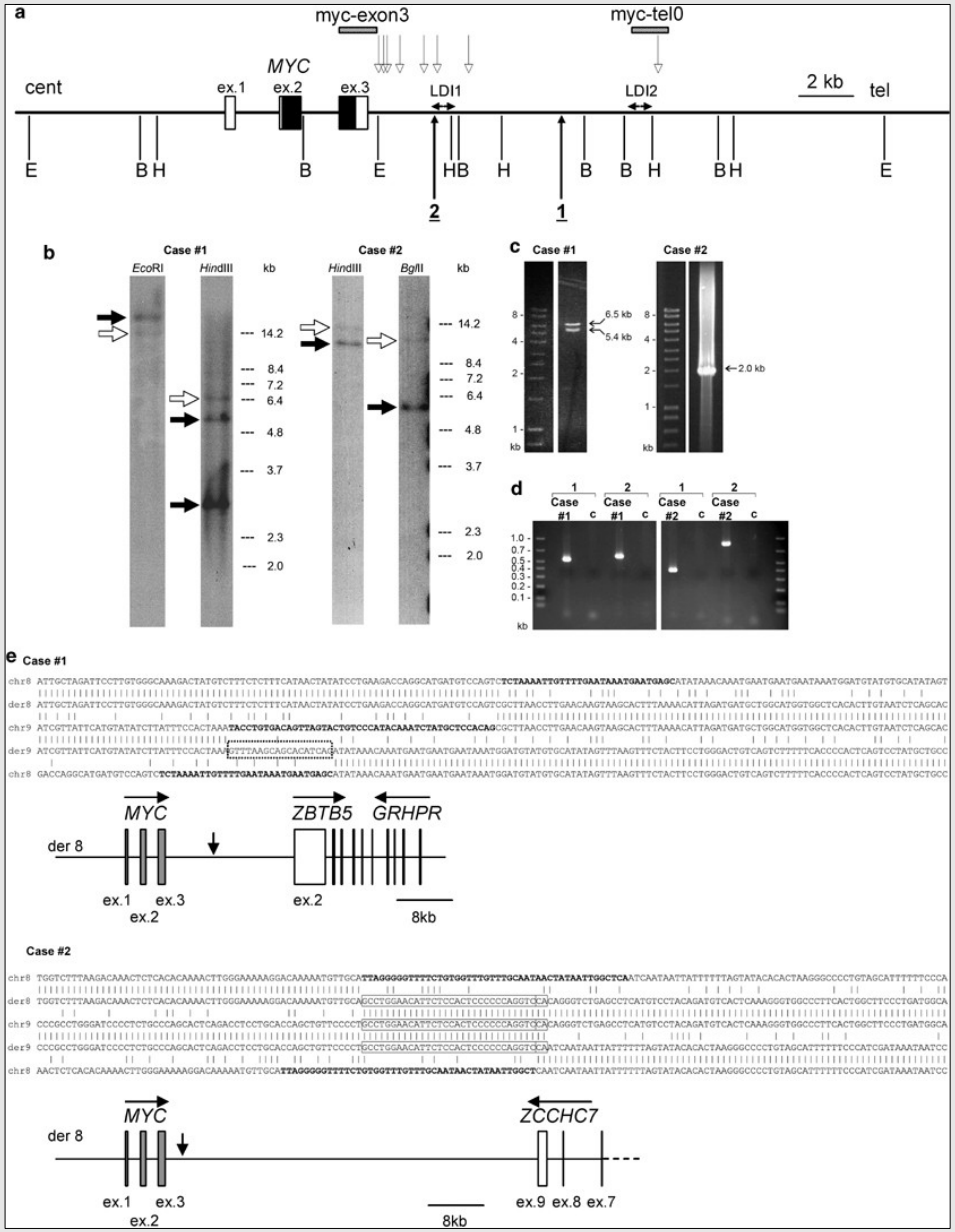


Deux fragments à disposition



Résultats

Figure extraite de P. Bertrand et al (2007) Leukemia 21, 515



3. Translocations

3.4. NGS et translocation d'IGH

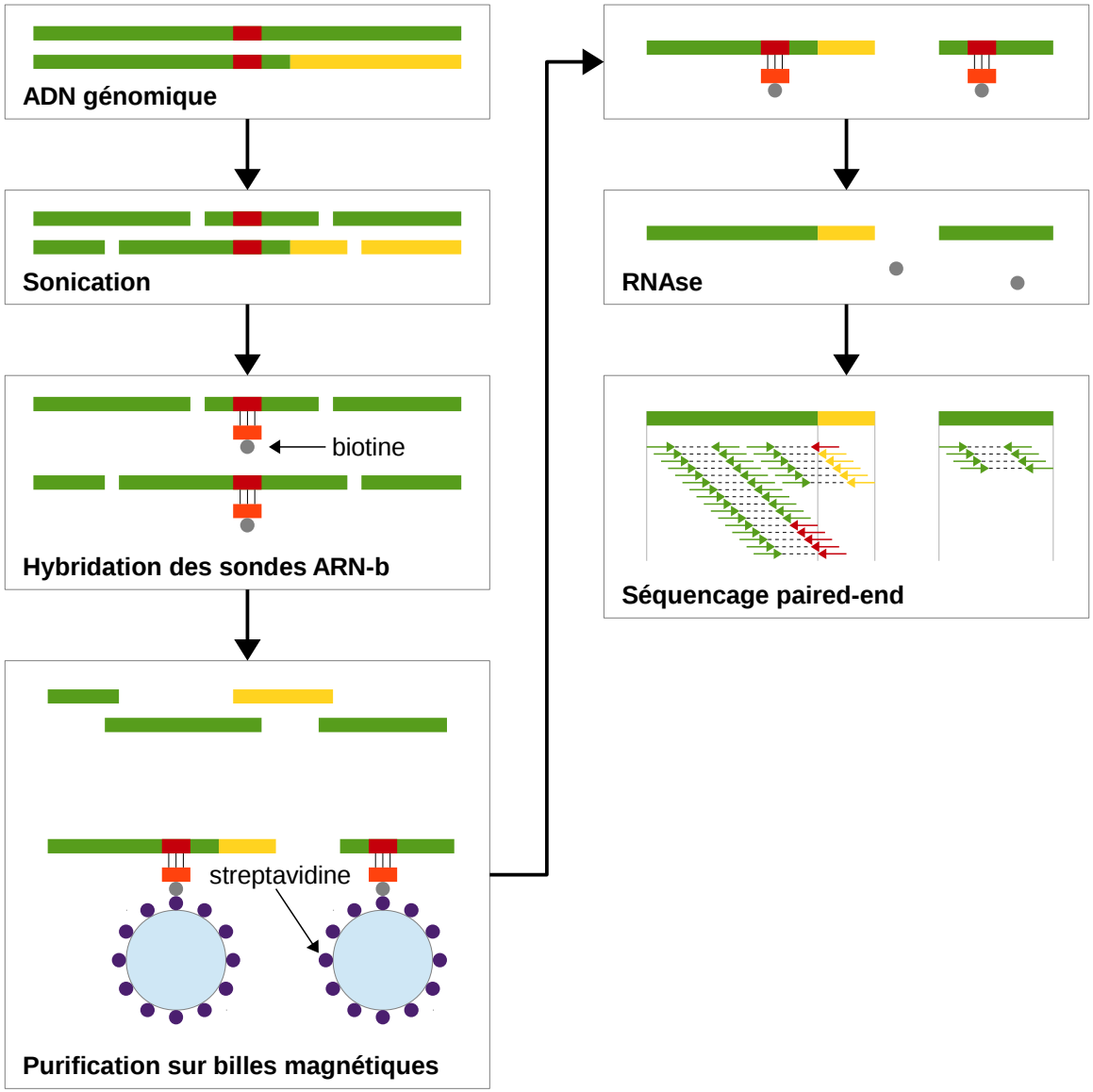
Sylvain Mareschal (novembre 2013)
(cc) BY-NC

Walker et al (2013) Genes Chrom. Cancer 52, 817
Identification of a novel t(7;14) translocation in multiple myeloma resulting in overexpression of EGFR

Myelome multiple
Prolifération de plasmocytes anormaux
Accumulation et dépôts d'IgM
Incurable (rechutes), survie médiane 3-4 ans

Observations : t(IGH)
Mis en évidence par G-banding [cf §1.2.3]
Fréquent dans le myelome : 4, 6, 11, 16, 20 ...
Substitution de promoteur IGH
Partenaire non identifié ici

Agilent SureSelect (MSA-Cap)
Capture des fragments transloqués par IGH

Illumina HiSeq 2000
Séquençage paired-end (2 x 76 bp)
Assemblage des reads
Identification du partenaire par alignement

Partenaire identifié : EGFR
Epidermal Growth Factor Receptor
Kinase, prolifératon cellulaire