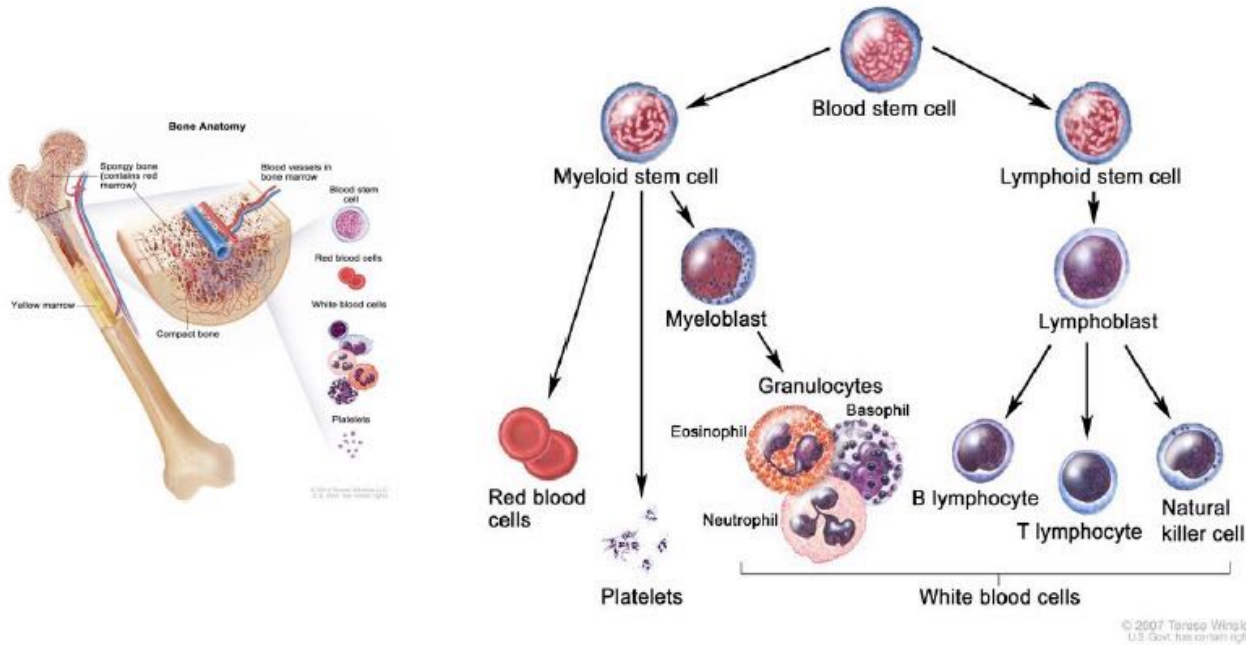


# INTRODUCTION À LA CYTOGÉNÉTIQUE ET À LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE EN HÉMATOLOGIE

# Hématopoïèse

Processus physiologique permettant la création et le renouvellement des cellules sanguines.



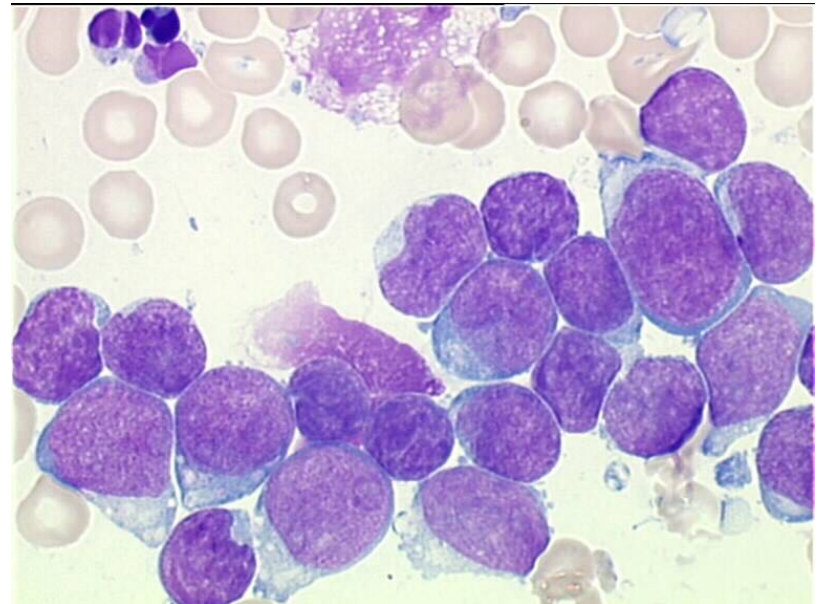
Chaque jour la moelle osseuse produit  $10^{13}$  cellules hématopoïétiques

- Maintien d'un stock de cellules souches hématopoïétiques multipotentes (CSH) : autorenouvellement des CSH
- Différenciation des CSH en progéniteur non multipotent en réponse à des signaux exogènes
- Maturation dans la moelle osseuse et le thymus (lymphocytes T) des cellules sanguines, myéloïdes et lymphoïdes, globules rouges et plaquettes
- Différenciation et prolifération des lymphocytes matures dans les ganglions

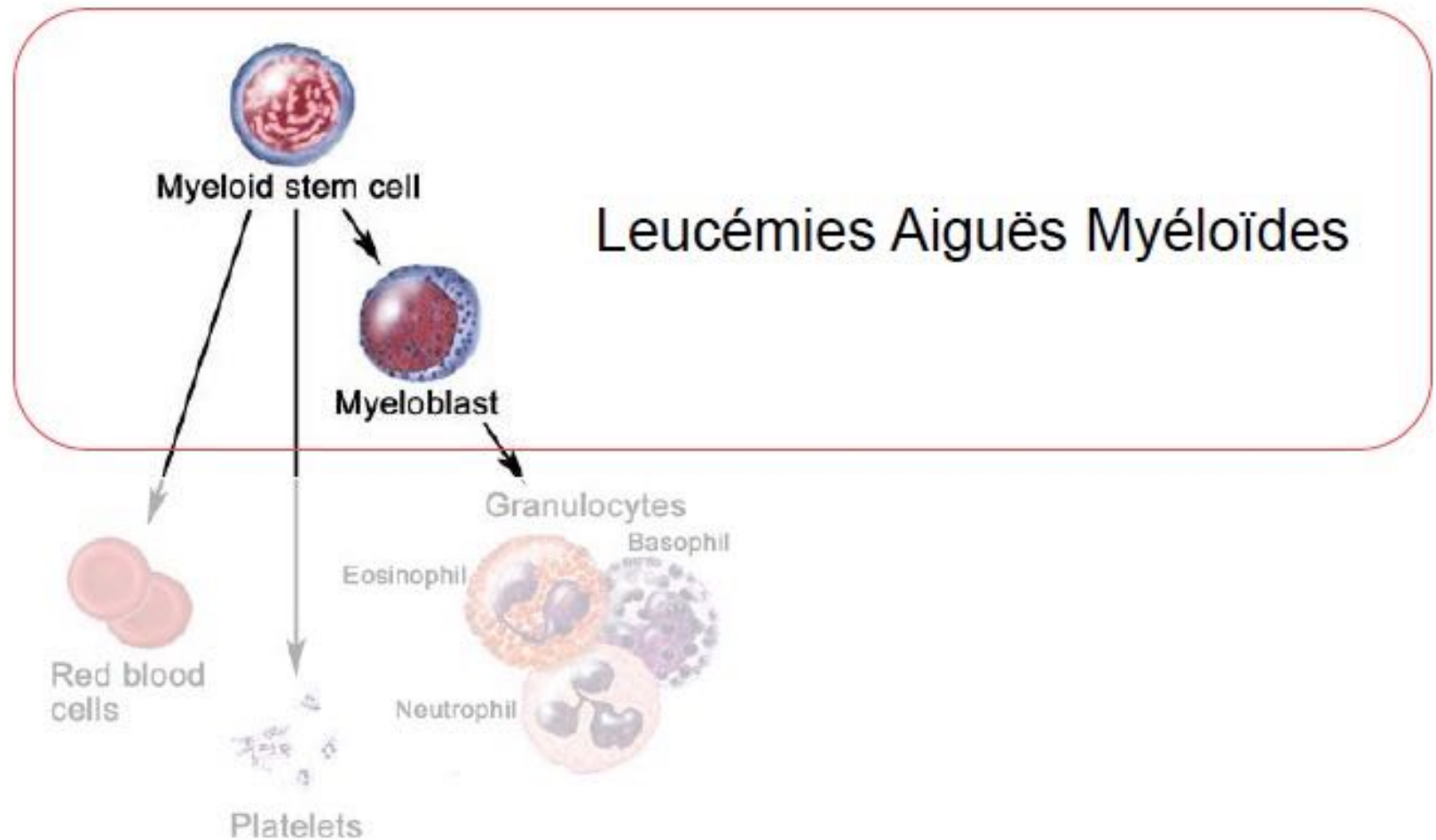
# Hémopathie maligne

Transformation néoplasique de précurseurs hématopoïétiques plus ou moins engagés.

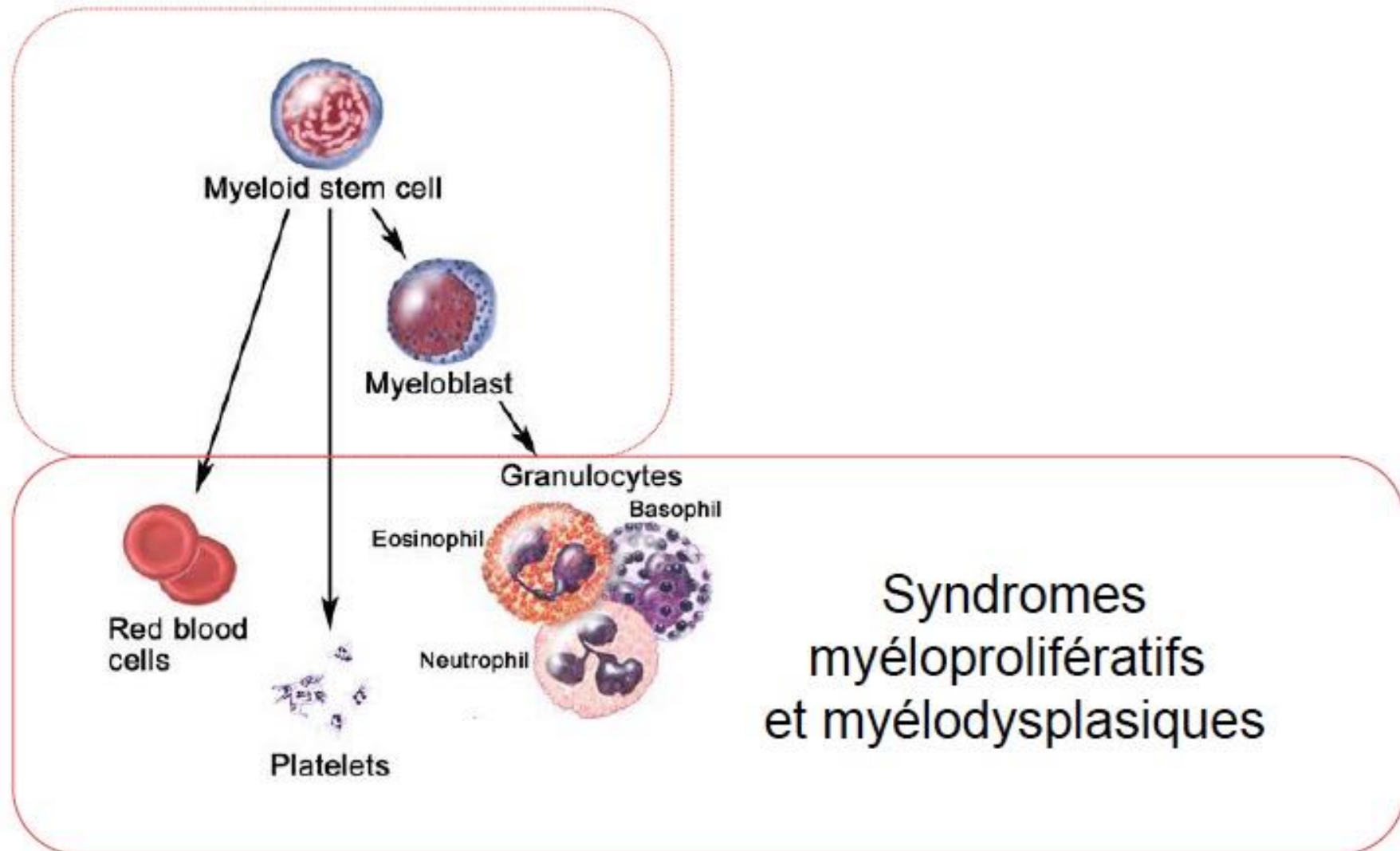
- Prolifération cellulaire incontrôlée
- Perte de réponse à l'apoptose
- Blocage de la différenciation



# Tumeurs du tissu hématopoïétique



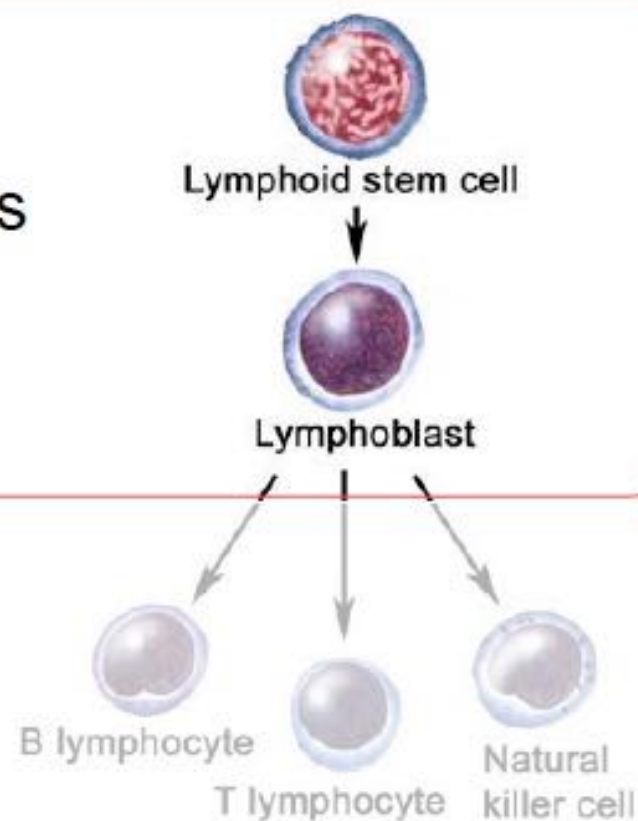
# Tumeurs du tissu hématopoïétique



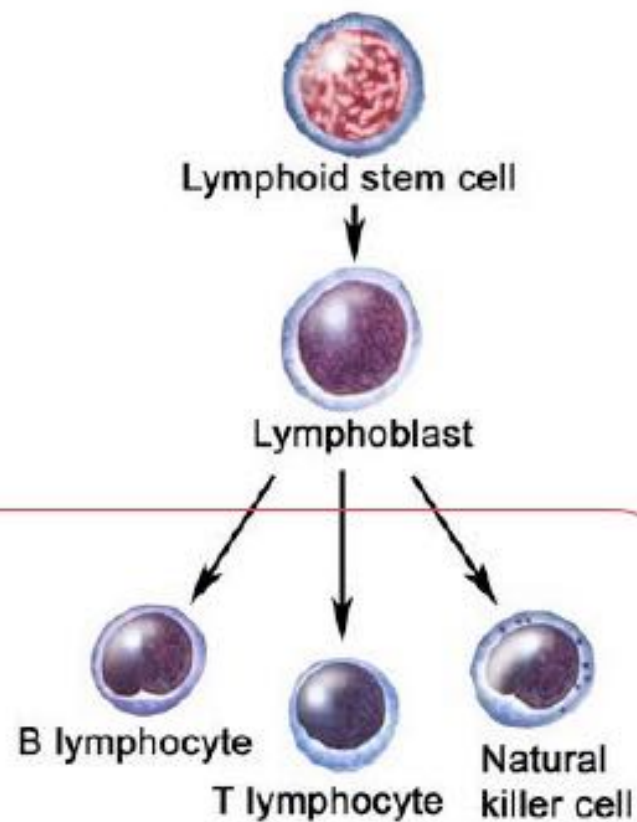
Syndromes  
myéloprolifératifs  
et myélodysplasiques

# Tumeurs du tissu hématopoïétique

Leucémies et lymphomes  
lymphoblastiques



# Tumeurs du tissu hématopoïétique

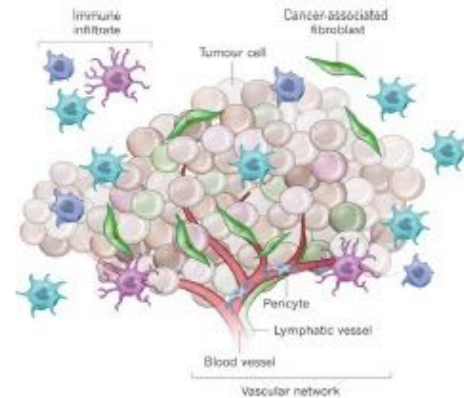


Leucémies et lymphomes  
B, T et NK matures

# Le cancer

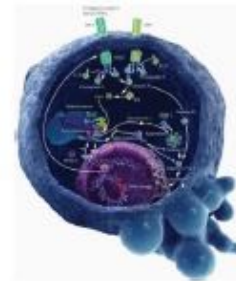
Une maladie tissulaire

Cellules tumorales + environnement



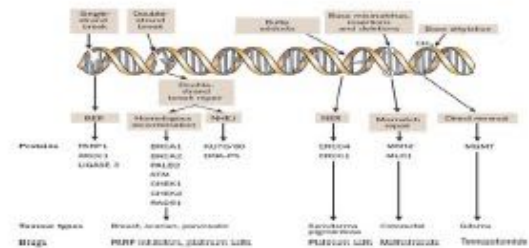
Une maladie cellulaire

Prolifération clonale



Une maladie de l'ADN

Modification du génome





# La transformation en cellule tumorale est la conséquence de :

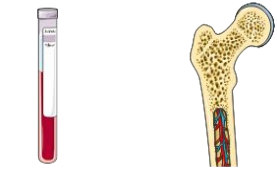
- Anomalies acquises chromosomiques
- Mutations géniques acquises
- Modifications épigénétiques



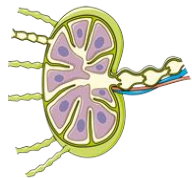
- **Activation/hyperexpression d'oncogènes**
- **Inactivation/sous expression de gènes suppresseurs de tumeurs**

# Le circuit du prélèvement en onco-hématologie

**Prélèvement  
tissu ou cellules  
hématopoïétiques**



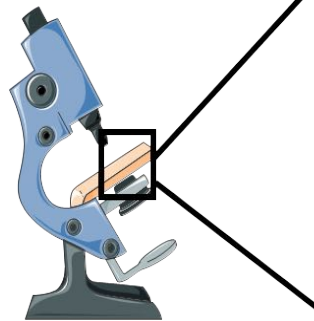
*sang moelle osseuse*



*ganglion*

Hématologue  
Radiologue, chirurgie

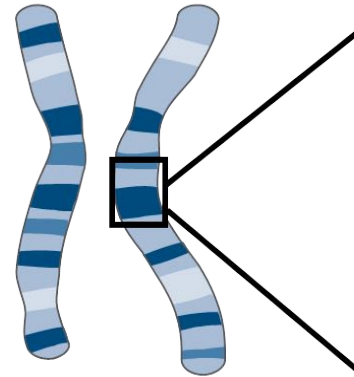
**Cellule ou  
Tissus**



**Cytologie  
Anatomo-pathologie**

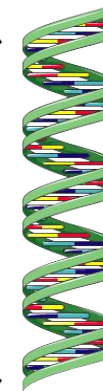
Biologiste, anatomopathologiste

**Chromosome**



**Cytogénétique**

**Acides  
nucléiques**



**Biologie  
moléculaire**

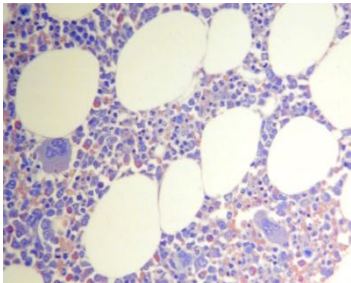
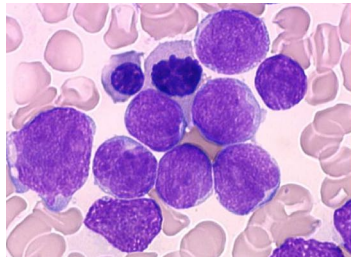
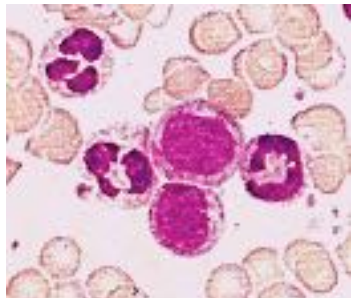
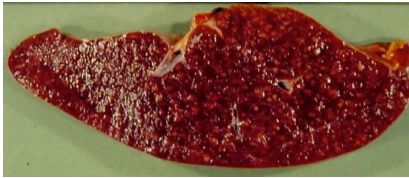


Centre de  
ressources  
biologiques

# Bilan biologique d'une hémopathie

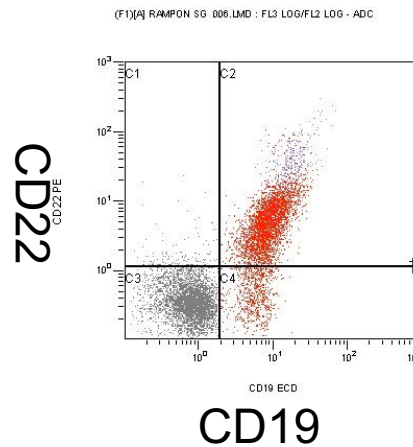
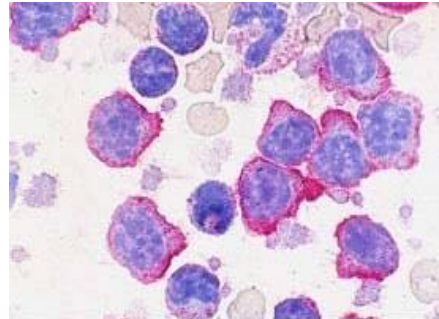
## Caractéristiques Morphologiques

Ex.macroscopique

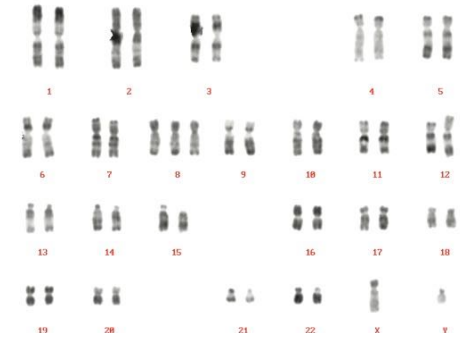


Ex.microscopiques

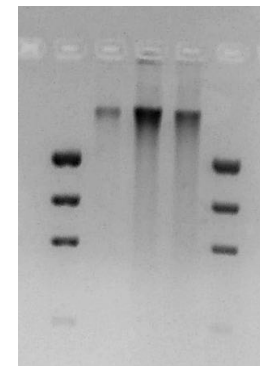
## Caractéristiques Phénotypiques



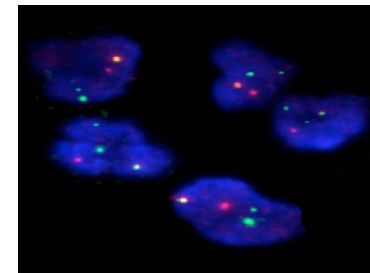
## Caractéristiques Génétiques



## Caryotype



Biologie Moléculaire



FISH

# Caractéristiques des anomalies chromosomiques dans les hémopathies malignes

**Acquises** (n'existent pas dans les cellules non cancéreuses)

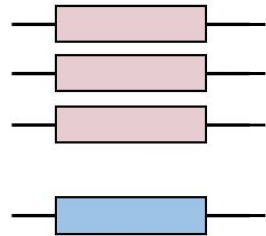
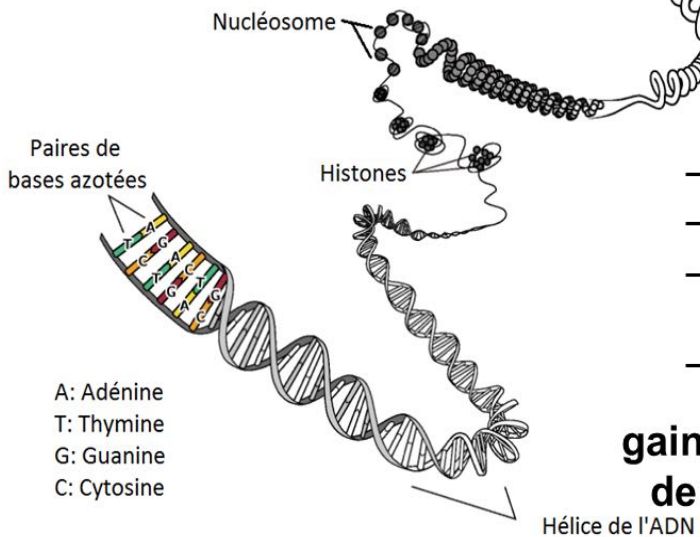
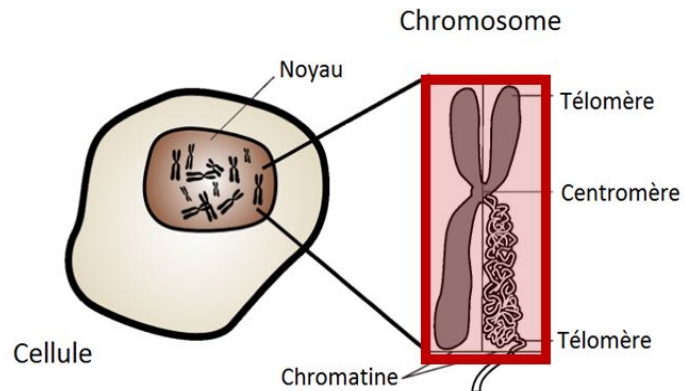
**Clonales** (toutes les cellules cancéreuses sont porteuses de l'anomalie chromosomique primaire. Les cellules cancéreuses dérivent d'une seule cellule)

**Récurrentes** (la même anomalie est retrouvée dans les cellules cancéreuses de malades non apparentés)

**Spécifiques** (certaines anomalies sont spécifiques d'un type d'hémopathie maligne)

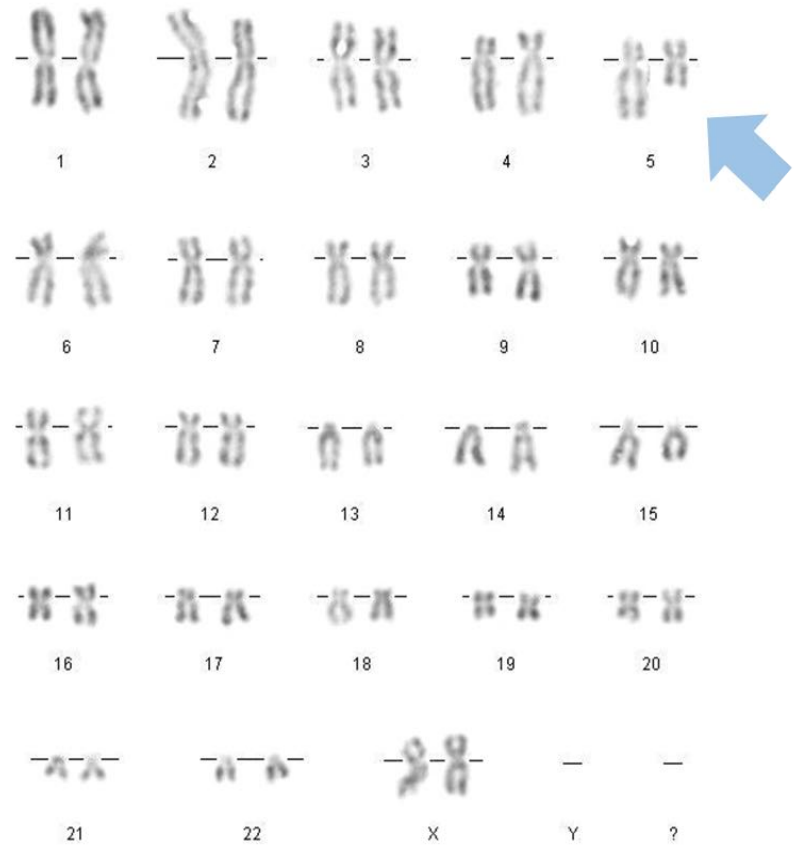
Ex : t(9;22) dans la LMC ou t(8;14) dans le lymphome de Burkitt

# Le laboratoire de cytogénétique (1)

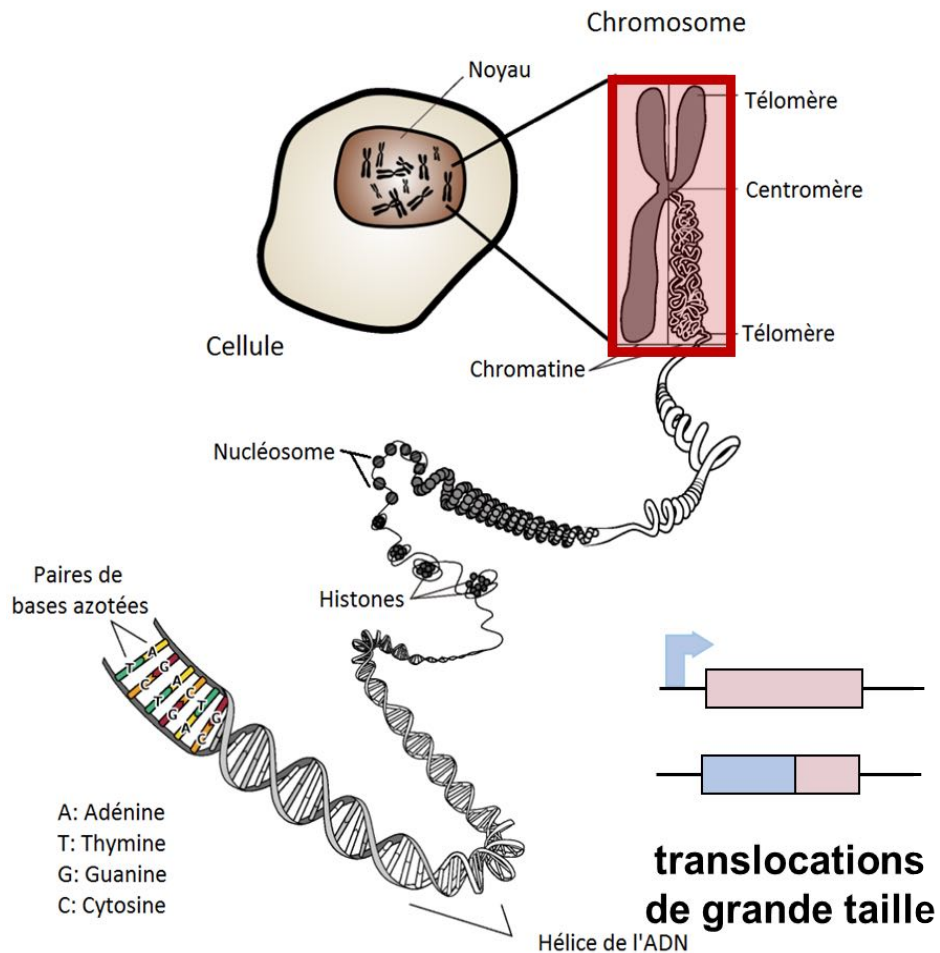


## Caryotype

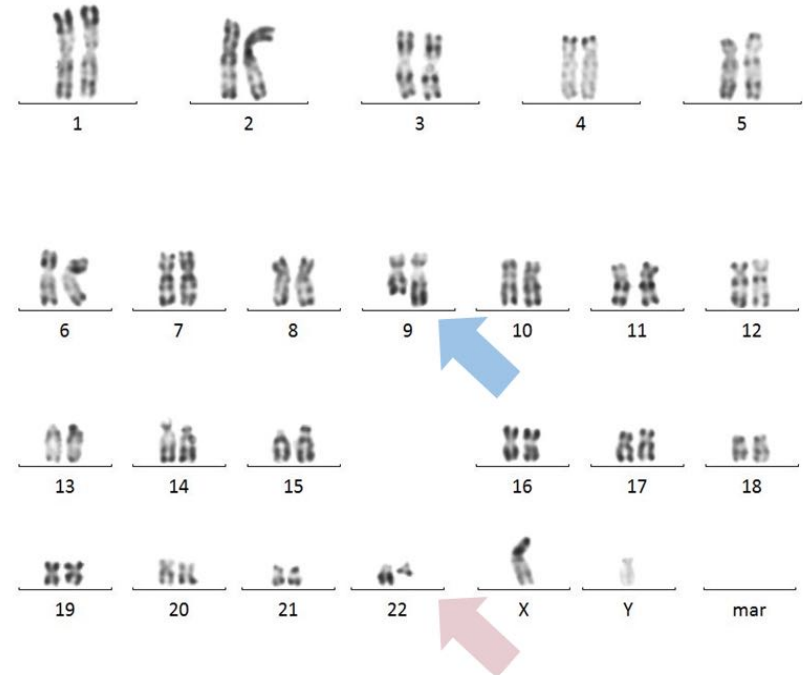
### Métaphases, tous les chromosomes



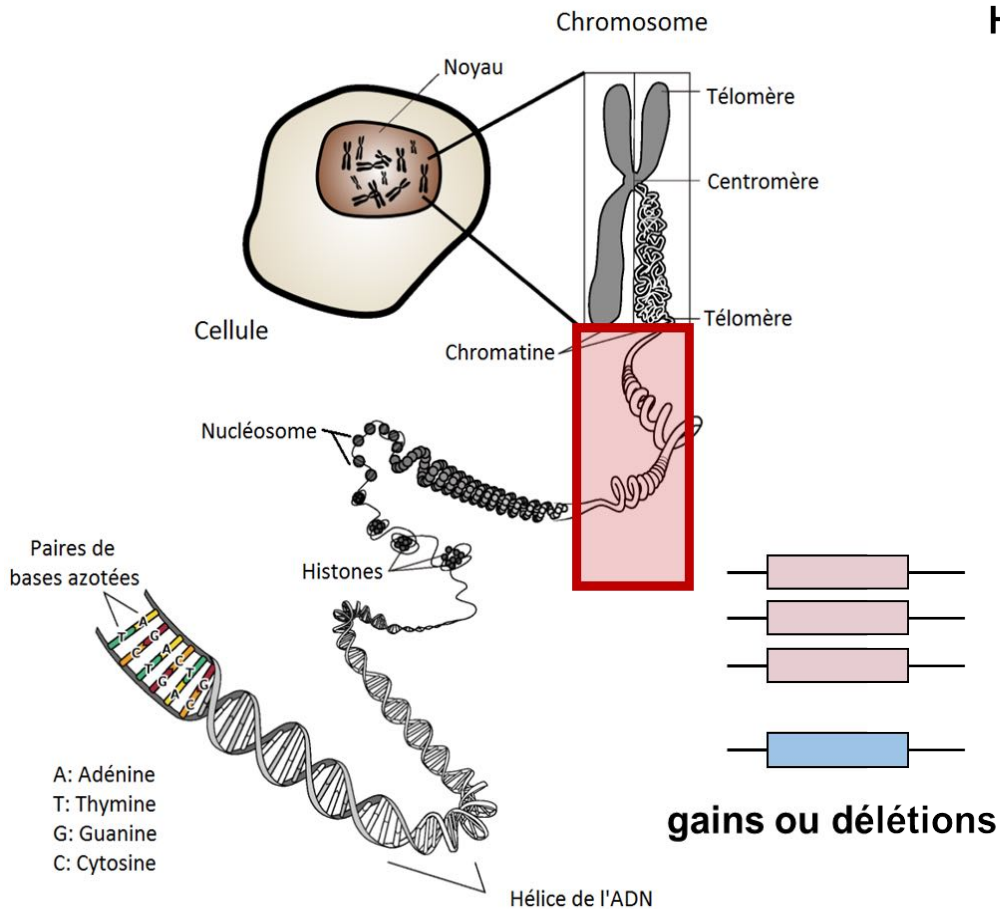
# Le laboratoire de cytogénétique (1)



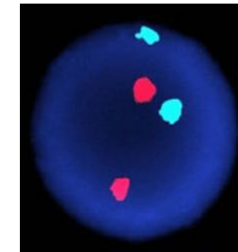
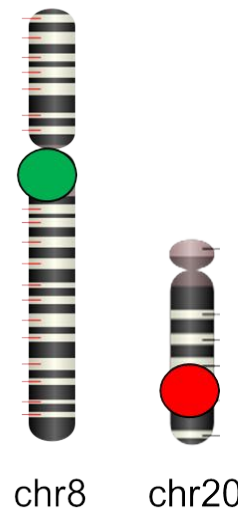
## Caryotype Métaphases, tous les chromosomes



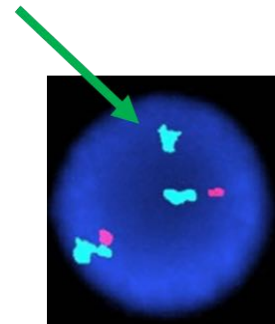
# Le laboratoire de cytogénétique (2)



## Hybridation Fluorescente In Situ (FISH) Métaphases ou Interphases Quelques régions cibles

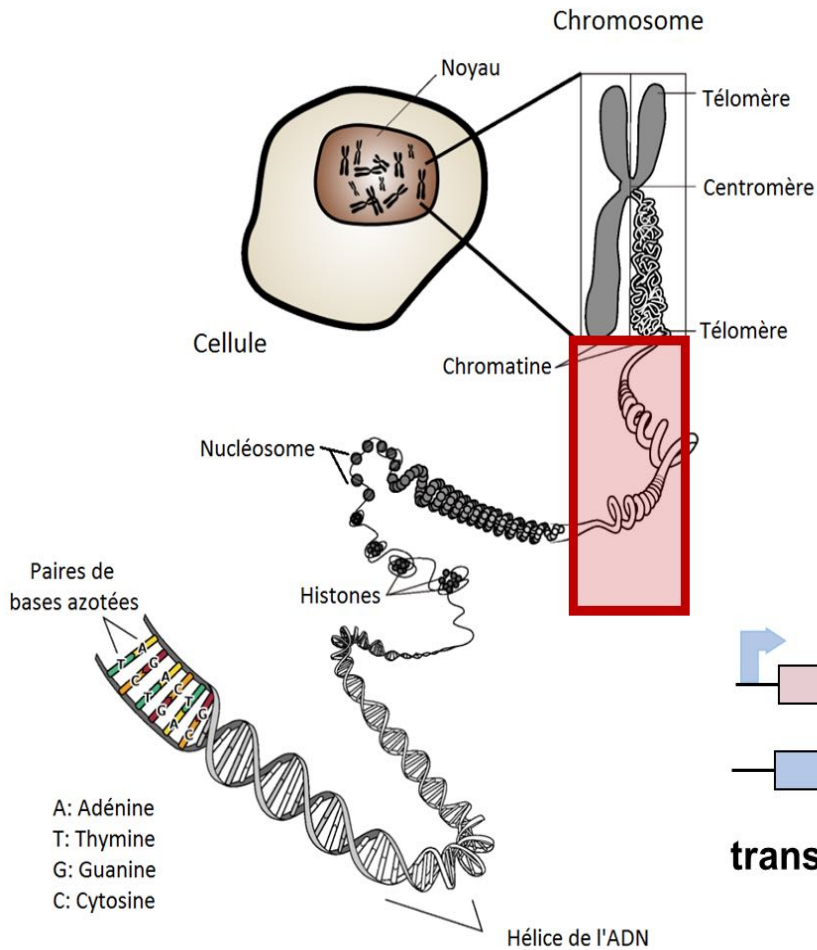


normal

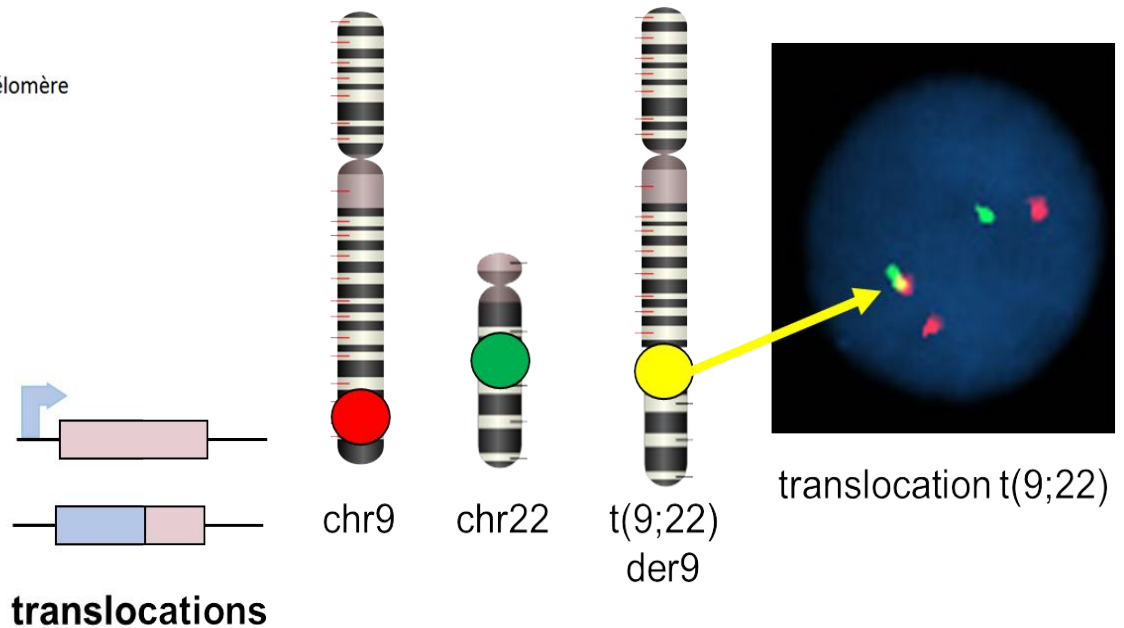


trisomie 8

# Le laboratoire de cytogénétique (2)



## Hybridation Fluorescente In Situ (FISH) Métaphases ou Interphases Quelques régions cibles





# Types d'anomalies chromosomiques acquises dans les hémopathies malignes

## Anomalies de Structure

- Translocations
- Délétions
- Duplications
- Inversions
- ....

## Anomalies de Nombre

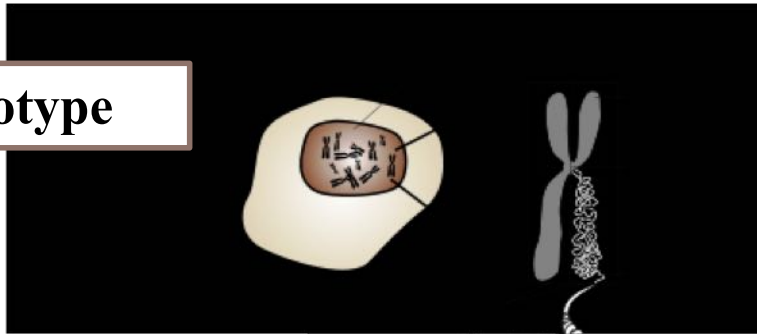
- Trisomies
- Monosomies
- Hyperploïdies
- ....

# Détection des anomalies chromosomiques acquises

## Les outils diagnostiques : du chromosome à l'ADN

**Caryotype**

10-15Mb



**FISH**

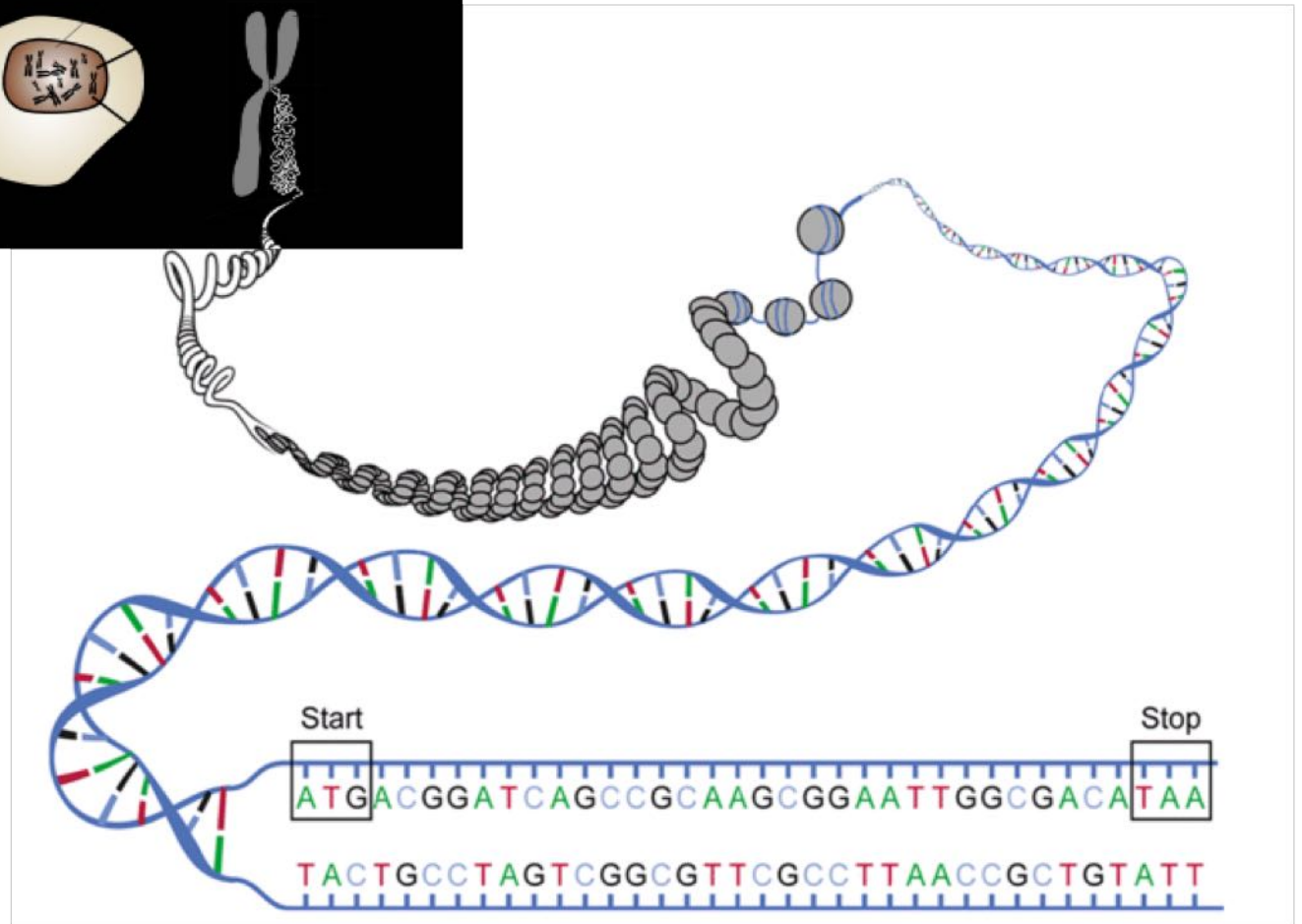
-300kb

**CGH/SNP array**

Jusqu'à qq kb

**Séquençage**

bases



# Caryotype : technique

## Analyse globale du génome

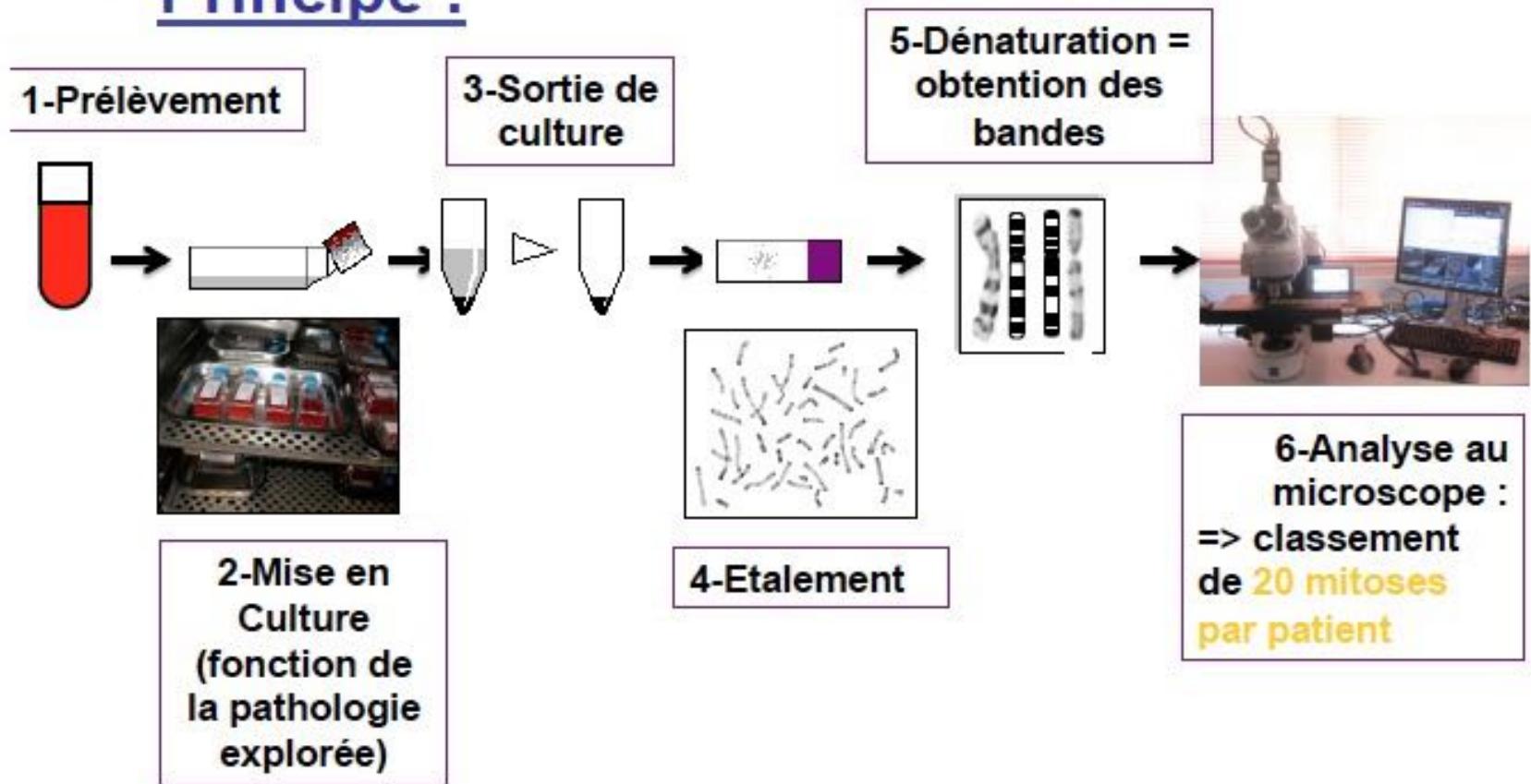
- **Mise en culture** les cellules tumorales (potentiel prolifératif)
- Blocage des cellules en **mitoses**
- Analyse et classement des **chromosomes**

Aperçu au microscope  
**objectif 100x**

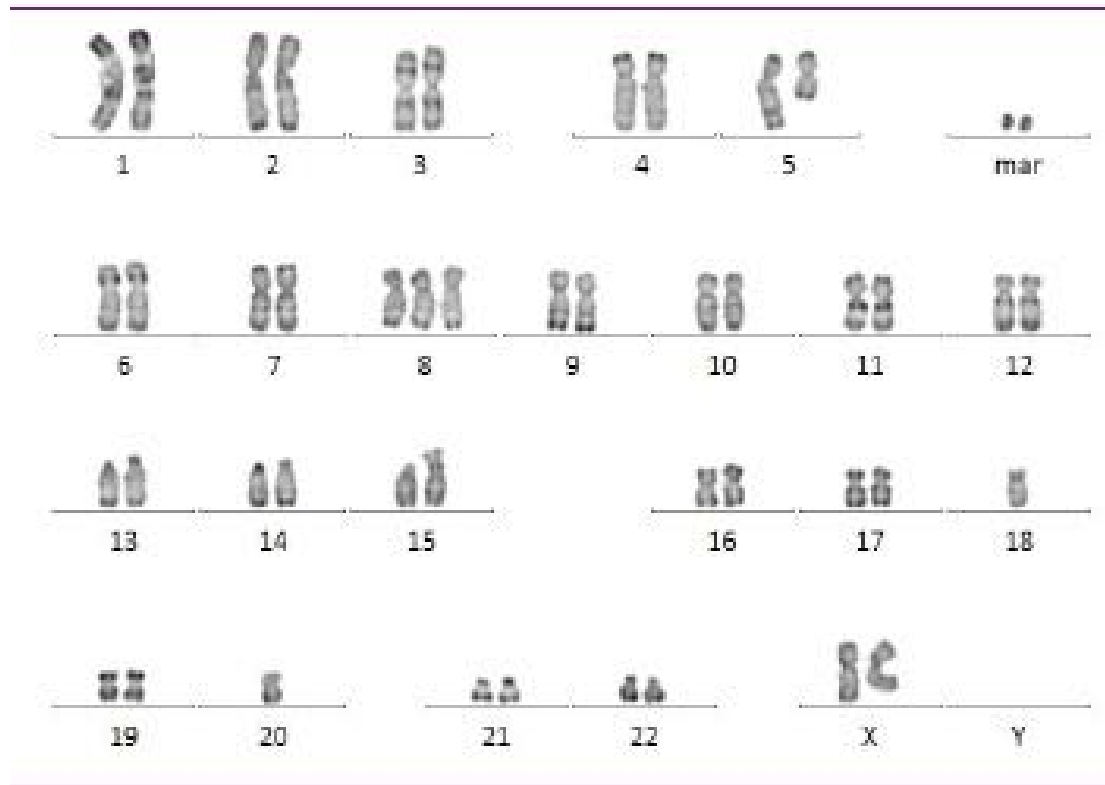


# Caryotype : technique

## • Principe :



# Caryotype



Exemple de caryotype

# Caryotype : les avantages

Permet une vision globale: analyse pan-génomique

- des anomalies de nombre
- des anomalies de structure équilibrées ou déséquilibrées

Permet de suivre de l'évolution clonale : clone, sous clones

Montre l'hétérogénéité intra-tumorale : clones non reliés



**Méthode de référence**

# Caryotype : contraintes et limites

## Liées à l'échantillon :

- taille et cellularité du prélèvement: 20-30 millions de cellules/10ml
- cellules vivantes
- index de prolifération
- **échec de caryotype**
- **cellules tumorales non en cycle**

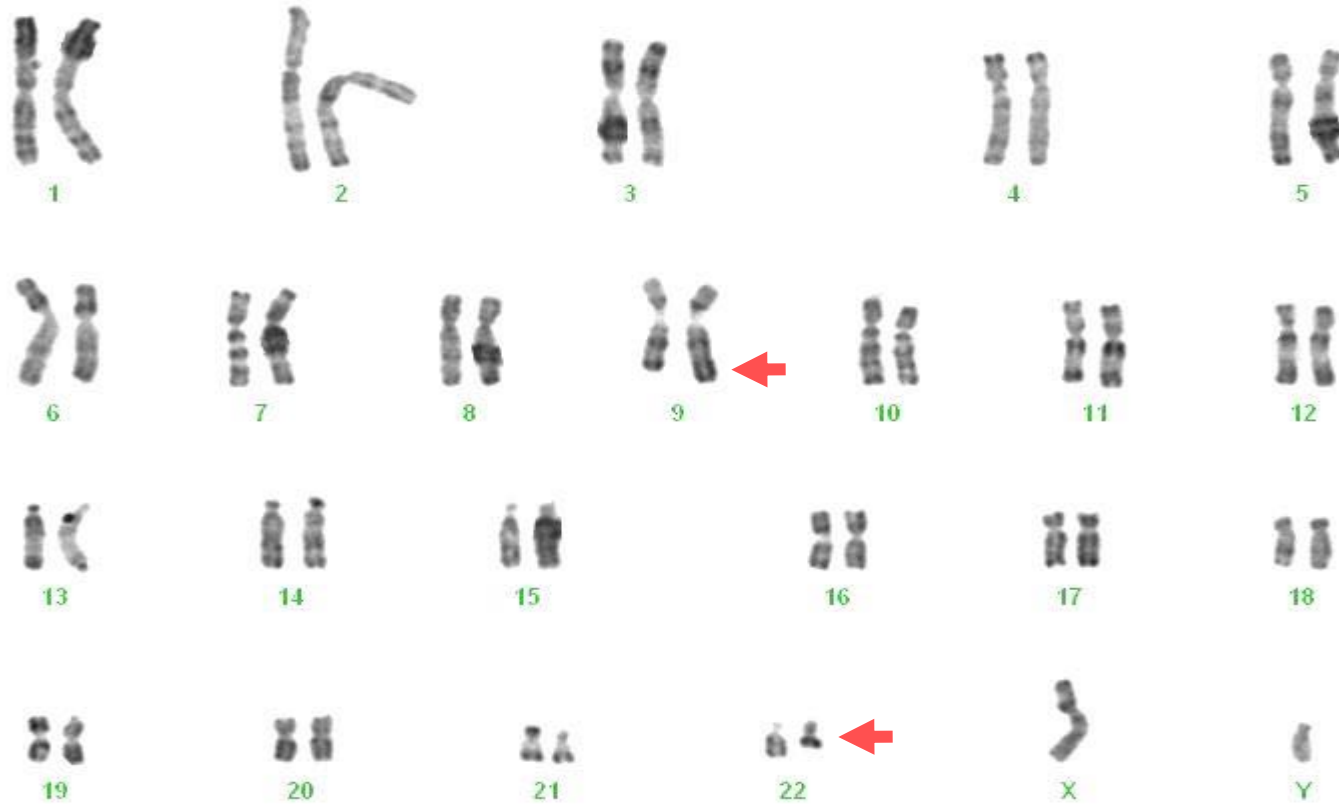
## Liées à la technique :

- technique manuelle
- technique multi-étapes, longue
- qualité du banding chromosomique
- **anomalies complexes**
- **anomalies cryptiques**

## Liées à l'opérateur :

- seuil de détection: œil humain
- niveau de résolution du caryotype: **10 Mb**

# Caryotype : exemple de la LMC

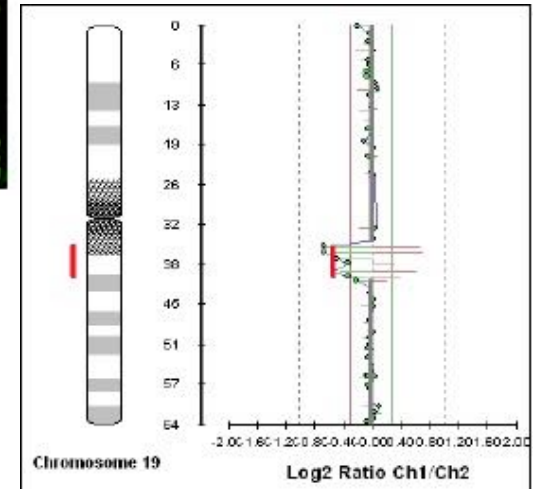
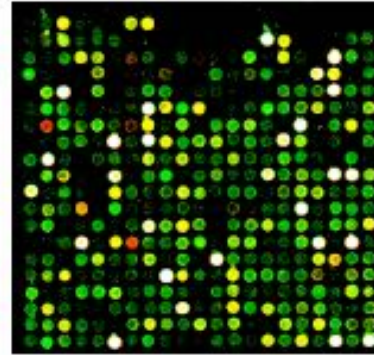
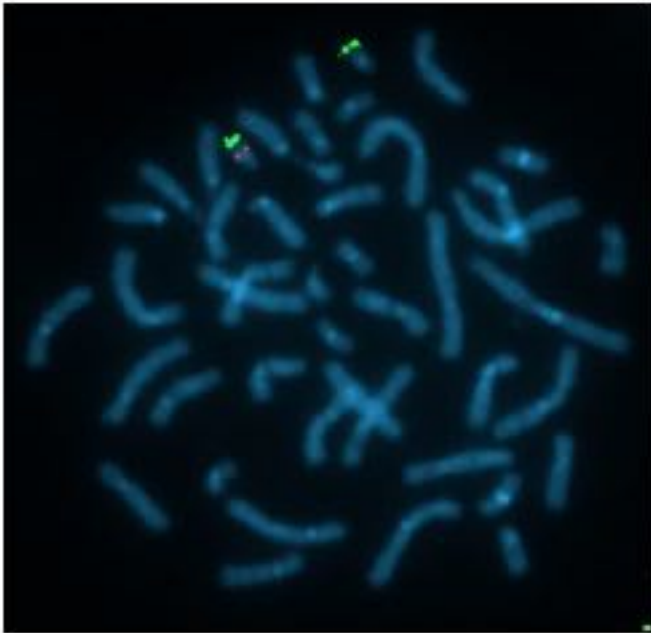


95% des cas

46,XY,t(9;22)(q34;q11)[20]



# Cytogénétique moléculaire



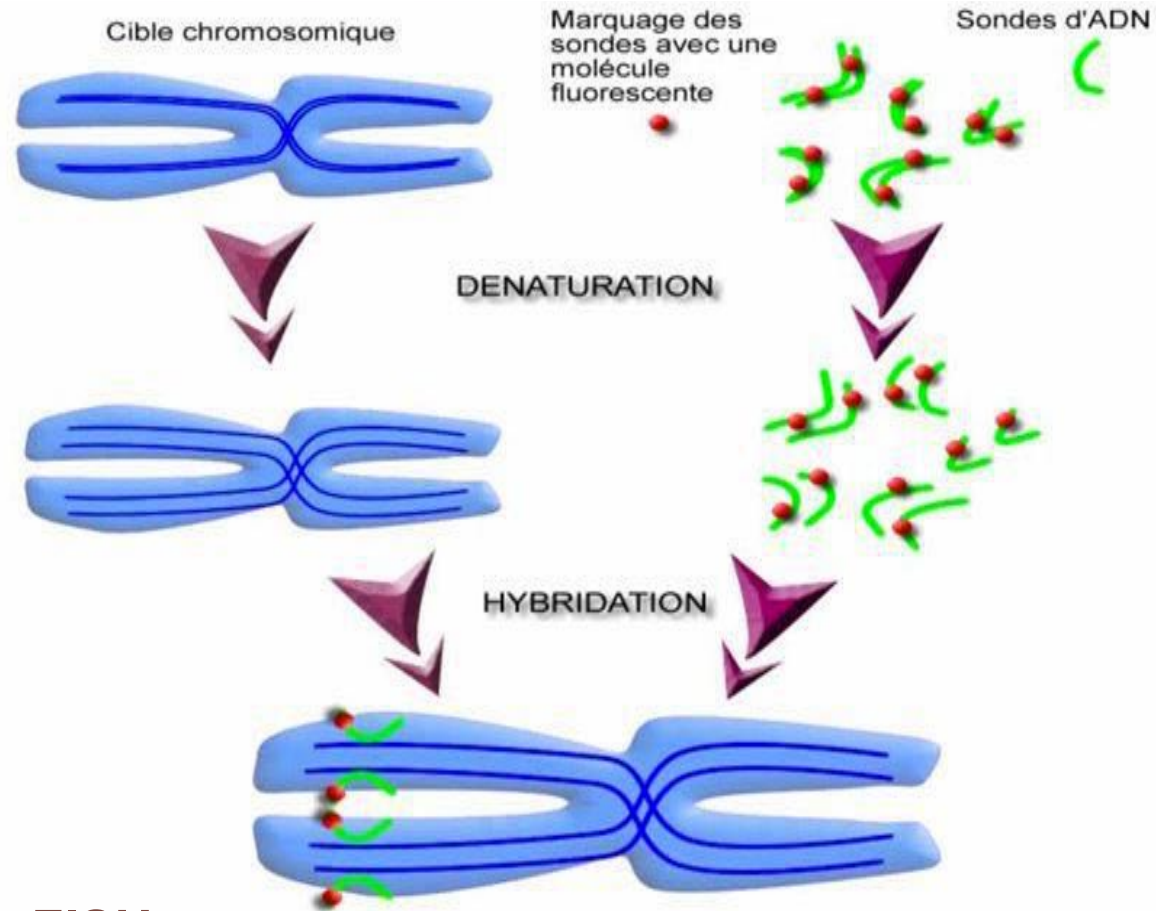
## FISH

- culot cytogénétique
- apposition
- coupe congelée
- coupe paraffinée

## CGH

- ADN tumoral de bonne qualité
- Infiltration >20% de cellules tumorales
- Si possible, ADN constitutionnel en ADN de référence

# Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)



Principe de la FISH

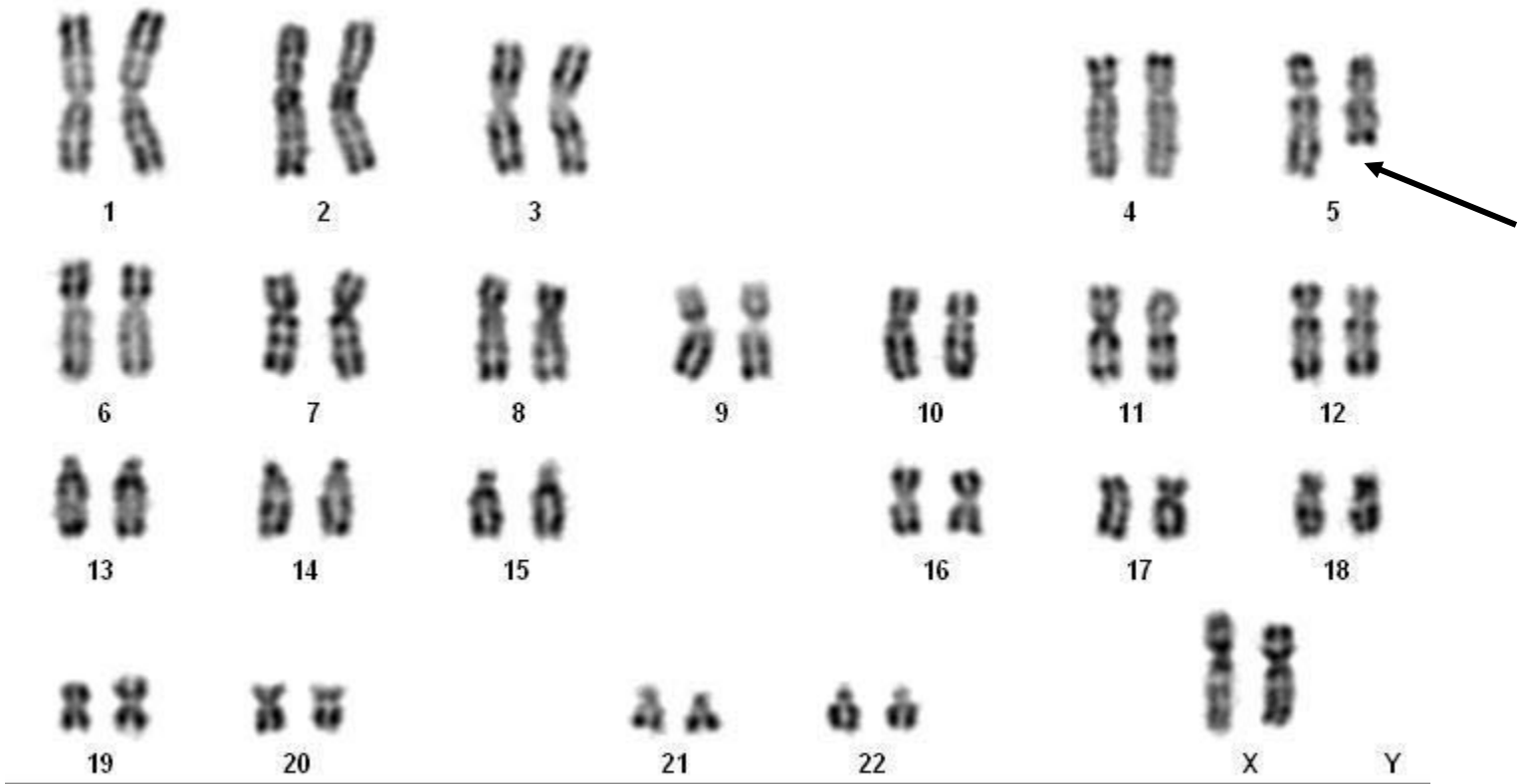
# Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

## 3 intérêts principaux :

- Confirmation d'une anomalie détectée au caryotype
- Détection d'une anomalie cryptique (trop petite pour être détectée au caryotype)
- Recherche d'anomalie sur des cellules interphasiques (coupe histologique, échec de caryotype)

# 1-FISH : Confirmation d'une anomalie détectée au caryotype

Exemple : myélodysplasie avec 5q-



46,XX,del(5)(q14~15q34)

# Comparative Genomic Hybridization (CGH array)

## Avantages

- Technique rapide et automatisable
- Résolution importante
- Analyse globale

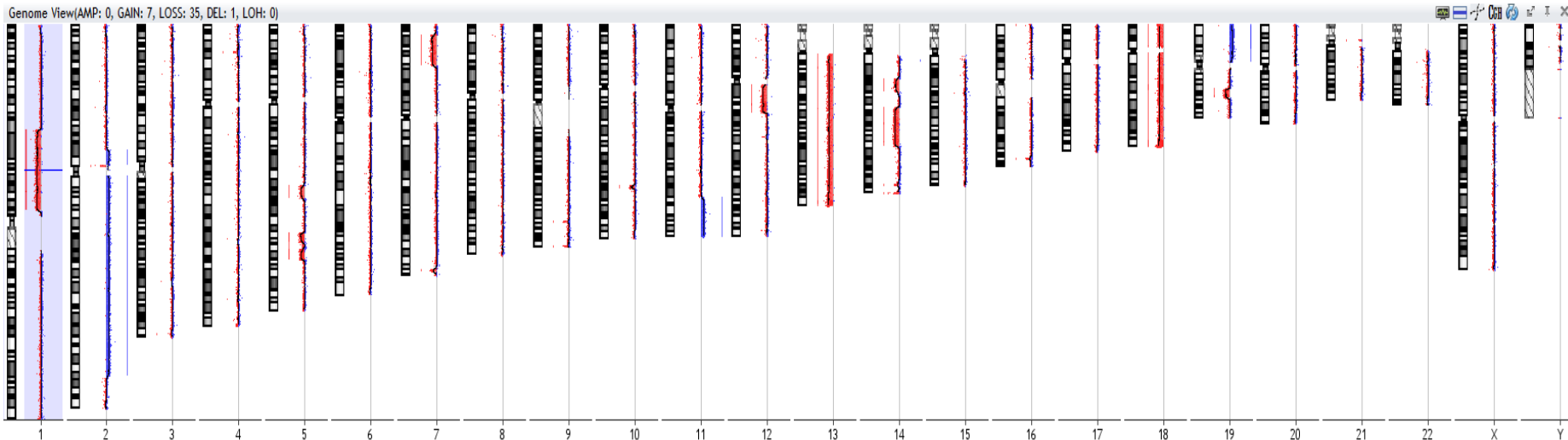
## Inconvénients

- Ne détecte que les gains et les pertes
- Ne détecte pas les clones minoritaires (<20%)

# Comparative Genomic Hybridization (CGH array)

## Indications :

- Recherche, en complément du caryotype (pathologies rares)
- Recherche, pour borner anomalie récurrente
- Quand échec de caryotype/caryotype normal : aide au diagnostic (MDS, lymphomes atypiques)



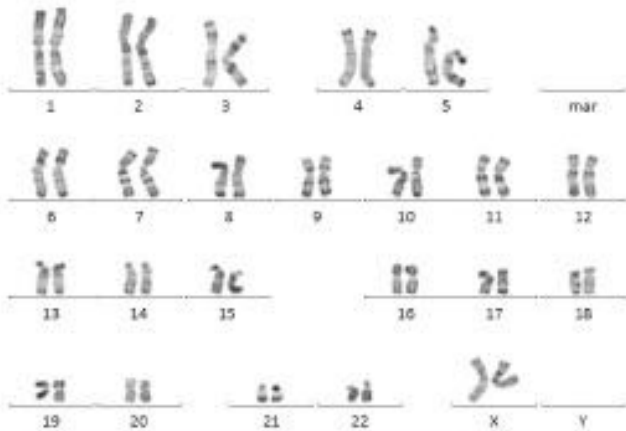
Exemple CGH : myélome atypique

# Comparative Genomic Hybridization (CGH array)

## Indications futures ? :

- En remplacement du caryotype dans les hémopathies où l'on retrouve essentiellement des pertes et des gains chromosomiques : myélodysplasies, LLC, lymphomes (combiné à la FISH)...
- Toujours la limite de l'envahissement tumoral (>20%)
- Quelle place avec le développement du NGS qui permet aussi de détecter les gains et les pertes
- Whole genome sequencing pour détecter les réarrangements équilibrés?

# Résumé des techniques de cytogénétique



## Caryotype :

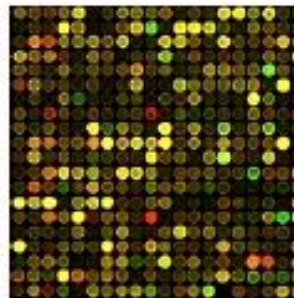
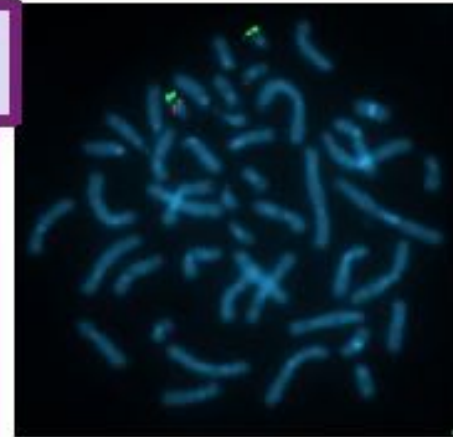
- Analyse GLOBALE
- Clone minoritaire
- Évolution clonale
- mais limite de résolution
- mais limite de échec de culture

détection

Confirmation ou si échec K

## FISH :

- Ciblée
- Résolution >
- Clone minoritaire
- Évolution clonale



## CGH :

- Analyse GLOBALE
- Résolution >
- mais que les anomalies déséquilibrées
- mais prix >

recherche



# Apport de la cytogénétique dans le bilan biologique d'une hémopathie

**Critère diagnostic:** bilan initial avant tout traitement

**Critère pronostic:** indépendant des autres critères clinico-biologiques

**Paramètre utilisé dans le suivi et l'évolution de l'hémopathie:**

- contrôle d'une rémission complète
- dépistage d'une rechute par réapparition du clone initial (+ anomalies supplémentaires)

**Apport de la cytogénétique dans le compréhension des mécanismes physiopathologiques**

## Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC)

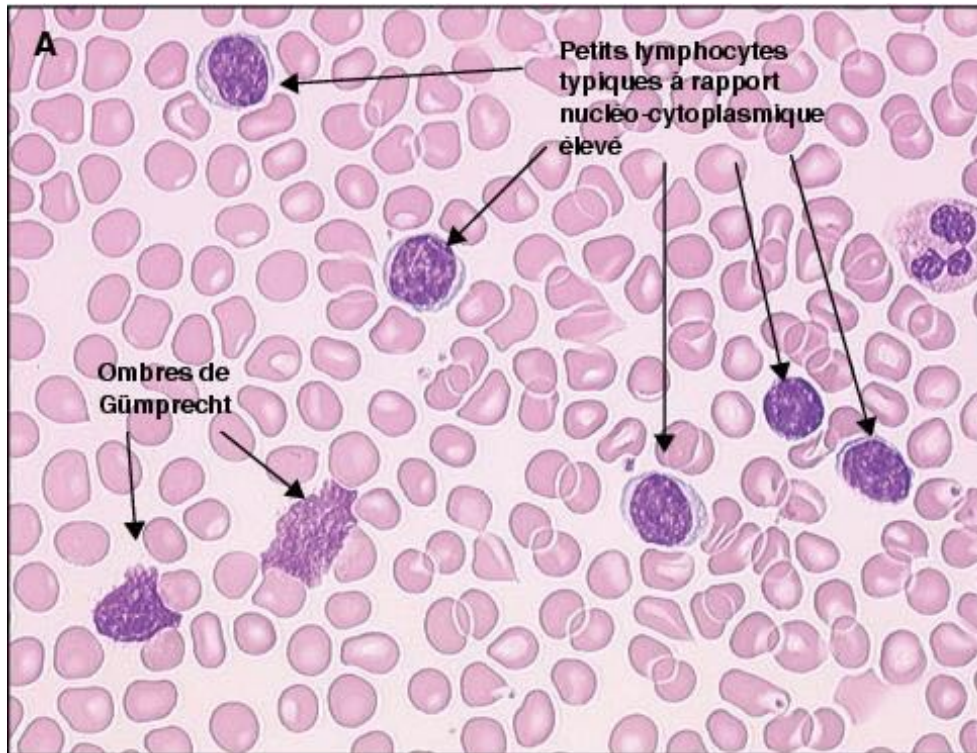
- Hémopathie la plus fréquente chez l'adulte dans les pays occidentaux
- Incidence de 5/100 000 individus
- Touche préférentiellement le sujet âgé avec une incidence supérieure à 20/100 000 individus au-delà de 70 ans.

Selon la **classification OMS 2016**, tumeurs à cellules lymphoïdes B matures, groupe LLC/lymphome lymphocytaire.

- LLC ( $>5 \cdot 10^9/L$  LB)
- Lymphocytose B monoclonale (MBL ou *monoclonal B-cell lymphocytosis*) ( $<5 \cdot 10^9/L$  LB et pas d'atteinte ganglionnaire)
- Lymphome lymphocytaire ( $<5 \cdot 10^9/L$  LB et atteinte nodulaire, splénique ou extra médullaire)

## Diagnostic : Cytologie

- Le diagnostic est le plus souvent fortuit
- La confirmation du diagnostic de LLC est biologique et se fait sur un prélèvement sanguin (**hémogramme** et **immunophénotypage** des lymphocytes).



Population monoclonale de lymphocytes morphologiquement matures de type B.

## Diagnostic : cytométrie en flux

A l'immunophénotypage, les lymphocytes B monoclonaux expriment généralement le CD19 et une IgM ou IgD dim, le CD20, CD22, CD79b ; les cellules sont également positives pour le CD5 et le CD43, le CD23 et le CD200. Le CD10 est négatif ainsi que FMC7.

Antigène	Attribuer 1 point si	Attribuer 0 point si
CD 5	Positif	Négatif
CD 23	Positif	Négatif
CD 22/ CD 79b	Faiblement exprimé ou négatif	Fortement exprimé
FMC7	Négatif	Positif
Ig de surface monotypique	Faiblement exprimée	Fortement exprimée

Score de Matutes : LLC si = 4 ou 5

## Mise en place d'un traitement : évolution clinique

**Tableau 2.** Classification de Rai (1975) [2].

Stade	Définition	Survie médiane (mois)
Stade 0	Lymphocytose sanguine (> 5 G/L)	> 150
Stade I	Lymphocytose sanguine (> 5 G/L) + adénopathies	100
Stade II	Lymphocytose sanguine (> 5 G/L) avec ou sans adénopathies + hépatomégalie ou splénomégalie	70
Stade III	Lymphocytose sanguine (> 5 G/L) + anémie (Hb < 10 g/dL) +/- stade I et II	19
Stade IV	Lymphocytose sanguine (> 5 G/L) + thrombopénie (< 100 G/L) +/- stade I, II ou III	17

**Tableau 3.** Classification internationale révisée de Binet (1981) [3].

Stade	Définition	Survie médiane
<b>Stade A</b> bon pronostic	Lymphocytose, moins de 3 aires ganglionnaires atteintes, Hb > 10 g/dL et plaquettes > 100 G/L	Comparable à la population du même âge
<b>Stade B</b> pronostic intermédiaire	Lymphocytose, plus de 3 aires ganglionnaires atteintes, Hb > 10 g/dL et plaquettes > 100 G/L	7 ans
<b>Stade C</b> mauvais pronostic	Lymphocytose, Hb < 10 g/dL et/ou plaquettes < 100 G/L, quel que soit le nombre d'aires ganglionnaires atteintes	2 ans

Au diagnostic, stade A le plus souvent : surveillance.

Un traitement est indiqué en cas d'évolution de la maladie :

- signes systémiques (asthénie, perte de poids, sueurs nocturnes, fièvre)
- syndrome tumoral volumineux,
- progression de l'hyperlymphocytose (augmentation > 50 % sur 2 mois ou un temps de doublement des lymphocytes < 6 mois)
- apparition ou d'aggravation d'une insuffisance médullaire.

Evolution très variable selon les patients

The New England Journal of Medicine

## GENOMIC ABERRATIONS AND SURVIVAL IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

HARTMUT DÖHNER, M.D., STEPHAN STILGENBAUER, M.D., AXEL BENNER, M.Sc., ELKE LEUPOLT, M.D., ALEXANDER KRÖBER, M.D., LARS BULLINGER, M.D., KONSTANZE DÖHNER, M.D., MARTIN BENTZ, M.D., AND PETER LICHTER, PH.D.

**TABLE 1.** INCIDENCE OF CHROMOSOMAL ABNORMALITIES IN 325 PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA.

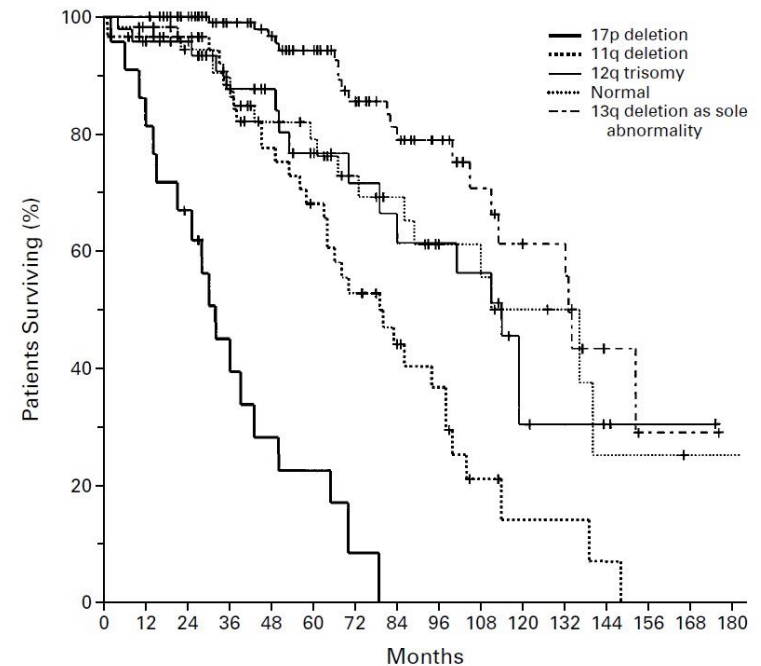
ABERRATION	NO. OF PATIENTS (%)*
13q deletion	178 (55)
11q deletion	58 (18)
12q trisomy	53 (16)
17p deletion	23 (7)
6q deletion	21 (6)
8q trisomy	16 (5)
t(14q32)	12 (4)
3q trisomy	9 (3)
Clonal abnormalities	268 (82)
Normal karyotype	57 (18)

\*One hundred seventy-five patients had one aberration, 67 had two aberrations, and 26 had more than two aberrations.

**TABLE 2.** RESULTS OF COX REGRESSION ANALYSIS OF SURVIVAL TIME FROM DIAGNOSIS (FINAL MODEL).\*

VARIABLE	HAZARD RATIO FOR DEATH (95% CI)
17p deletion	8.08 (4.24–15.40)
Binet stage	
B vs. A	1.27 (0.76–2.13)
C vs. A	3.77 (1.64–8.66)
Age (10-yr increment)	
No 11q deletion	2.04 (1.56–2.67)
11q deletion	1.12 (0.74–1.69)
11q deletion	
Age 55 yr	2.89 (1.73–4.84)
Age 65 yr	1.58 (0.91–2.76)
Lactate dehydrogenase (increment of 50 IU/liter)	1.30 (1.10–1.53)
White-cell count (increment of 20,000/mm <sup>3</sup> )	1.08 (1.01–1.15)

\*Hazard ratios and confidence intervals (CIs) are computed for a 10-year increment in age, dependent on 11q deletion; for 11q deletion at the age of 55 and 65 years; for an increment of 50 IU per liter in lactate dehydrogenase; and for an increment of 20,000 per cubic millimeter in the white-cell count.



**Impact pronostic négatif de la del17p et de la del 11q**

# Marqueurs moléculaires

## Impact de la délétion et de la mutation de TP53

### p53 Gene Mutation in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Is Associated With Drug Resistance and Is Independent of MDR1/MDR3 Gene Expression

By Soumaya El Rouby, Anju Thomas, Dan Costin, Carl R. Rosenberg, Milan Potmesil, Robert Silber, and Elizabeth W. Newcomb

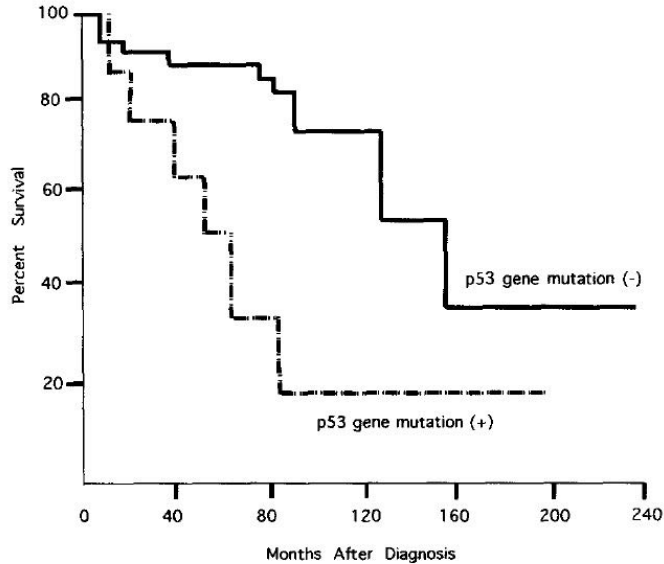
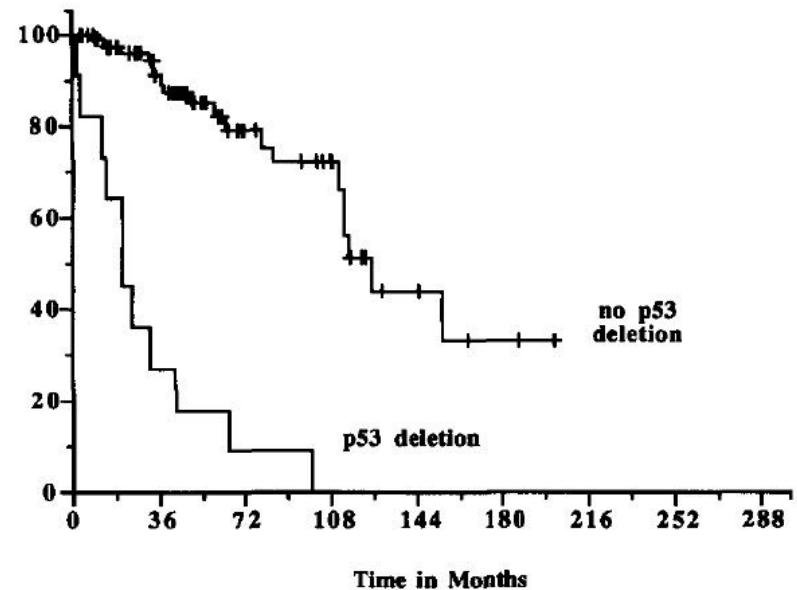


Fig 3. Kaplan-Meier survival curves after diagnosis of B-CLL based on the presence or absence of p53 gene mutations.

### p53 Gene Deletion Predicts for Poor Survival and Non-Response to Therapy With Purine Analogs in Chronic B-Cell Leukemias

By Hartmut Döhner, Konstanze Fischer, Martin Bentz, Katrin Hansen, Axel Benner, Georges Cabot, Daniela Diehl, Richard Schlenk, Johannes Coy, Stephan Stilgenbauer, Martin Volkmann, Peter R. Galle, Annemarie Poustka, Werner Hunstein, and Peter Lichter



# Marqueurs moléculaires

## Intérêt du caryotype : recommandations du GFCH

**Tableau 1.** Indications du caryotype et de la FISH dans la LLC.

Diagnostic	Indispensable/ obligatoire	Recommandé	Optionnel/ protocole
Caryotype FISH		del(11)(q22)( <i>ATM</i> ) del(17)(p13)( <i>TP53</i> )	x Gain 2p (2p16( <i>REL</i> ), 2p24( <i>MYCN</i> )...) del(6)(q21) Gain/translocation 8q24( <i>MYC</i> ) del(11)(q22)( <i>BIRC3</i> ) tri12 del(13)(q14) (D13S319) translocation <i>IG</i>
Avant traitement (1 <sup>re</sup> ligne ou rechute)	Indispensable/ obligatoire	Recommandé	Optionnel/ protocole
Caryotype FISH	del(17)(p13)( <i>TP53</i> )	x del(11)(q22)( <i>ATM</i> )	x Gain 2p (2p16( <i>REL</i> ), 2p24( <i>MYCN</i> )...) del(6)(q21) Gain/translocation 8q24( <i>MYC</i> ) del(11)(q22)( <i>BIRC3</i> ) tri12 del(13)(q14) (D13S319) translocation <i>IG</i>

Caryotype : réalisé sur le sang périphérique, stimulation CpG-ODN +IL2, temps de culture recommandé : 72 h. En cas d'échec, le tenter à nouveau. Si la LLC est atypique (score de Matutes = 3), le caryotype devient alors obligatoire au diagnostic. Si autre syndrome lymphoprolifératif circulant : voir chapitre Lymphome. Caryotype sur moelle osseuse en cas de suspicion de myélodysplasie : voir chapitre MDS. *IG* : gènes des immunoglobulines : 14q32 (*IGH*), 2p12 (*IGK*), 22q11 (*IGL*).



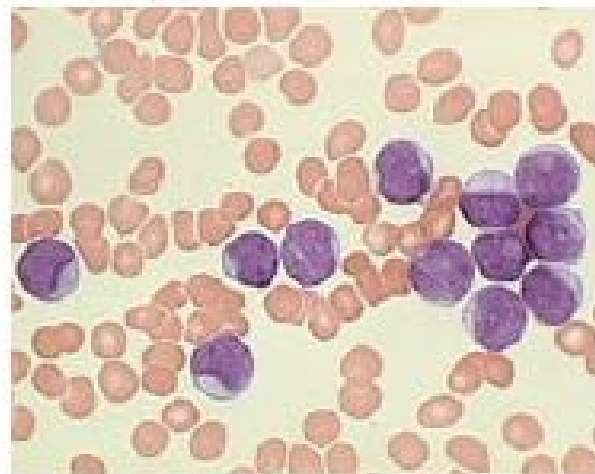
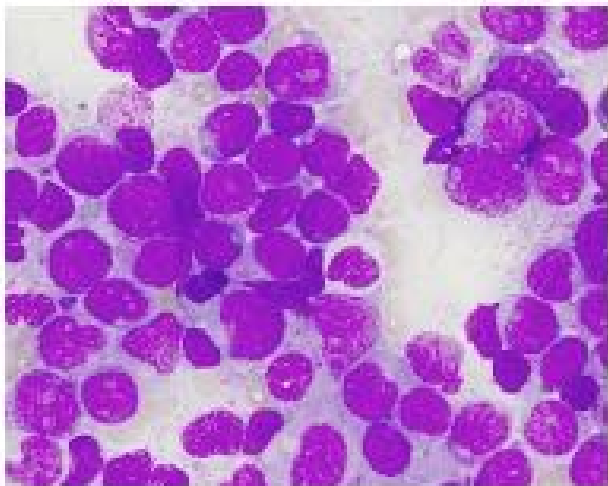
## Leucémies aigües myéloblastiques

Ensemble de proliférations malignes aboutissant à l'accumulation dans la moelle, le sang et éventuellement d'autres organes, de progéniteurs des cellules sanguines de nature myéloïde (les « blastes »), qui ont perdu totalement ou partiellement leur capacité à se différencier.

Environ 3000 nouveaux cas de LAM/an en France.

Incidence = 4 à 5 nouveaux cas/100 000 H /an. H/F = 1.5.

Age médian de présentation : 70 ans.



# Classification OMS 2016 des LAM.

## 1. LAM AVEC ANOMALIES CYTOGÉNÉTIQUES RÉCURRENTES

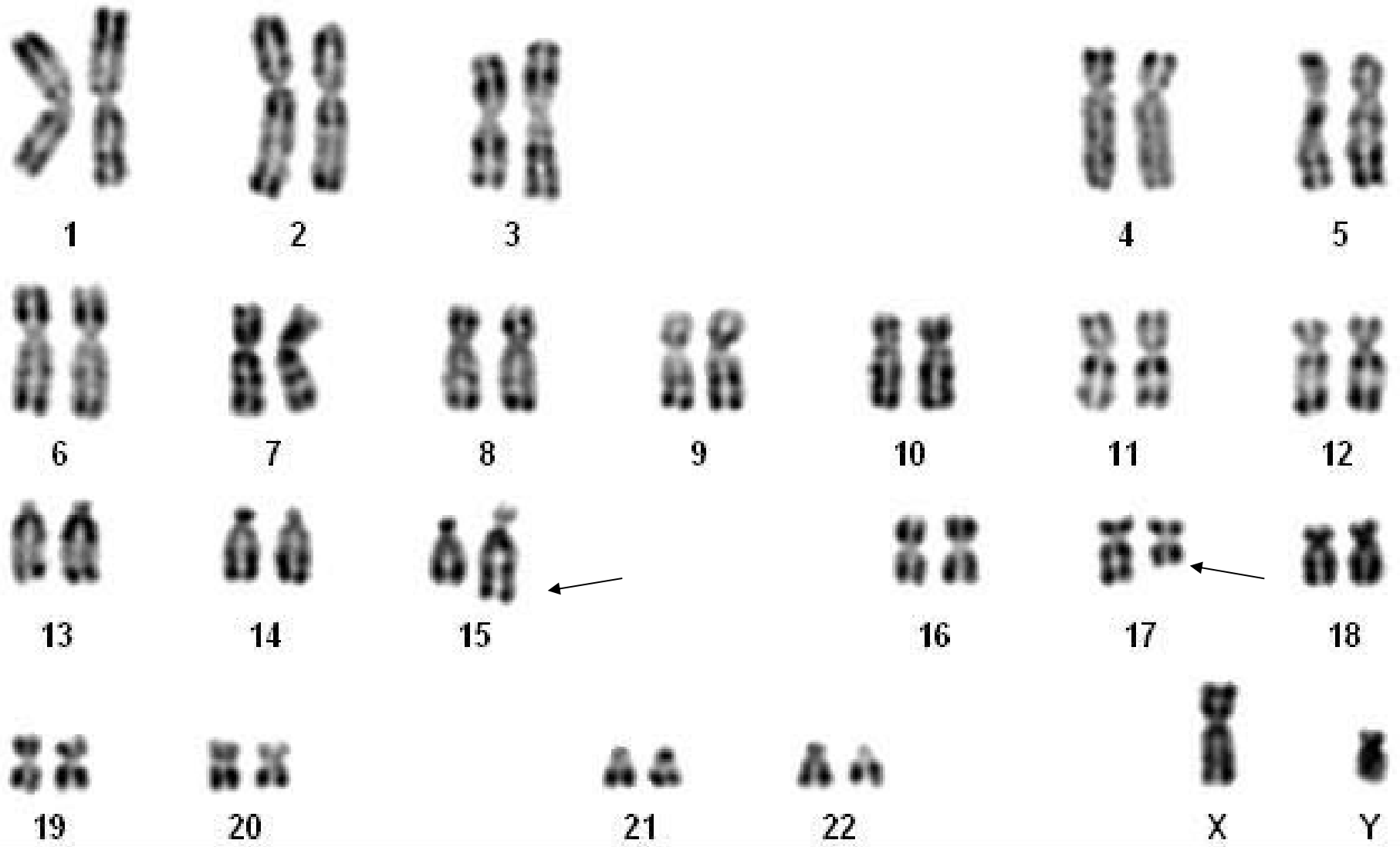
- LAM avec t(8;21) (q22;q22) ; RUNX1 - RUNX1T1
- LA promyélocytaire avec PML – RARA
- LAM avec inv(16) (p13.1q22) ou t(16 ;16) (p13.1q22) ; CBFβ - MYH11
- LAM avec t(9;11) (p22;q23) ; MLLT3 - KMT2A (MLL)
- LAM avec t(6;9) (p23;q34) ; DEK - NUP214
- LAM avec inv(3) (q21q26.2) ou t(3;3) (q21;q26.2) ; GATA2, MECOM
- LAM (mégacaryoblastique) avec t(1;22) (p13;q13) ; RBM15 – MKL1
- LAM avec mutation NPM1
- LAM avec mutation bi allélique CEBPA

## 2. LAM AVEC ANOMALIES ASSOCIÉES AUX MYÉLODYSPLASIES

## 3. NÉOPLASIES MYÉLOÏDES POST CHIMIOTHÉRAPIE

## 4. LAM SANS AUTRE SPÉCIFICATION PAR AILLEURS (NOS)

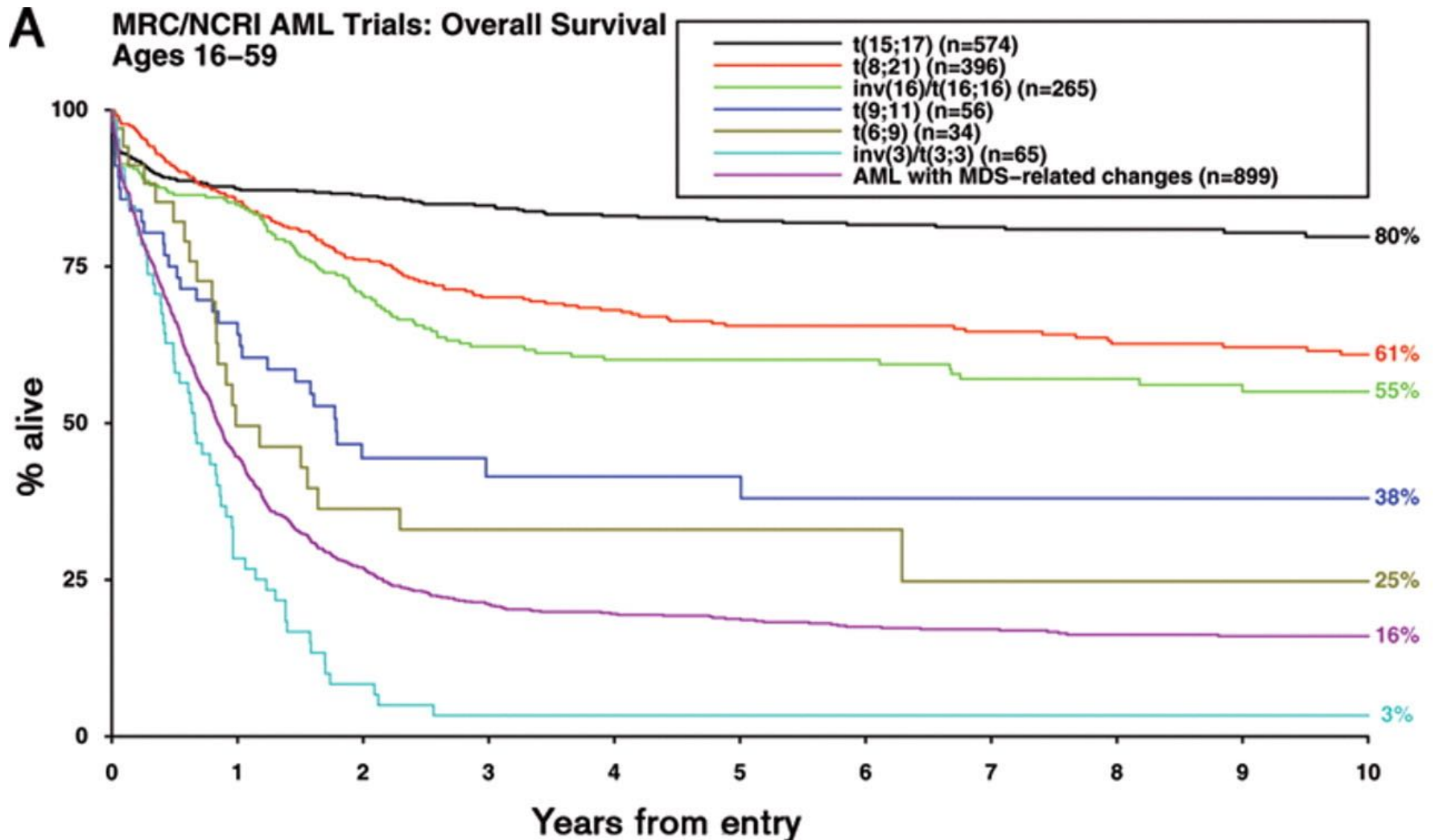
- LA Myéloblastique avec différenciation minimale
- LA Myéloblastique sans maturation
- LA Myéloblastique avec maturation
- LA myélomonocytaire
- LA monoblastique / monocytaire
- LA érythroïde pure [l'érythroleucémie (= ancienne LAM6) disparaît en 2016]
- LA mégacaryoblastique
- LA Myéloblastique à composante basophile
- LA avec myélofibrose (panmyélose aiguë)



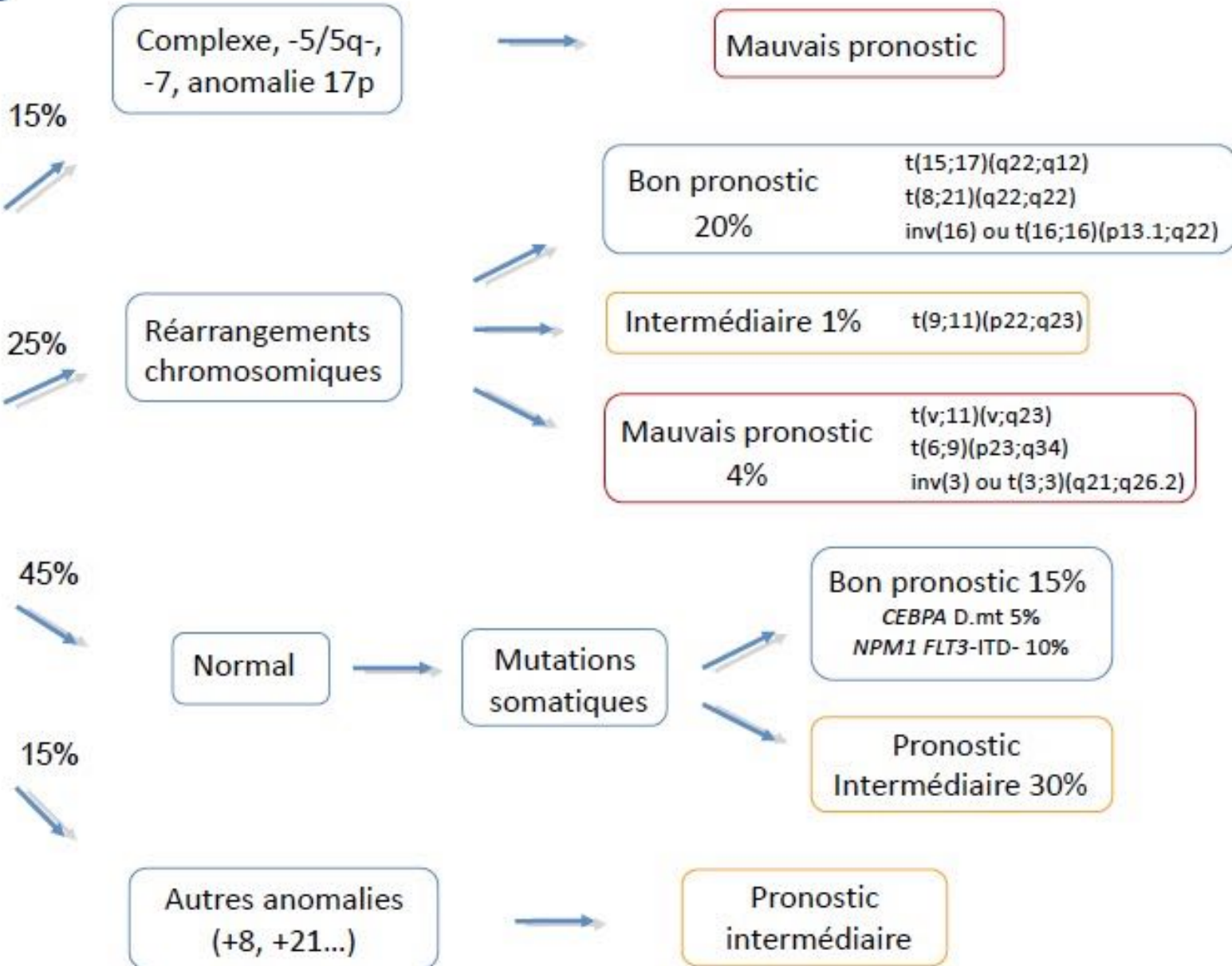
LAM3 : t(15;17)(q24.1;q21.2)

# Impact of karyotype on outcome in younger adults with AML (AML10, AML12, AML15)

## Survie globale

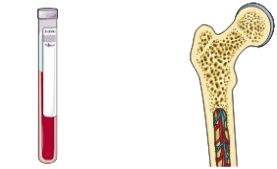


# Caryotype

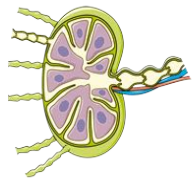


# Le circuit du prélèvement en onco-hématologie

**Prélèvement  
tissu ou cellules  
hématopoïétiques**



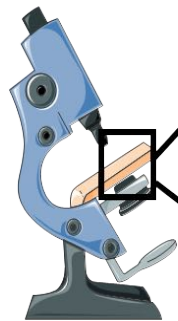
*sang moelle osseuse*



*ganglion*

Hématologue  
Radiologue, chirurgie

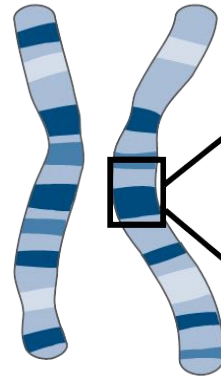
**Cellule ou  
Tissus**



**Cytologie  
Anatomo-pathologie**

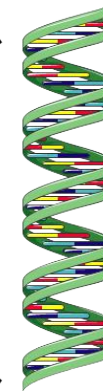
Biologiste, anatomopathologiste

**Chromosome**



**Cytogénétique**

**Acides  
nucléiques**



**Biologie  
moléculaire**



Centre de  
ressources  
biologiques

# Généralités sur le génome

Le mot **génome** désigne l'ensemble de l'information héréditaire d'un organisme présente en totalité dans chaque cellule.

Le support matériel de l'information génétique est l'**ADN** (A, T, G et C) plus rarement l'**ARN** (A, U, G et C)

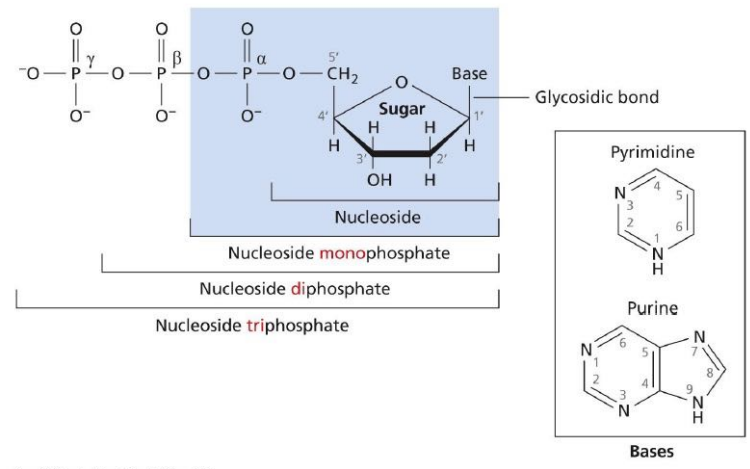


Figure 4.1 Molecular Biology (© Garland Science 2016)

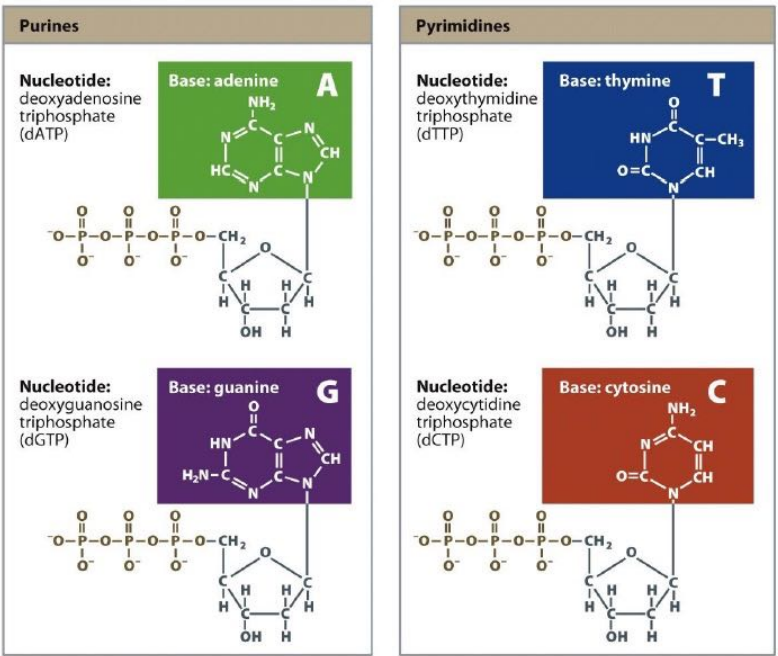


Figure 2.3 Human Evolutionary Genetics, 2nd ed. (© Garland Science 2014)

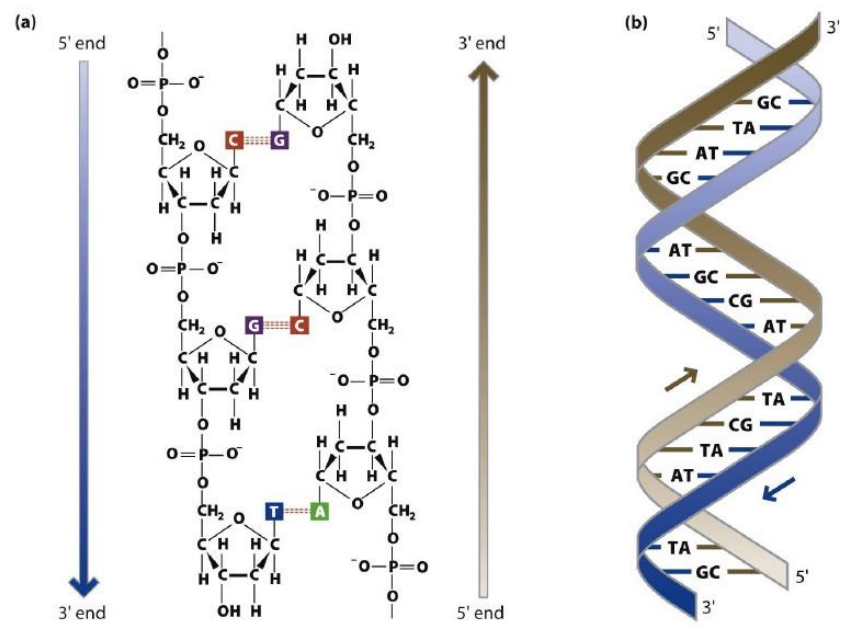
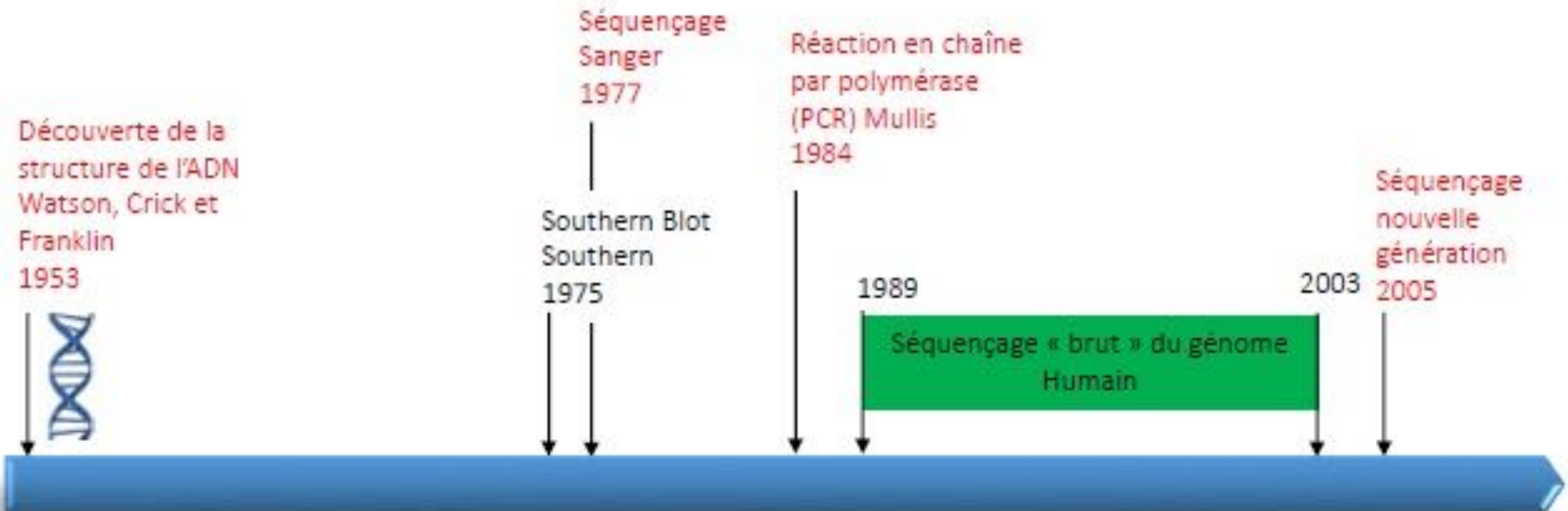
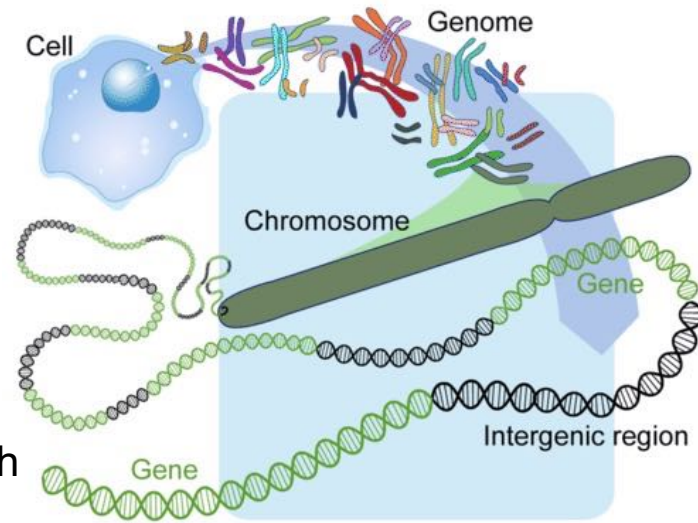


Figure 2.4 Human Evolutionary Genetics, 2nd ed. (© Garland Science 2014)

## De l'ADN au génome

- Histoire du séquençage...
  - Sanger :
    - migration en cuve → 1kb par lecture en 6-8h
    - séquenceurs capillaire → 300 kb par lecture en 3h
  - Séquençage « nouvelle génération » : NGS
    - Génome humain → 3Gb en 48h
  - (Séquençage de 3<sup>ème</sup> génération)



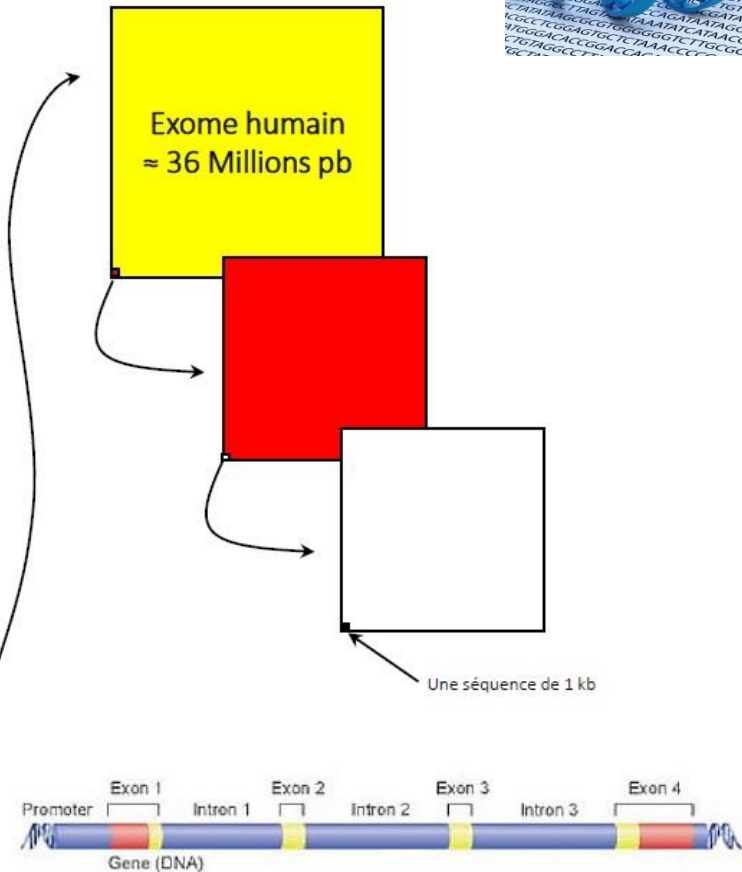


## Différentes échelles



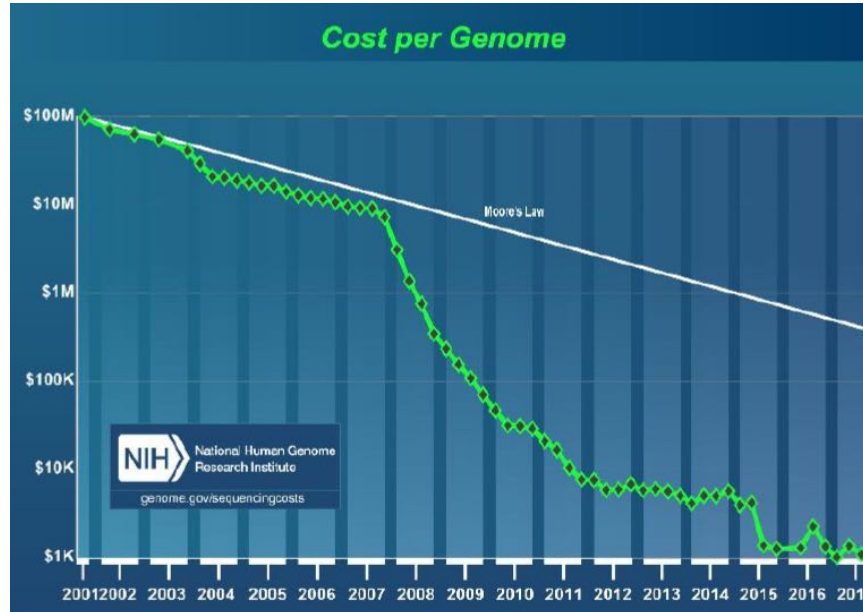
Exome humain  
≈ 36 Millions pb

An arrow points from a small yellow square at the bottom right corner of the large blue square to the text "Exome humain ≈ 36 Millions pb".



## Etude du génome

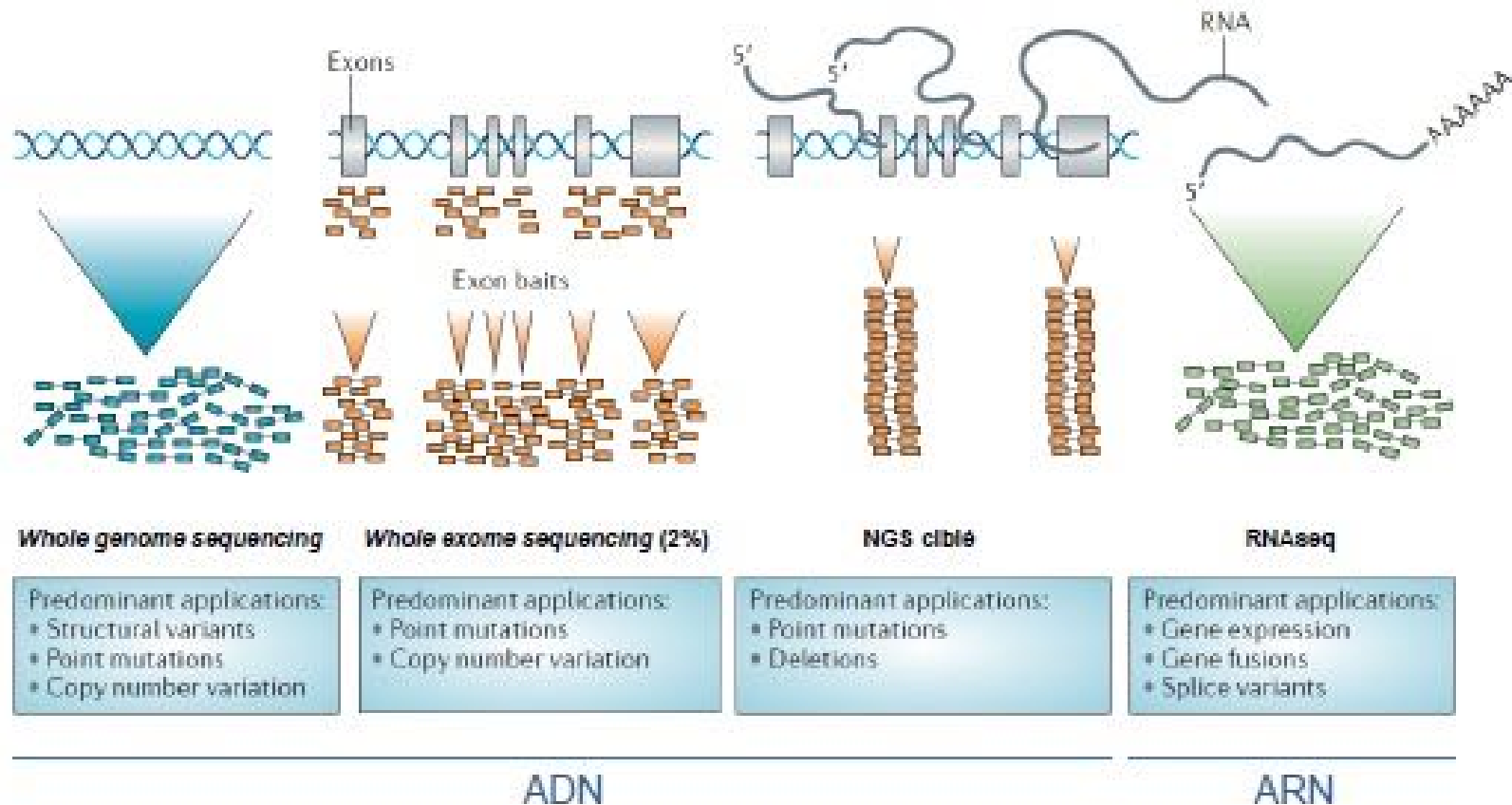
Genome sequenced	HGP (2003)	Waston (2008)	2017
Time taken (start to finish)	13 years	4.5 months	2 days
Number of scientists listed as authors	> 2 800	26	-
Cost of sequencing (start to finish)	2.7 billion \$	# 1.5 million \$	# 1 000 \$



<https://www.genome.gov/sequencingcostsdata/>

## Les différentes applications du séquençage à haut débit

- Quelques exemples



## Les différentes technologies disponibles



illumina®



Genome Analyzer



SOLID 3 System



ion torrent  
by life technologies™



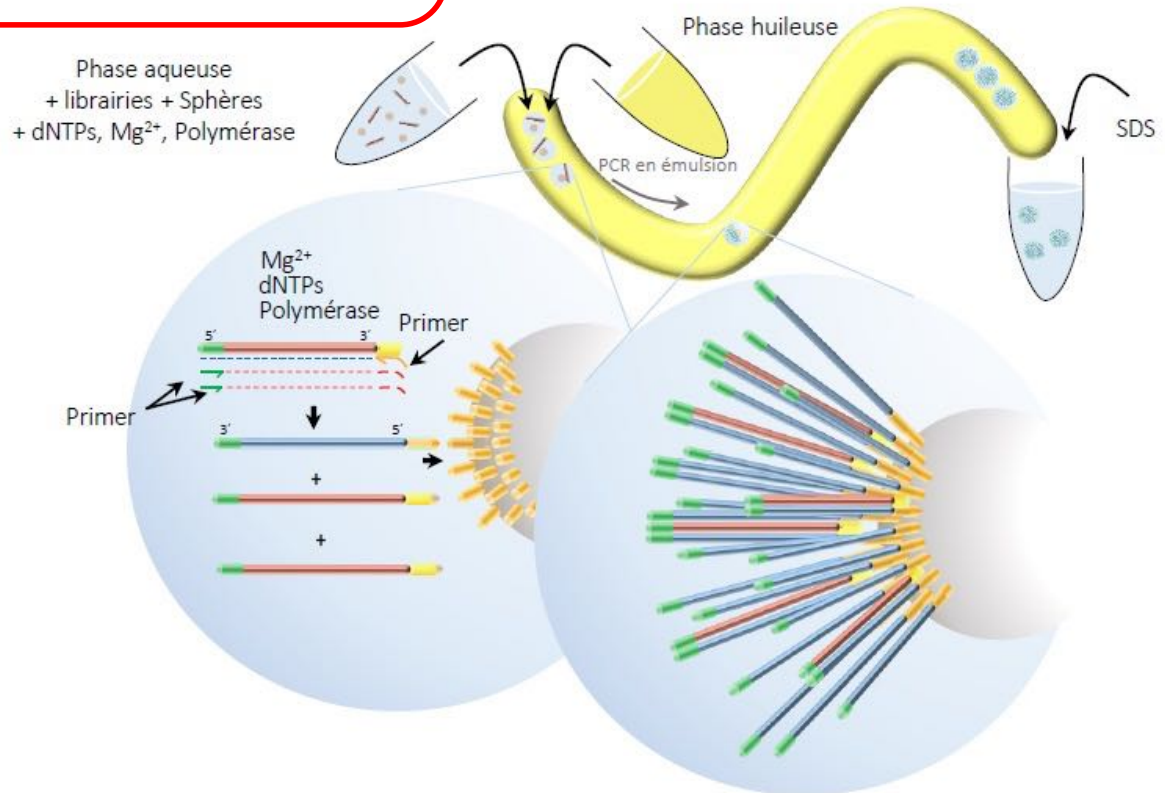
Ion PGM



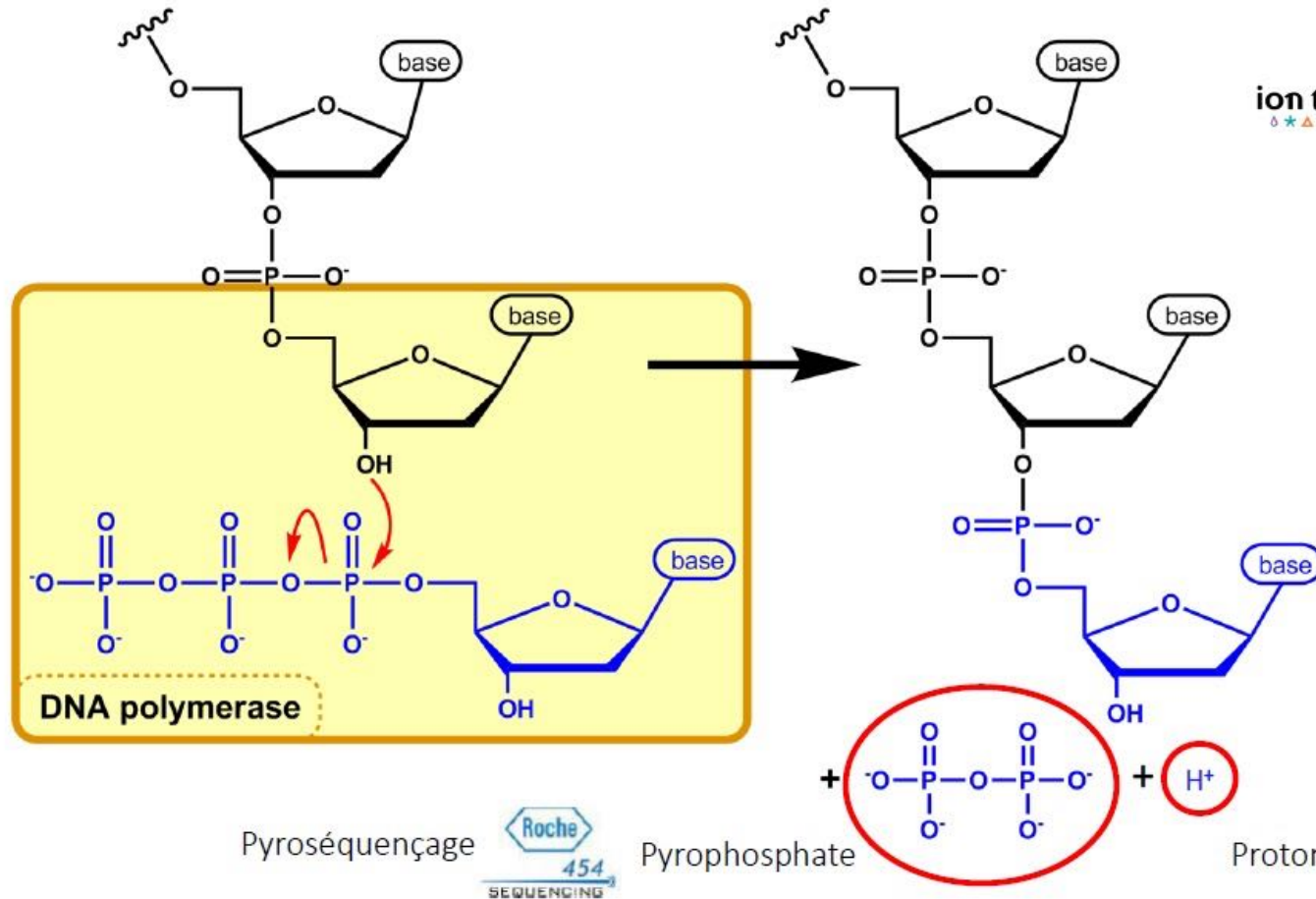
# Amplification des librairies



⇒ PCR en émulsion



## Diversité d'approches techniques



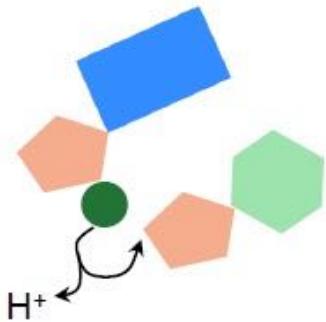
- Quantification des produits libérés lors de la réaction de séquençage

## Ion technologie

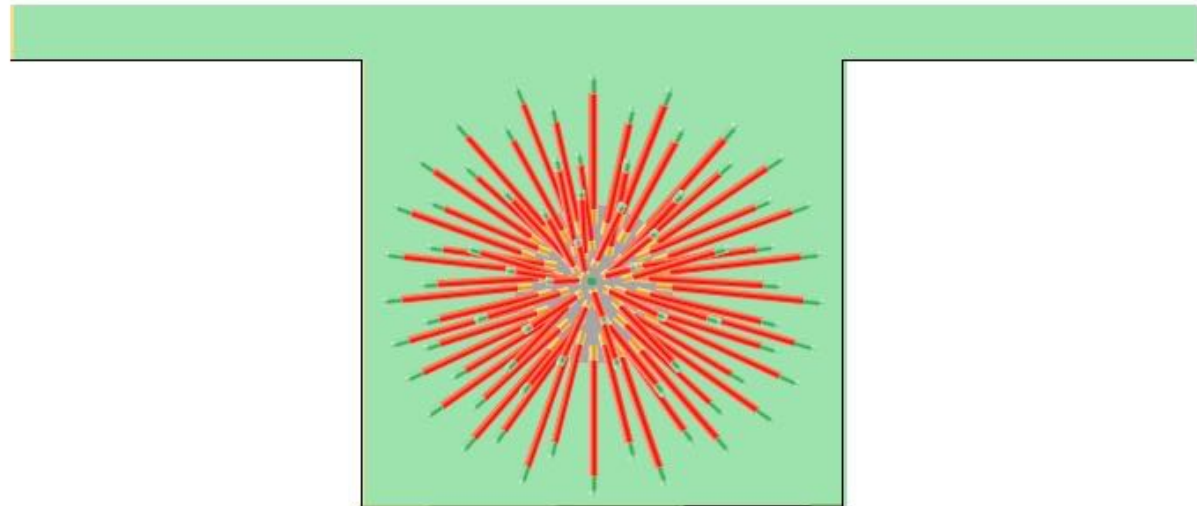


Ion PGM

**ion torrent**  
by life technologies



- ⇒ « bains » successifs de chaque dNTP (A, T, C, G)
- ⇒ Détection de la variation de pH

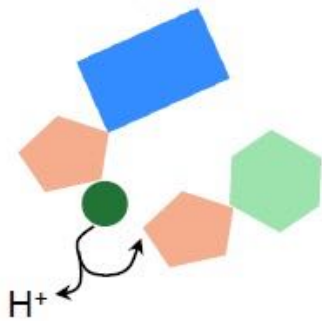


A

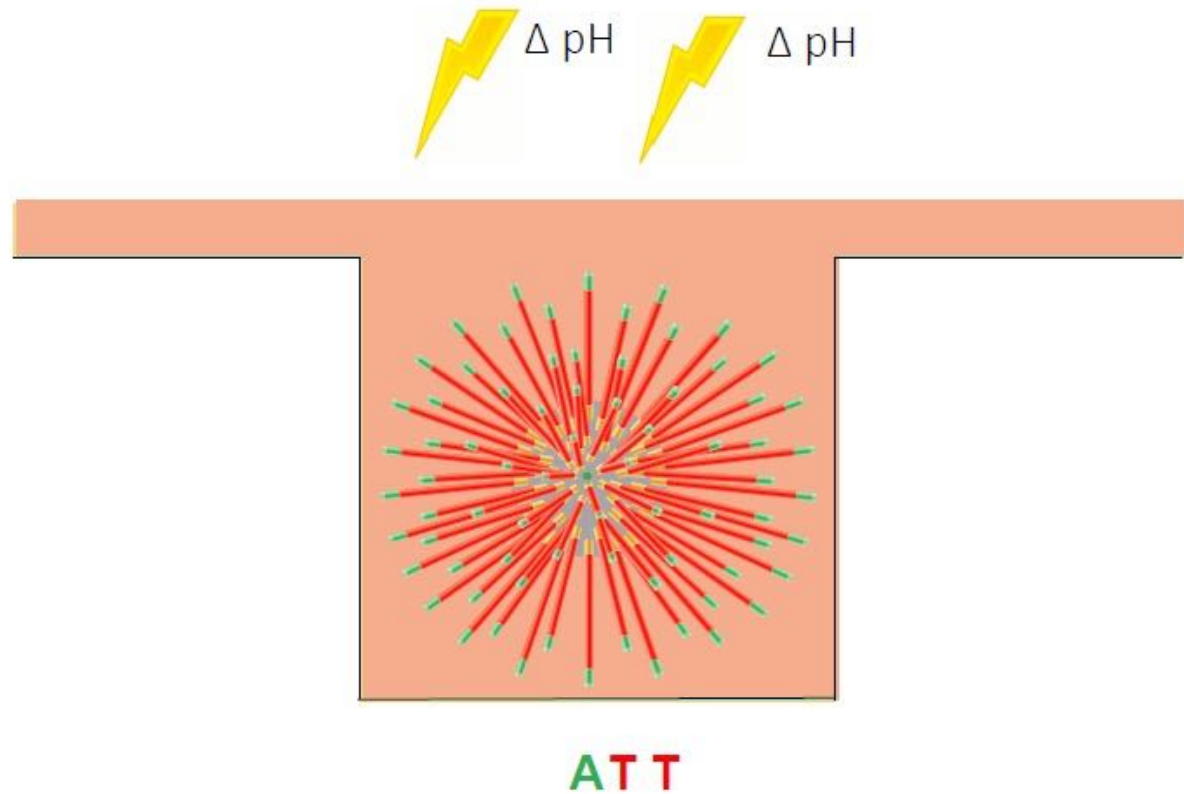
## Ion technologie



Ion PGM



- ⇒ « bains » successifs de chaque dNTP (A, T, C, G)
- ⇒ Détection de la variation de pH

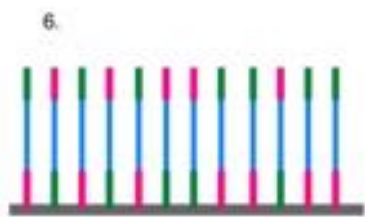
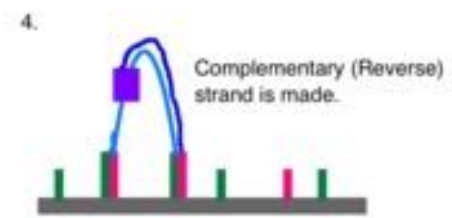
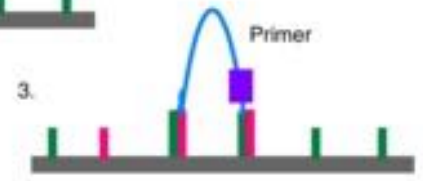
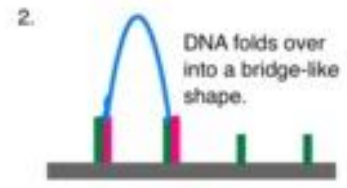
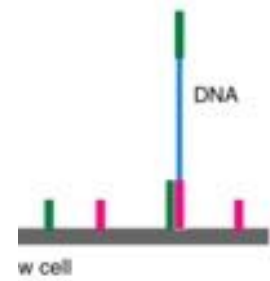
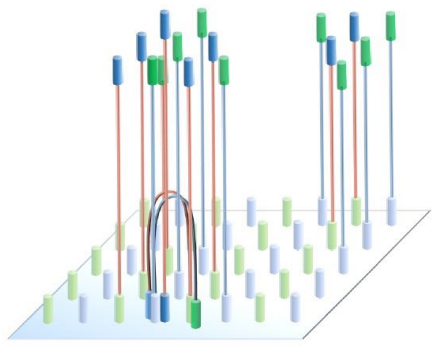




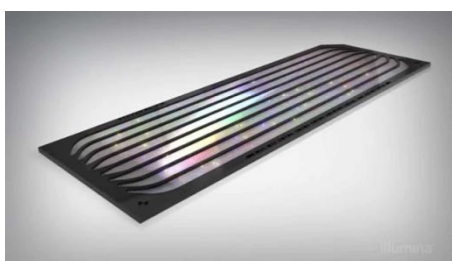
## Diversité d'approches techniques – Illumina®



Amplification des librairies (Illumina/Solexa)



Clonal copies of both forward and reverse strand in a cluster.



Illumina

# Diversité d'approches techniques – Illumina®

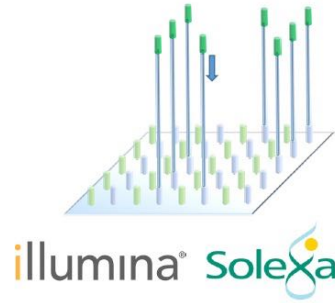
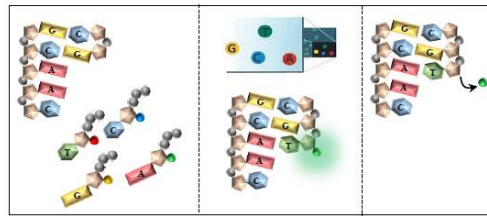
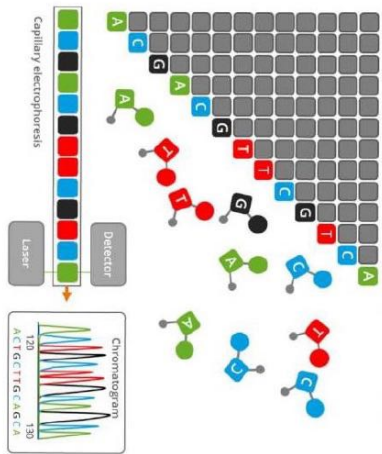
illumina®



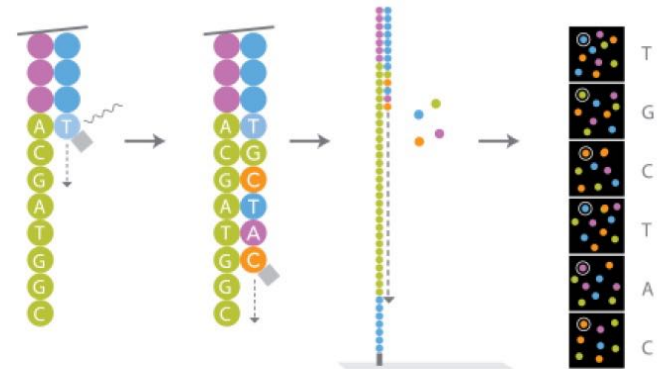
Genome Analyzer

Solexa

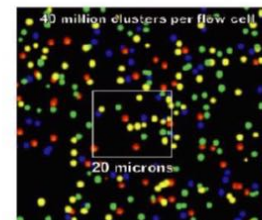
Sanger « vertical » (Illumina/Solexa)



Données brutes de séquençage



- Séquençage par synthèse
- Fluorescence



⇒ Caméra de haute précision

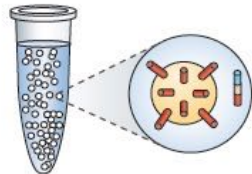
## Diversité d'approches techniques

### a Emulsion PCR (454 (Roche), SOLiD (Thermo Fisher), GeneReader (Qiagen), Ion Torrent (Thermo Fisher))

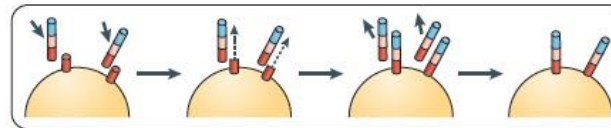
ion torrent  
by Life technologies



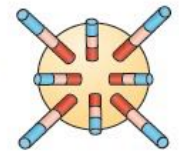
Ion PGM



**Emulsion**  
Micelle droplets are loaded with primer, template, dNTPs and polymerase



**On-bead amplification**  
Templates hybridize to bead-bound primers and are amplified; after amplification, the complement strand disassociates, leaving bead-bound ssDNA templates



**Final product**  
100-200 million beads with thousands of bound template

### b Solid-phase bridge amplification (Illumina)

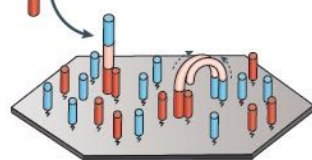
illumina



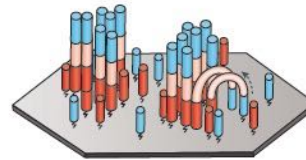
Genome Analyzer



**Template binding**  
Free templates hybridize with slide-bound adapters

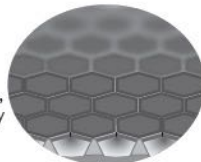


**Bridge amplification**  
Distal ends of hybridized templates interact with nearby primers where amplification can take place



**Cluster generation**  
After several rounds of amplification, 100-200 million clonal clusters are formed

**Patterned flow cell**  
Microwells on flow cell direct cluster generation, increasing cluster density

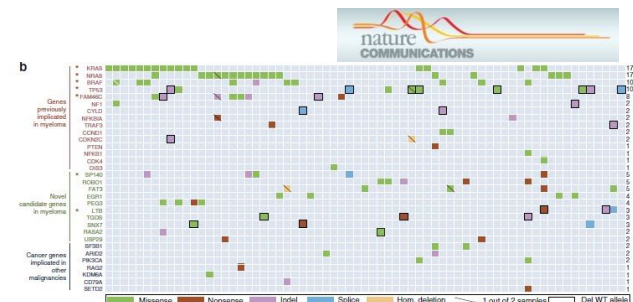
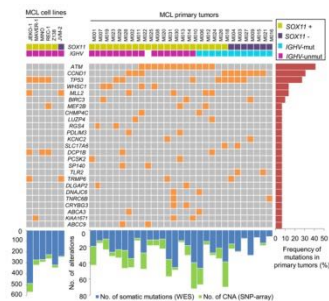


## La course au développement



## Le NGS en onco-hématologie

- Différents panels en fonction de la maladie
  - LAM
  - SMD
  - SMP
  - LAL
  - LLC
  - MM
  - ...
- Etude des paysages mutationnels



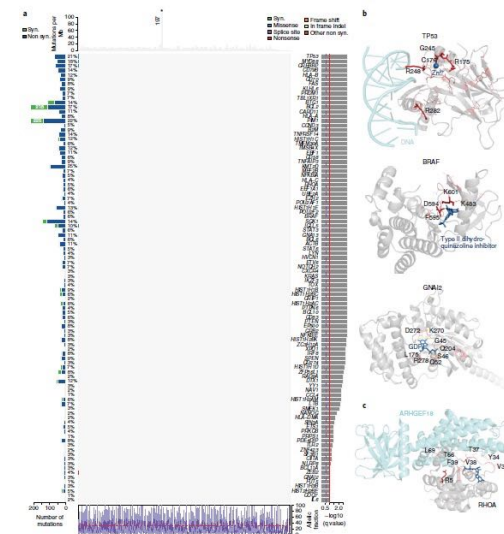
### ARTICLE

Received 18 Jul 2013 | Accepted 25 Nov 2013 | Published 16 Jan 2014

DOI: 10.1038/ncomms3997

OPEN

## Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma



nature  
medicine

RESOURCE

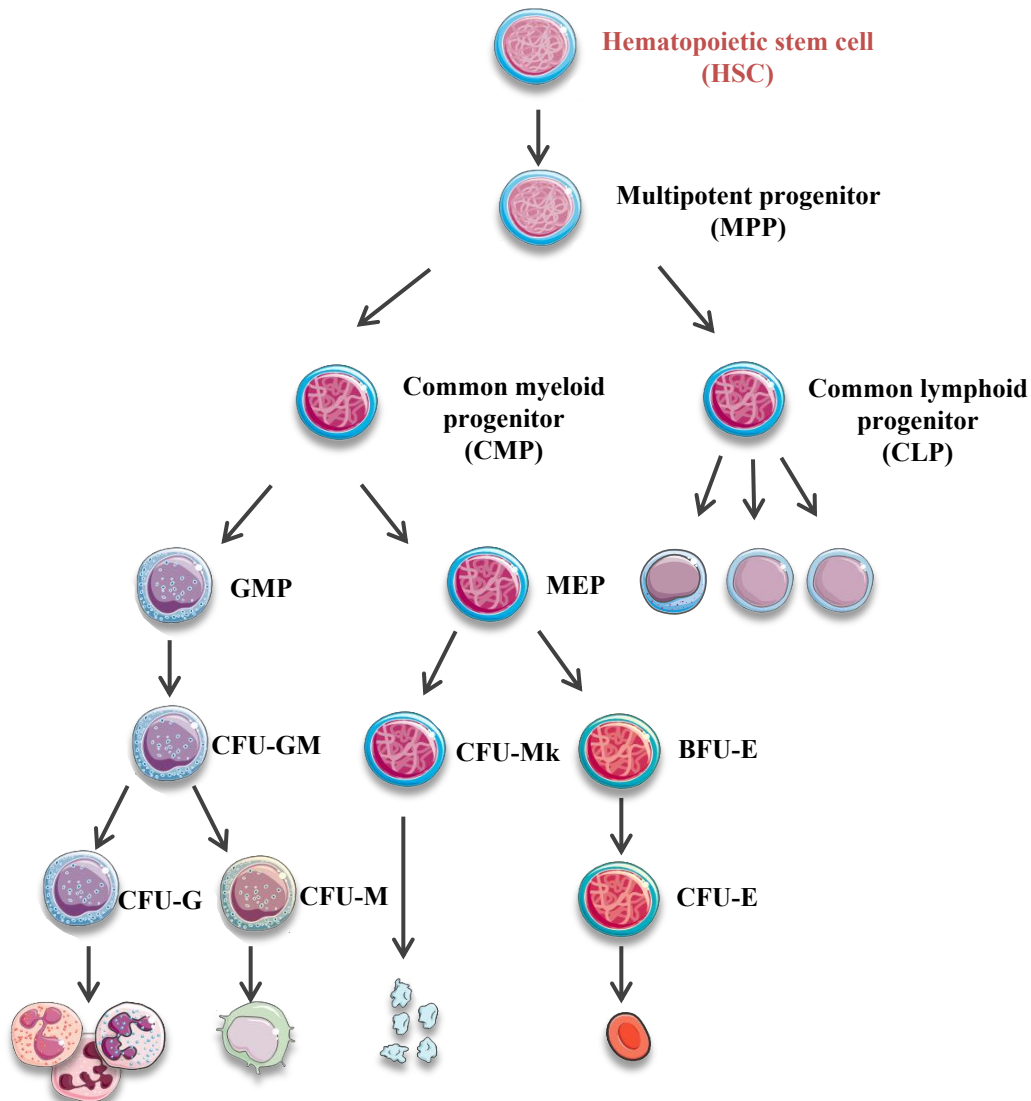
https://doi.org/10.1038/44191-018-0016-8

Corrected: Publisher Correction; Author Correction

## Landscape of somatic mutations and clonal evolution in mantle cell lymphoma

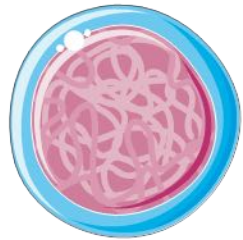
Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes

## Les SMD



- Sujet âgé (âge médian = 70 ans)
- Incidence 4-5/100 000 habitants/an
- Hémopathies myéloïdes hétérogènes
  - Hématopoïèse inefficace
  - Dysplasie
  - Cytopénies
- Maladie de la CSH :
  - Anomalies cytogénétiques (<50%)
  - Anomalies moléculaires (>80%)

**SMD** : Hémopathies myéloïdes hétérogènes  
Syndrome pré leucémique



**CSH « normale »**  
(âgée...)

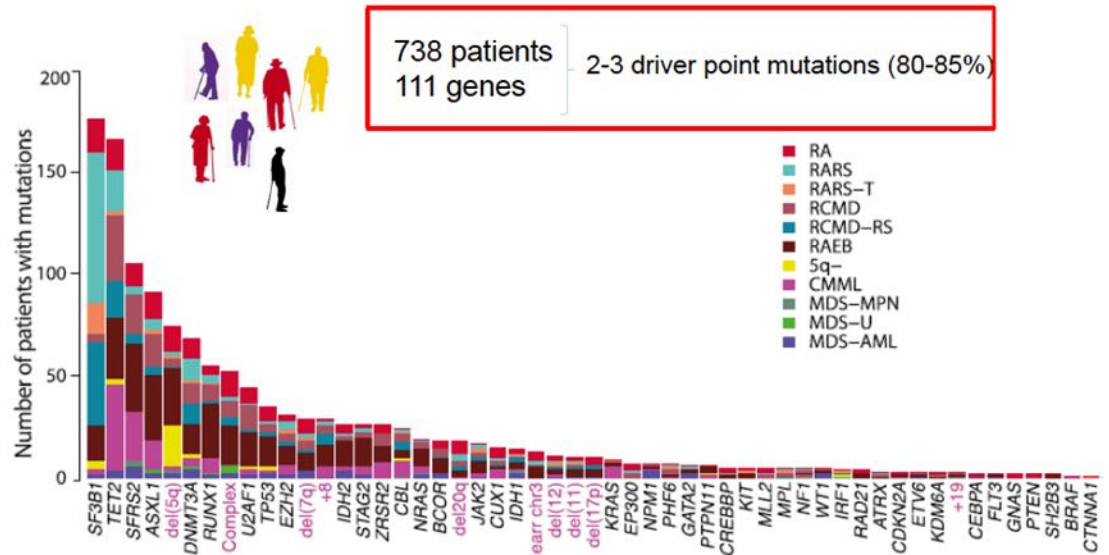
Accumulation de mutations

Hétérogénéité des populations cellulaires définissant « une architecture clonale »

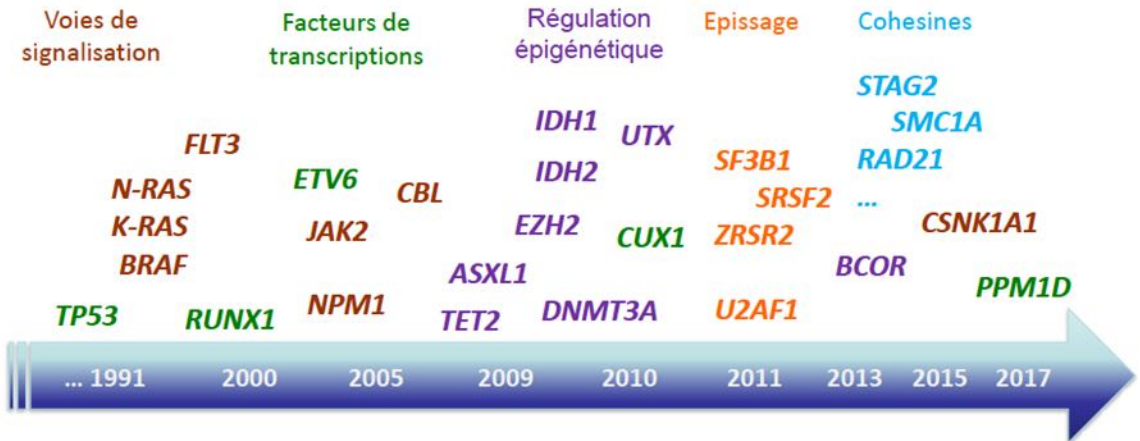
**CSH pathologique : SMD**



40% Transformation en LAM



*Papaemmanuil et al, Blood 2013*

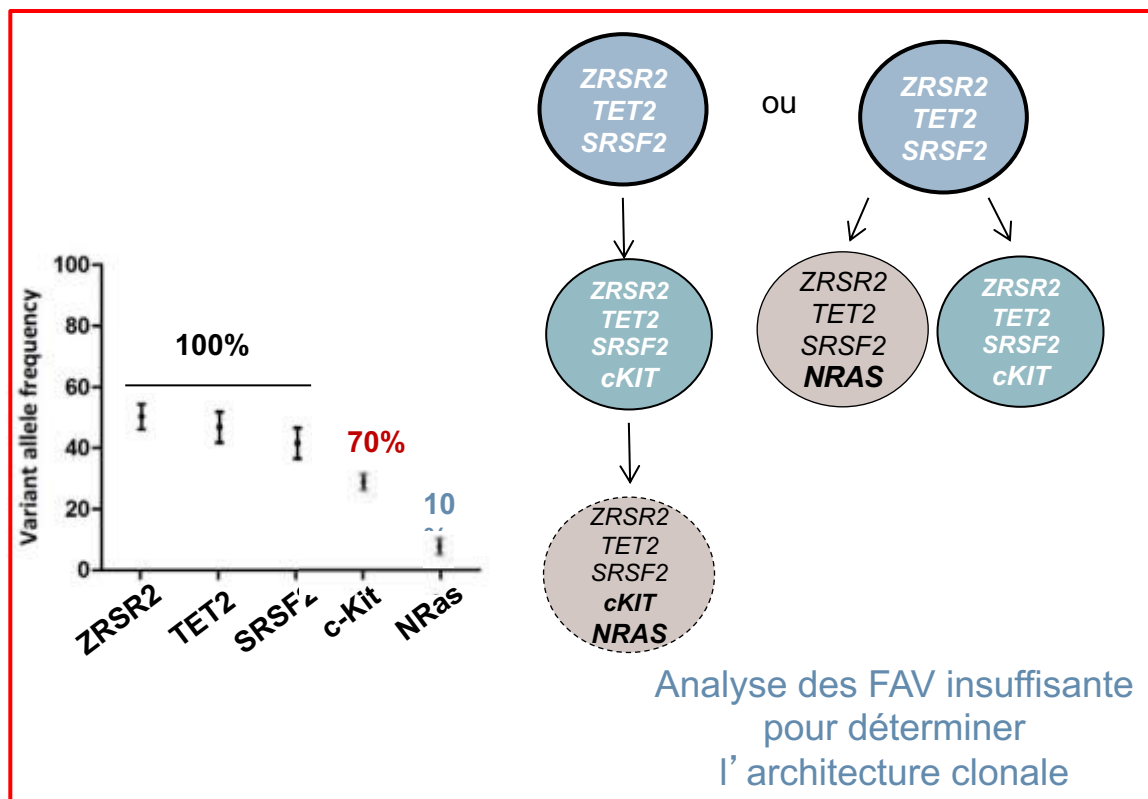
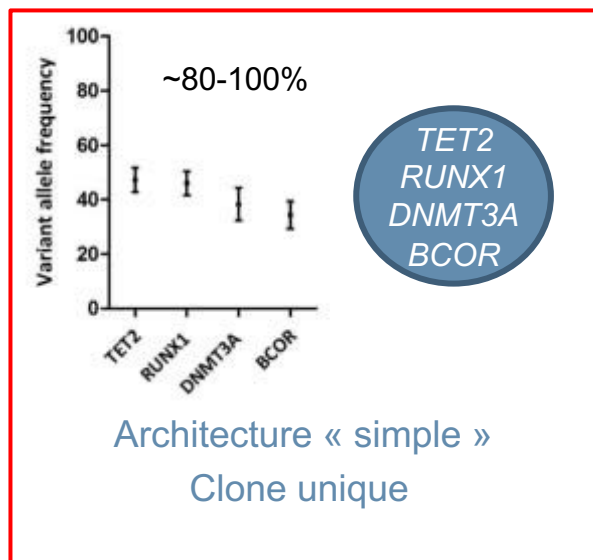


## Intérêts du NGS ?

- Séquençage exhaustif (+/- )
  - Impact
    - diagnostic +/-
    - pronostic +++,
    - thérapeutique
- Approche architecture clonale
  - Fréquence d'allèle variant



Chesnais et al. Blood, 2015





# Impact diagnostic

- A priori non
  - Mutations chez individus normaux
    - CHIP : Clonal Hematopoiesis of Indermined Potential
  - Mais ...
    - Tous les gènes ne sont pas concernés
    - !!! Fréquence d'allèle variant
      - Proposition de seuil à 2% pour définir le CHIP (Blood, 2015)
    - Conditionne le développement d'une hémopathie chez les sujets normaux (NEJM 2014)

ORIGINAL ARTICLE

## Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes

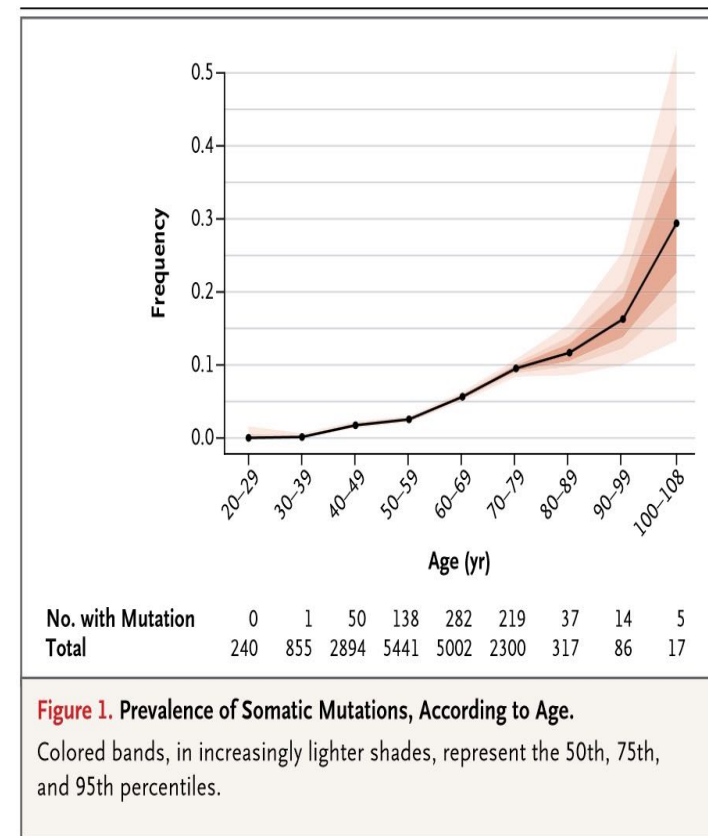
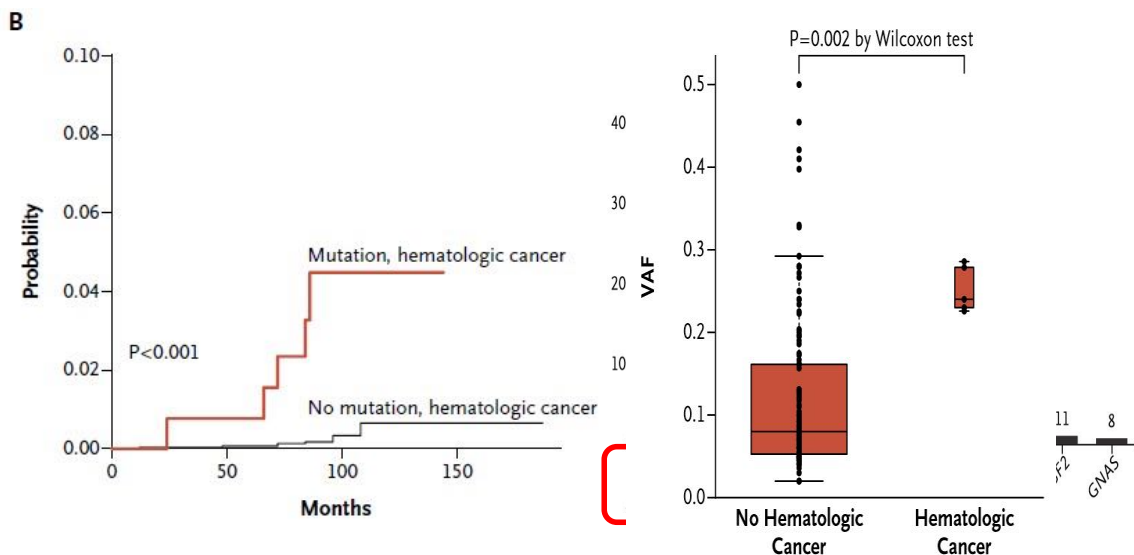


Figure 1. Prevalence of Somatic Mutations, According to Age.

Colored bands, in increasingly lighter shades, represent the 50th, 75th, and 95th percentiles.



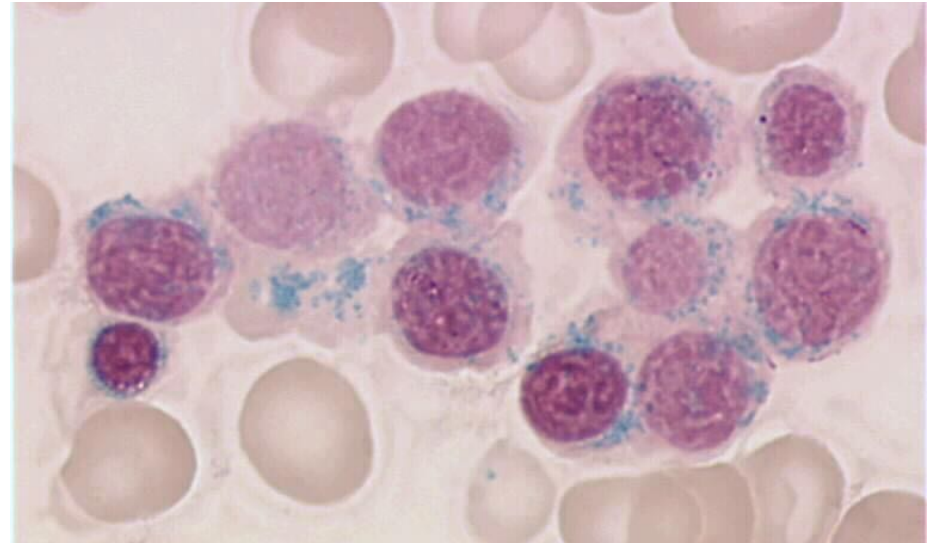
# Histoire d'une casserole qui prend feu



		CHIP			
		NORMAL CBC	CCUS	MDS	sAML
Clinical Features	Cytopenias	-	+	+	+
	Dysplasia	-	-	+	+
	BM blasts	< 5%	< 5%	up to 20%	≥ 20%

## Quand le génotype oriente le diagnostic...

- SMD-RS
  - 15% de RS
  - Ou  $\geq 5\%$  RS et *SF3B1*<sup>MUT</sup>
- SMD-RS-T
  - *SF3B1*
  - (mutation driver du SMP : *JAK2*, *CALR*, *MPL*)



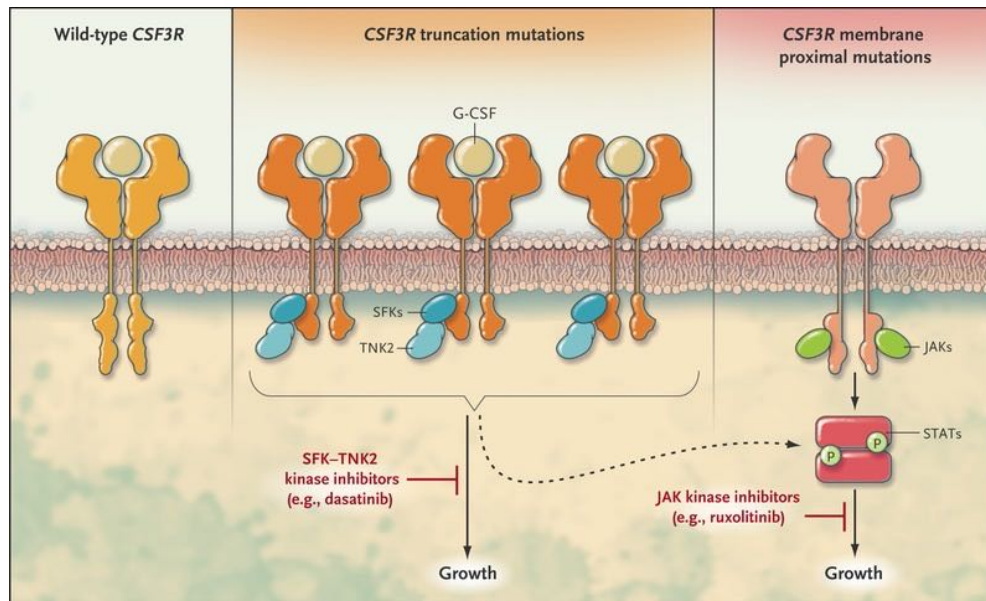
**Table 13. Diagnostic criteria for MDS/MPN with ring sideroblasts and thrombocytosis**

### MDS/MPN diagnostic criteria

- Anemia associated with erythroid lineage dysplasia with or without multilineage dysplasia,  $\geq 15\%$  ring sideroblasts,\*  $< 1\%$  blasts in PB and  $< 5\%$  blasts in the BM
- Persistent thrombocytosis with platelet count  $\geq 450 \times 10^9/L$
- Presence of a *SF3B1* mutation or, in the absence of *SF3B1* mutation, no history of recent cytotoxic or growth factor therapy that could explain the myelodysplastic/myeloproliferative features†
- No *BCR-ABL1* fusion gene, no rearrangement of *PDGFRA*, *PDGFRB*, or *FGFR1*; or *PCM1-JAK2*; no (3;3)(q21;q26), inv(3)(q21q26) or del(5q)‡
- No preceding history of MPN, MDS (except MDS-RS), or other type of MDS/MPN

## Leucémie chronique à PNN

- *CSF3R*
  - Récepteur du G-CSF
- Mutations juxta-membranaires (hotspot : T618I+++ ) et mutations truncantes
  - Impact thérapeutique (cf infra)

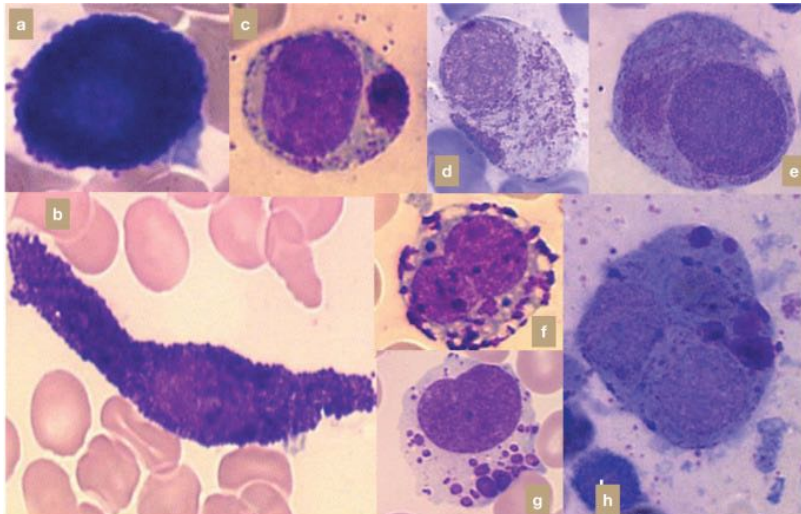


### CNL diagnostic criteria

1. PB WBC  $\geq 25 \times 10^9/L$ 
    - Segmented neutrophils plus band forms  $\geq 80\%$  of WBCs
    - Neutrophil precursors (promyelocytes, myelocytes, and metamyelocytes)  $< 10\%$  of WBC
    - Myeloblasts rarely observed
    - Monocyte count  $< 1 \times 10^9/L$
    - No dysgranulopoiesis
  2. Hypercellular BM
    - Neutrophil granulocytes increased in percentage and number
    - Neutrophil maturation appears normal
    - Myeloblasts  $< 5\%$  of nucleated cells
  3. Not meeting WHO criteria for *BCR-ABL1*<sup>+</sup> CML, PV, ET, or PMF
  4. No rearrangement of *PDGFRA*, *PDGFRB*, or *FGFR1*, or *PCM1-JAK2*
  5. Presence of *CSF3R* T618I or other activating *CSF3R* mutation
- or
- In the absence of a *CSF3R* mutation, persistent neutrophilia (at least 3 mo), splenomegaly and no identifiable cause of reactive neutrophilia including absence of a plasma cell neoplasm or, if present, demonstration of clonality of myeloid cells by cytogenetic or molecular studies

## Mastocytose systémique

- Critère mineur de diagnostic
  - *cKIT* D816V
- SM-AHN
  - Mutations associées aux SMD
  - Impact pronostic



**TABLE II.** World Health Organization (WHO) Diagnostic Criteria for Systemic Mastocytosis (SM) (Adapted from Ref. [53])

The diagnosis of SM can be made when the major criterion and one minor criterion or at least three minor criteria are present

### Major Criterion

Multifocal, dense infiltrates of mast cells ( $\geq 15$  mast cells in aggregates) detected in sections of bone marrow and/or other extracutaneous organs

### Minor Criteria

- in biopsy sections of bone marrow or other extracutaneous organs,  $>25\%$  of the mast cells in the infiltrate are spindle-shaped or have atypical morphology or, of all mast cells in bone marrow aspirate smears,  $>25\%$  are immature or atypical
- Detection of an activating point mutation at codon 816 of *KIT* in bone marrow, blood or other extracutaneous organ
- Mast cells in bone marrow, blood or other extracutaneous organ express CD2 and/or CD25 in addition to normal mast cell markers
- Serum total tryptase persistently exceeds 20 ng/mL (unless there is an associated clonal myeloid disorder, in which case this parameter is not valid)

### “B” findings

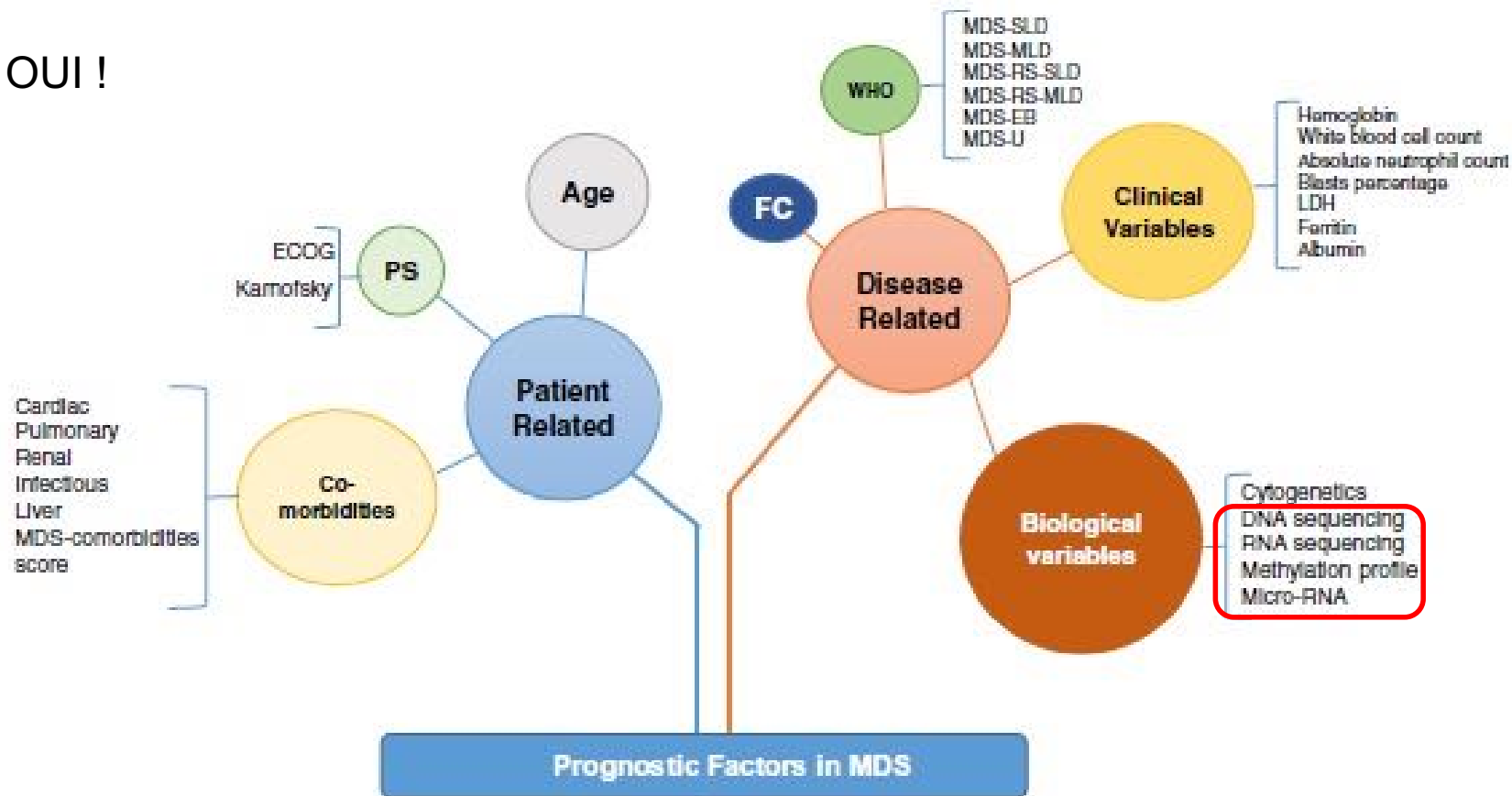
- BM biopsy showing  $>30\%$  infiltration by MC (focal, dense aggregates) and/or serum total tryptase level  $>200$  ng/mL
- Signs of dysplasia or myeloproliferation, in non-MC lineage(s), but insufficient criteria for definitive diagnosis of a hematopoietic neoplasm (AHNMD), with normal or slightly abnormal blood counts.
- Hepatomegaly without impairment of liver function, and/or palpable splenomegaly without hypersplenism, and/or lymphadenopathy on palpation or imaging.

### “C” findings

- Bone marrow dysfunction manifested by one or more cytopenia(s) (ANC  $<1.0 \times 10^9/L$ , Hgb  $<10$  g/dL, or platelets  $<100 \times 10^9/L$ ), but no obvious nonmast cell hematopoietic malignancy.
- Palpable hepatomegaly with impairment of liver function, ascites and/or portal hypertension.
- Skeletal involvement with large osteolytic lesions and/or pathological fractures.
- Palpable splenomegaly with hypersplenism.
- Malabsorption with weight loss due to gastrointestinal mast cell infiltrates.

# Impact pronostic

OUI !



Cur Hematol Malig Rep (2017) 12:461–467  
DOI 10.1007/s11899-017-0407-9



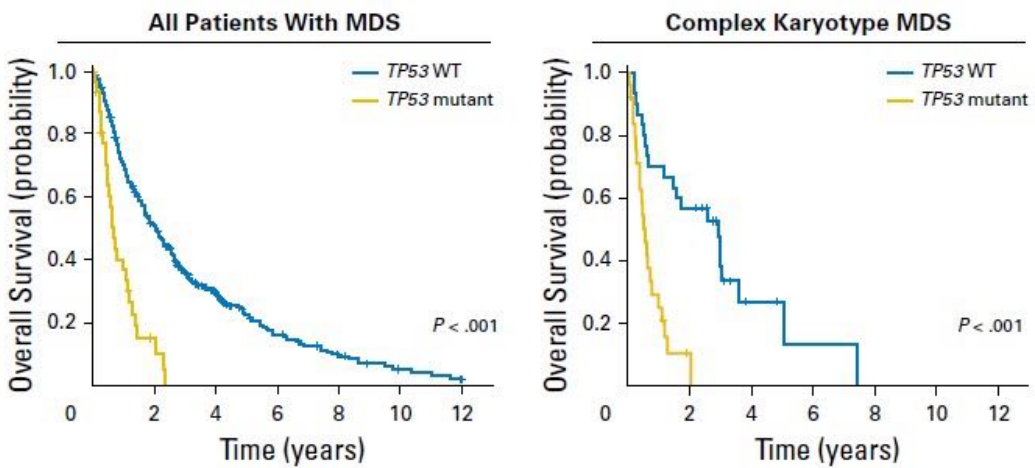
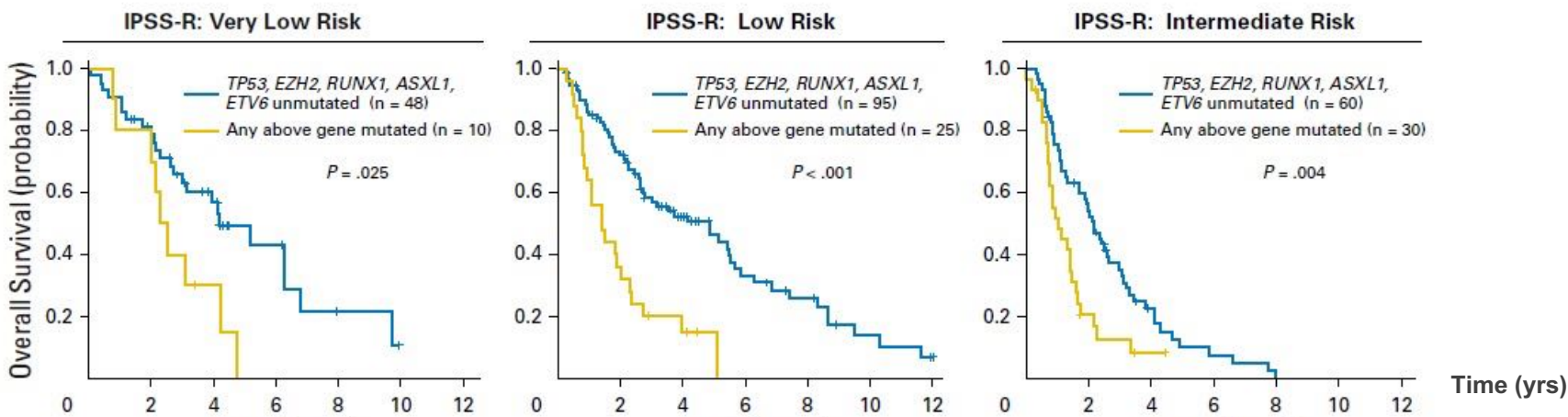
MYELODYSPLASTIC SYNDROMES (M SAVONA, SECTION EDITOR)

## Molecular Data and the IPSS-R: How Mutational Burden Can Affect Prognostication in MDS

Aziz Nazha<sup>1</sup> · Rafael Bejar<sup>2</sup>

# Impact pronostic des mutations dans les SMD

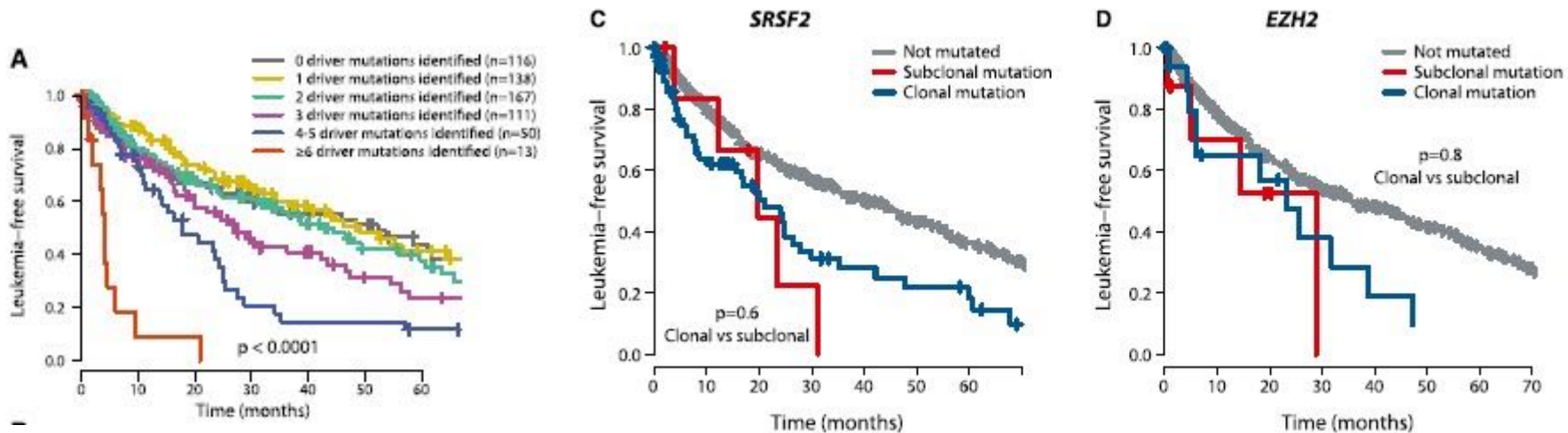
- *TP53*+++,
- *EZH2*, *RUNX1*, *ASXL1*, *ETV6*



VOLUME 35 · NUMBER 9 · MARCH 20, 2017  
**JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY** REVIEW ARTICLE

Clinical Implications of Genetic Mutations in Myelodysplastic Syndrome  
 James A. Kennedy and Benjamin L. Ebert

# Impact pronostic des mutations dans les SMD



- Le nombre de mutations
  - Survie sans évènement et Transformation en LAM
- Les mutations sous-clonales
- Les mutations non connues comme oncogéniques

Regular Article

MYELOID NEOPLASIA

CME Article

Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes

Elli Papaemmanuil,<sup>1</sup> Moritz Gerstung,<sup>1</sup> Luca Makóvali,<sup>2</sup> Sudhit Tauro,<sup>3</sup> Gunes Gundem,<sup>1</sup> Peter Van Loo,<sup>1,4,5</sup> Chris J. Yoon,<sup>1</sup> Peter Ellis,<sup>1</sup> David C. Wedge,<sup>1</sup> Andrea Pellagatti,<sup>6</sup> Adam Shlien,<sup>1</sup> Michael John Grove,<sup>2</sup> Simon A. Forbes,<sup>2</sup> Kieran Raine,<sup>1</sup> Jon Hinton,<sup>1</sup> Laura J. Mudie,<sup>1</sup> Stuart McLaren,<sup>1</sup> Claire Hardy,<sup>1</sup> Calli Lattimer,<sup>1</sup> Matteo G. Della Porta,<sup>2</sup> Sarah O'Meara,<sup>1</sup> Ilaria Ambaglio,<sup>2</sup> Anna Gall,<sup>2</sup> Adam P. Butler,<sup>1</sup> Gunilla Walkin,<sup>7</sup> Jon W. Teague,<sup>1</sup> Lynn Quak,<sup>8</sup> Alex Stenberg,<sup>8,9</sup> Carlo Gambacorti-Passerini,<sup>10</sup> Nicholas C. P. Cross,<sup>11</sup> Anthony R. Green,<sup>12,13</sup> Jacqueline Boutwood,<sup>5</sup> Paresh Vyas,<sup>7</sup> Eva Hellstrom-Lindberg,<sup>7</sup> David Bowen,<sup>14</sup> Mario Cazzola,<sup>2</sup> Michael R. Stratton,<sup>1</sup> and Peter J. Campbell<sup>1,12,13</sup> on behalf of the Chronic Myeloid Disorders working group of the International Cancer Genome Consortium



# Impact pronostic des mutations dans les SMD greffés

- 87 patients MDS, alloSCT
  - En univarié : *TP53* (OS et PFS)
  - En multivarié : + *TET2*, *DNMT3A*

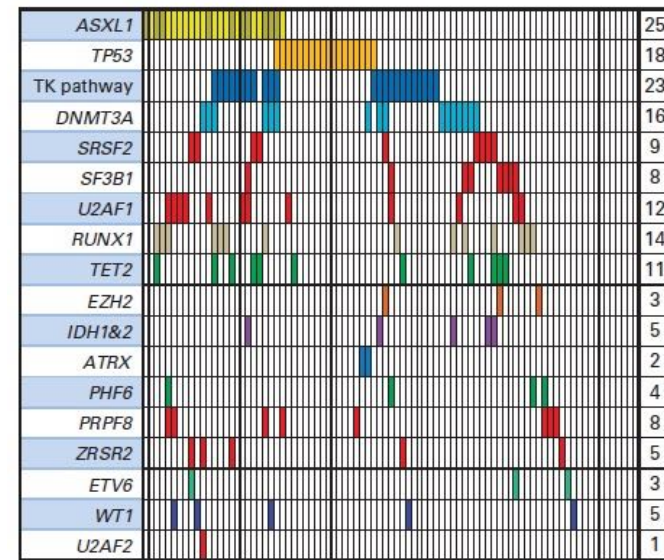
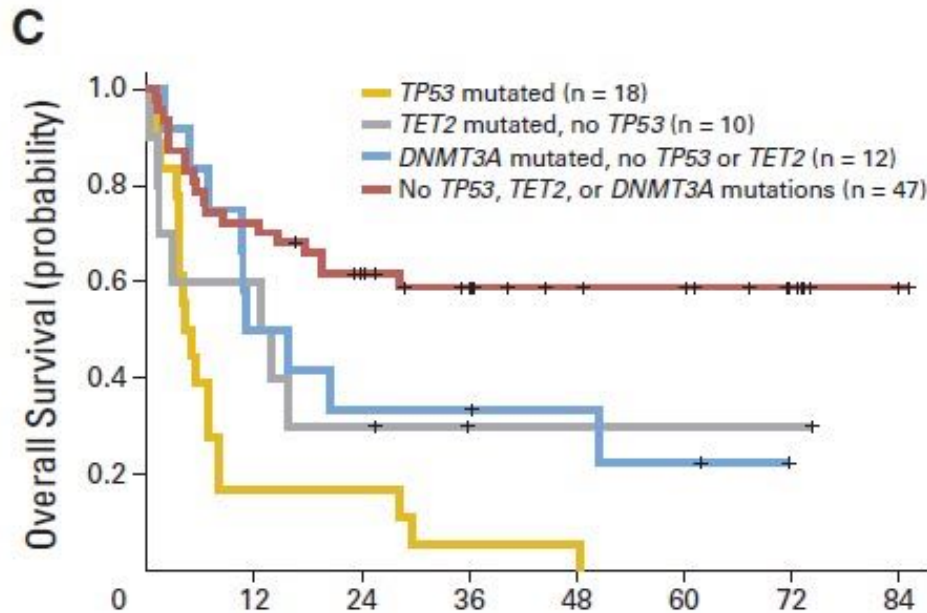
VOLUME 32 · NUMBER 25 · SEPTEMBER 1 2014

JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY

ORIGINAL REPORT

Somatic Mutations Predict Poor Outcome in Patients With Myelodysplastic Syndrome After Hematopoietic Stem-Cell Transplantation

Rafael Bejar, Kristen E. Stevenson, Bennett Caughey, R. Coleman Lindsley, Brenton G. Mar, Petar Stojanov, Gad Getz, David P. Steensma, Jerome Ritz, Robert Soiffer, Joseph H. Antin, Edwin Alyea, Philippe Armand, Vincent Ho, John Koreth, Donna Neuberg, Corey S. Cutler, and Benjamin L. Ebert



Genetic mutation (present v absent)

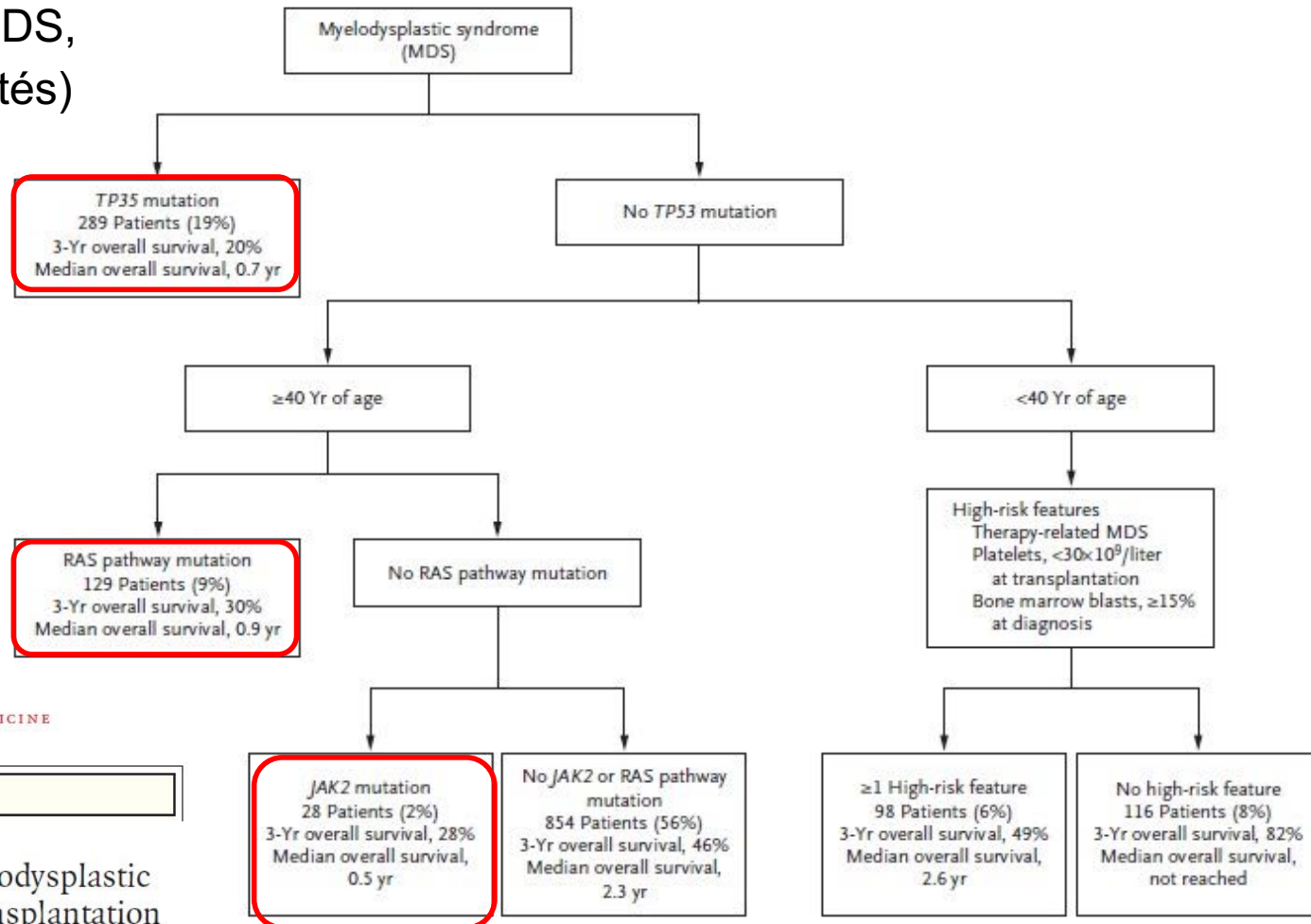
	Univariable			Adjusted*		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
<i>TP53</i>	3.74	2.08 to 6.75	< .001	2.30	1.10 to 4.81	.027
<i>TET2</i>	1.68	0.79 to 3.57	.18	2.40	1.07 to 5.38	.033
<i>DNMT3A</i>	1.44	0.77 to 2.69	.26	2.08	1.00 to 3.26	.049

# Impact pronostic des mutations dans les SMD greffés

- 1514 patients, MDS, allo SCT (79% mutés)

Impact pronostic :

- TP53
- NRAS
- JAK2



The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

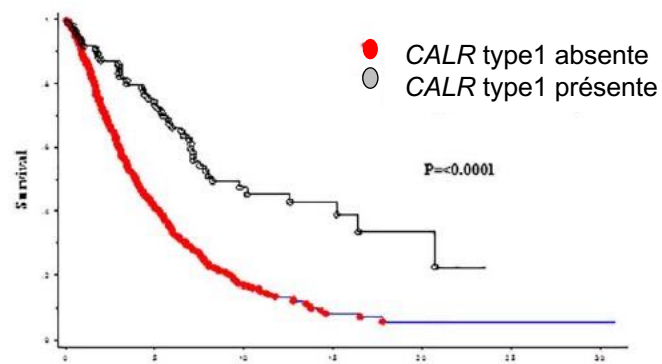
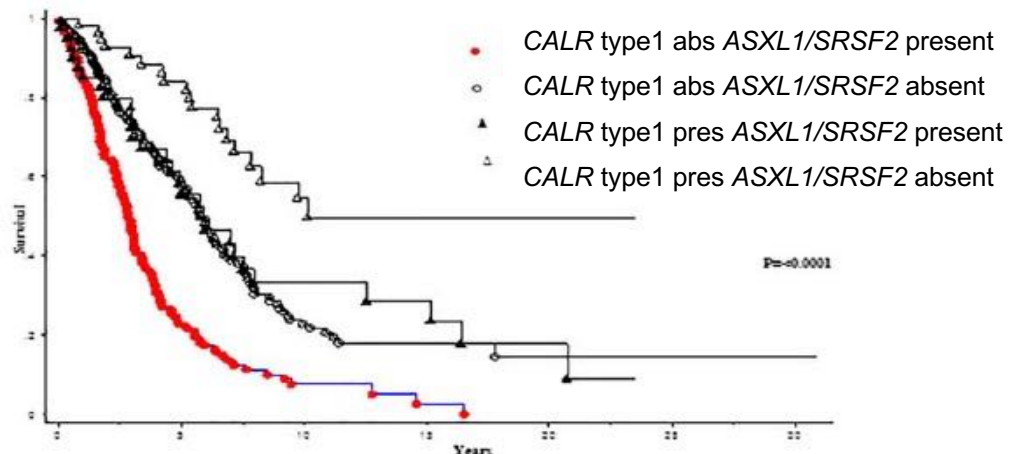
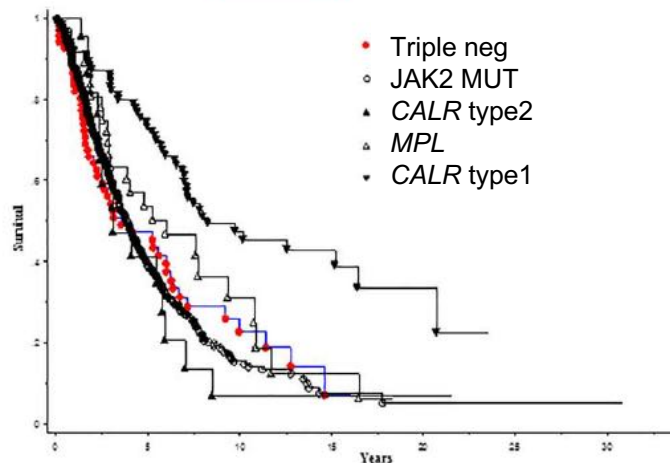
ORIGINAL ARTICLE

## Prognostic Mutations in Myelodysplastic Syndrome after Stem-Cell Transplantation

R.C. Lindsley, W. Saber, B.G. Mar, R. Redd, T. Wang, M.D. Haagenson, P.V. Grauman, Z.-H. Hu, S.R. Spellman, S.J. Lee, M.R. Verneris, K. Hsu, K. Fleischhauer, C. Cutler, J.H. Antin, D. Neuberg, and B.L. Ebert

# Dans la MF

## • Impact *JAK2/CALR/MPL – SRSF2/ASXL1*



Received: 14 November 2017 | Accepted: 16 November 2017  
 DOI: 10.1002/ajh.24978

RESEARCH ARTICLE

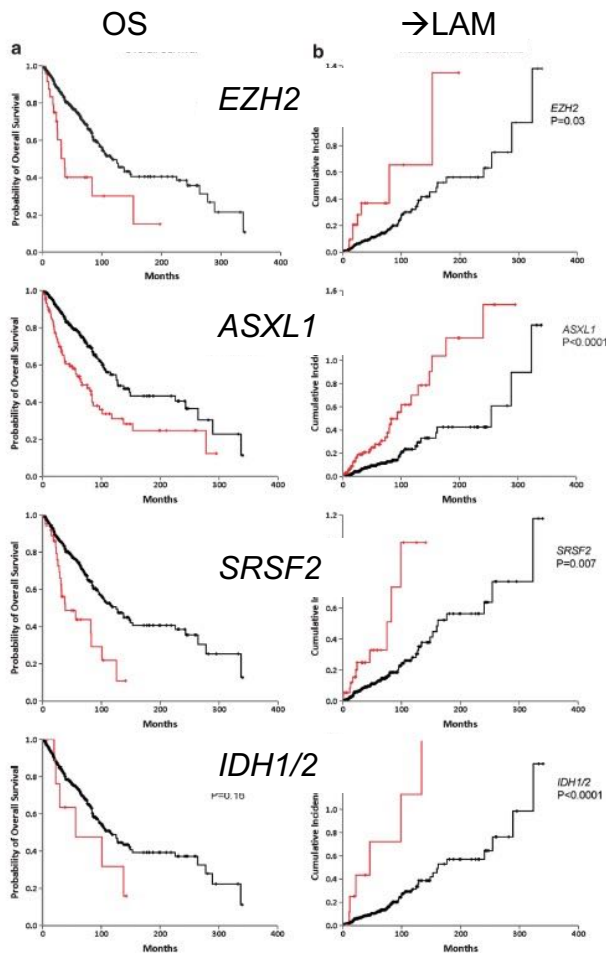


### Driver mutations and prognosis in primary myelofibrosis: Mayo-Careggi MPN alliance study of 1,095 patients

Ayalew Tefferi<sup>1</sup> | Maura Nicolosi<sup>1</sup> | Mythri Mudireddy<sup>1</sup> | Natasha Szuber<sup>1</sup> |  
 Christy M. Finke<sup>1</sup> | Terra L. Lasho<sup>1</sup> | Curtis A. Hanson<sup>2</sup> | Rhett P. Ketterling<sup>3</sup> |  
 Animesh Pardanani<sup>1</sup> | Naseema Gangat<sup>1</sup> | Carmela Mannarelli<sup>4</sup> |  
 Tiziana Fanelli<sup>4</sup> | Paola Guglielmelli<sup>4</sup> | Alessandro M. Vannucchi<sup>4</sup>

# MF

- *EZH2*, *ASXL1*, *SRSF2*, *IDH1/2* et *U2AF1*



ORIGINAL ARTICLE

## Mutations and prognosis in primary myelofibrosis

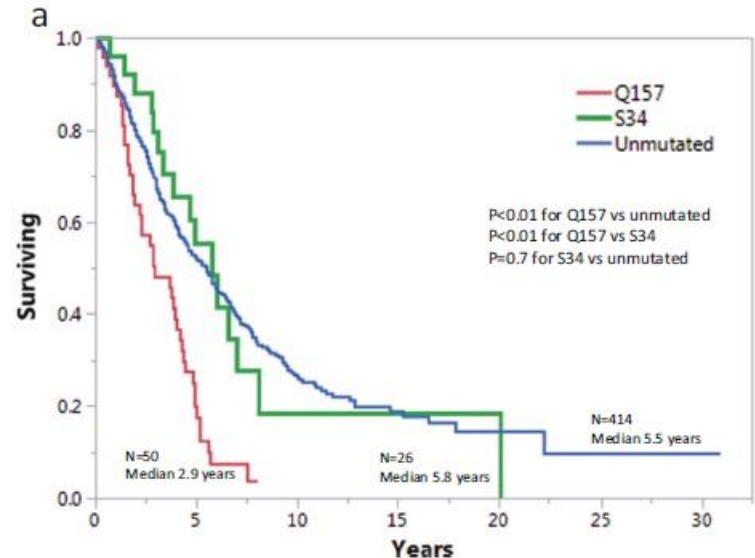
AM Vannucchi<sup>1</sup>, TL Lasho<sup>2</sup>, P Guglielmelli<sup>1</sup>, F Biamonte<sup>1</sup>, A Pardanani<sup>2</sup>, A Pereira<sup>3</sup>, C Finke<sup>2</sup>, J Score<sup>4</sup>, N Gangat<sup>2</sup>, C Mannarelli<sup>1</sup>, RP Ketterling<sup>5</sup>, G Rotunno<sup>1</sup>, RA Knudson<sup>5</sup>, MC Susini<sup>1</sup>, RR Laborde<sup>5</sup>, A Spolverini<sup>1</sup>, A Pancrazzi<sup>1</sup>, L Pieri<sup>1</sup>, R Manfredini<sup>6</sup>, E Tagliafico<sup>7</sup>, R Zini<sup>6</sup>, A Jones<sup>4</sup>, K Zo<sup>8</sup>, A Reiter<sup>2</sup>, A Duncombe<sup>10</sup>, D Pietra<sup>11</sup>, E Rumi<sup>11</sup>, F Cervantes<sup>12</sup>, G Barosi<sup>13</sup>, M Cazzola<sup>11</sup>, NCP Cross<sup>4</sup> and A Tefferi<sup>2</sup>

Leukemia (2018) 32:2274–2278  
<https://doi.org/10.1038/s41375-018-0078-0>

Chronic myeloproliferative neoplasms

### *U2AF1* mutation types in primary myelofibrosis: phenotypic and prognostic distinctions

Ayalew Tefferi<sup>1</sup> · Christy M. Finke<sup>1</sup> · Terra L. Lasho<sup>1</sup> · Curtis A. Hanson<sup>2</sup> · Rhett P. Ketterling<sup>3</sup> · Naseema Gangat<sup>1</sup> · Animesh Pardanani<sup>1</sup>



# Les scores pronostics dans la MF

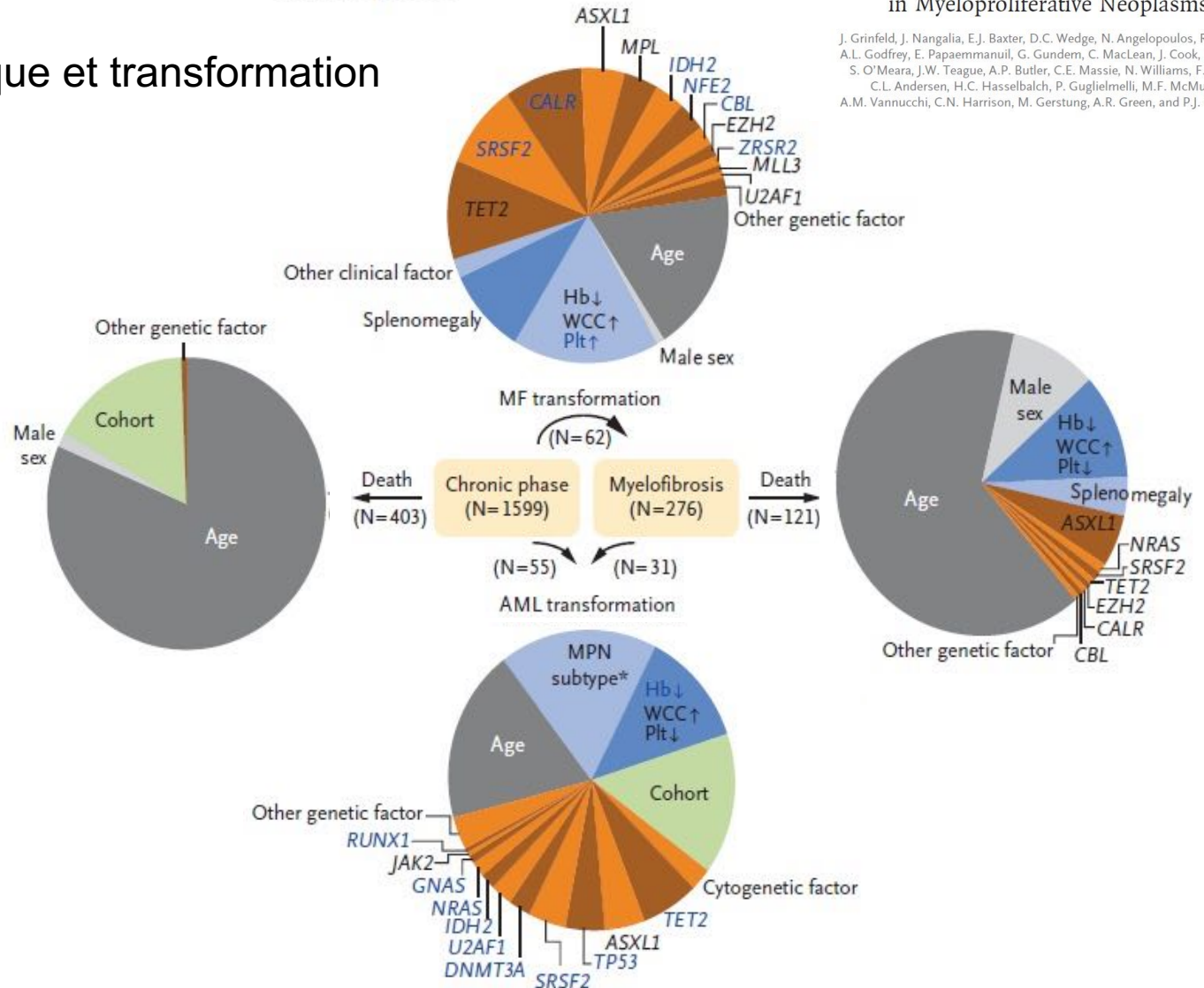


MIPSS70		MIPSS70+		MIPSS70+ version 2.0	
Clinical risk factors	Hb <10 g/dl	1	Hb <10 g/dl	1	Hb adjusted/sex :
	<b>HRM : High Risk Mutation</b> MIPSS70 et MIPSS70+ : <i>ASXL1 SRSF2 EZH2 IDH1/2</i> MIPSS70+ version 2.0 : <i>ASXL1 SRSF2 EZH2 IDH1/2 U2AF1<sup>Q157</sup></i>				
	Constit symptoms	1	Constit symptoms		Constit symptoms
					2
Genetic variables	Absence CALR type1/like mut	1	Absence CALR type1/like mut	2	Absence CALR type1/like mut
	Presence HRM	1	Presence HRM	1	Presence HRM
			Presence ≥ 2HRM	2	Presence ≥ 2HRM
			<b>Unfavorable karyotype</b>	3	<b>Unfavorable karyotype</b>
					<b>VHR</b>
				3	
				4	

Avalew 15111...  
 Niccolo Bartalucci · Christy M. Hoke · ...  
 Naseema Gangat<sup>1</sup> · Animesh Pardhanani · Alessandro M. Vannucci

# Impact pronostic dans les SMP Phi-

- Phase chronique et transformation



The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

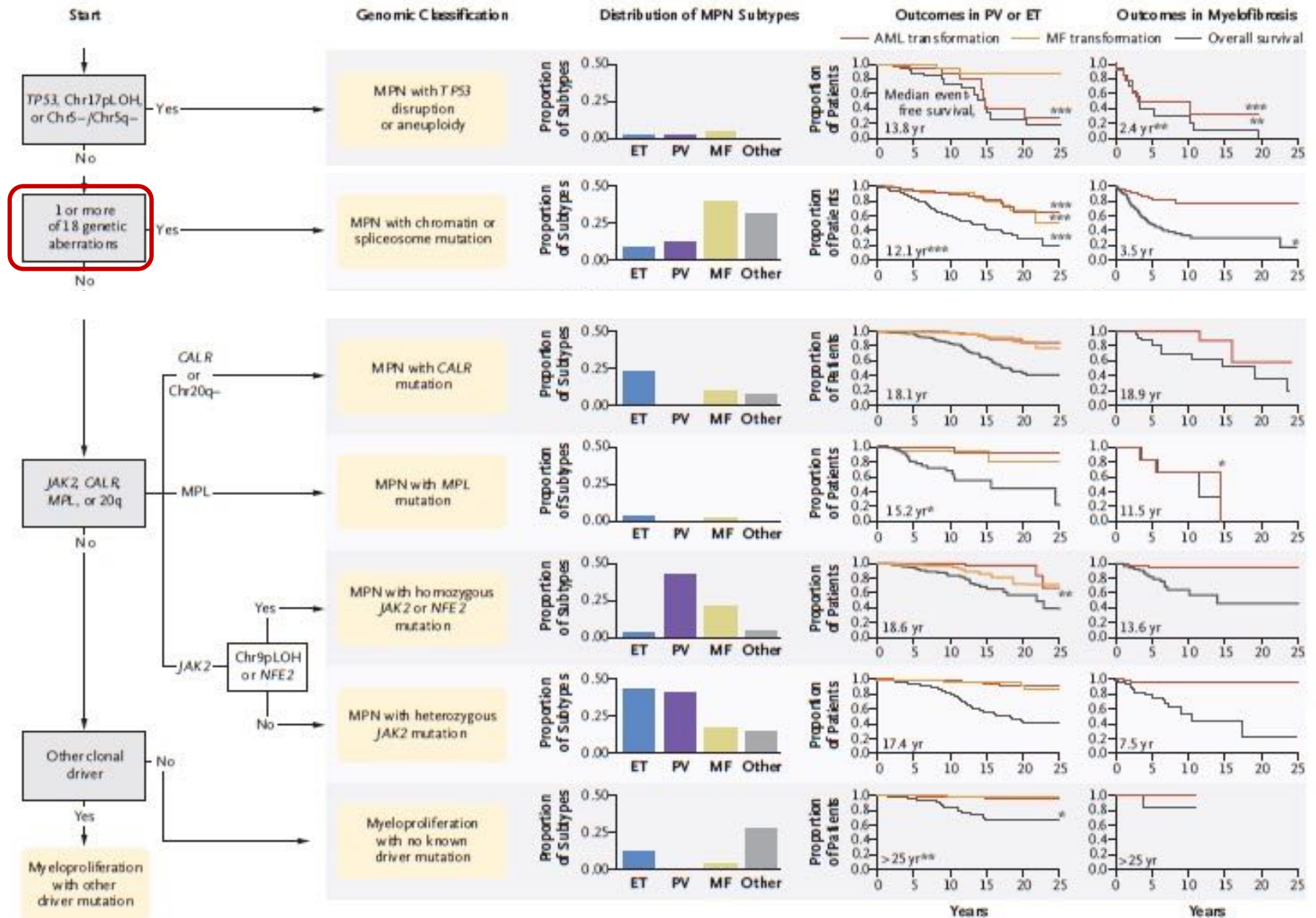
ORIGINAL ARTICLE

## Classification and Personalized Prognosis in Myeloproliferative Neoplasms

J. Grinfeld, J. Nangalia, E.J. Baxter, D.C. Wedge, N. Angelopoulos, R. Cantrill, A.L. Godfrey, E. Papaemmanuil, G. Gundle, C. MacLean, J. Cook, L. O'Neil, S. O'Meara, J.W. Teague, A.P. Butler, C.E. Massie, N. Williams, F.L. Nice, C.L. Andersen, H.C. Hasselbalch, P. Guglielmelli, M.F. McMullin, A.M. Vannucchi, C.N. Harrison, M. Gerstung, A.R. Green, and P.J. Campbell

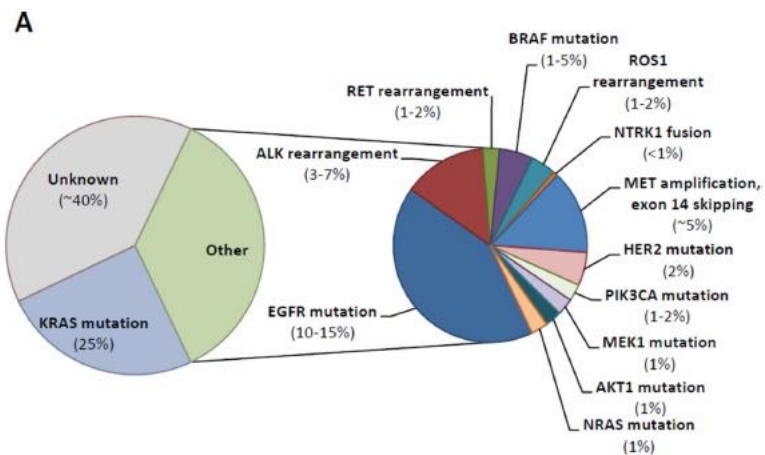
**Figure 3 (facing page). Genomic Subgroups in MPN and Phenotypic Characteristics.**

*EZH2, IDH1, IDH2, ASXL1, PHF6, CUX1, ZRSR2, SRSF2, U2AF1, KRAS, NRAS, GNAS, CBL, Chr7/7qLOH, Chr4qLOH, RUNX1, STAG2, and BCOR.*



# Impact thérapeutique → Targeted therapy

- En oncologie solide → OUI+++
  - Ex : adénocarcinome pulmonaire



INHIBITORS			
EGFR	ALK	ROS	RET
Erlotinib* Gefitinib* Afatinib* Osimertinib* Rociletinib EGF816 ASP8273 HM61713	Crizotinib* Ceritinib* Alectinib* Lorlatinib Brigatinib X-396 Entrectinib	Crizotinib* Ceritinib Lorlatinib Cabozantinib Foretinib Entrectinib DS-6051b	Alectinib Cabozantinib Vandetanib Lenvatinib Apatinib Ponatinib Sunitinib Dovitinib
MET	TRK1	HER2	BRAF/MEK
Crizotinib Tivantinib Cabozantinib Foretinib Volitinib Capmatinib MSC2156119J AMG337 AMG208	Entrectinib LOXO-101 DS-6051b	Afatinib Dacomitinib Neratinib Lapatinib Pyrotinib	Vemurafenib Dabrafenib Trametinib Selumetinib



## Impact thérapeutique → Targeted therapy

- En onco-hématologie → +/-

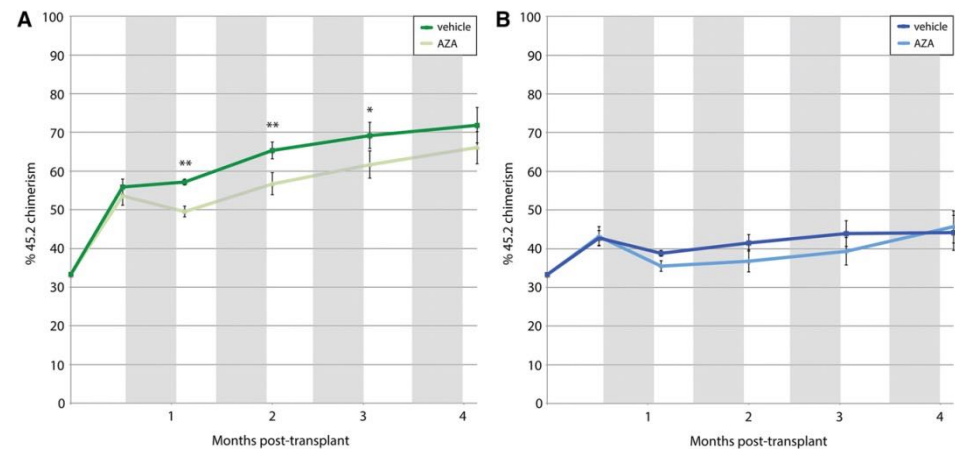
Gène muté	Molécule
<i>PML-RARa</i>	Acide trans-rétinoïque
<i>FLT3</i>	Midostaurine
<i>IDH2</i>	Enasidenib (AG-221)
<i>IDH1</i>	Ivosidenib (AG-220)
<i>JAK2</i>	Ruxolitinib...
<i>CSF3R</i>	Ruxolitinib Dasatinib
<i>BCR-ABL</i>	Imatinib, dasatinib, pomatinib...
<i>TP53</i>	APR-246

# Le génotype pour prédire la réponse au traitement

- Statut *TET2* et *ASXL1* et réponse aux HMA
  - *TET2*<sup>MUT</sup> *ASXL1*<sup>WT</sup> → meilleure réponse
  - *TET2*<sup>WT</sup> *ASXL1*<sup>MUT</sup> → moins bonne réponse
  - Aussi : impact positif de *DNMT3A*<sup>MUT</sup> (Traina et al, Leuk 2014)

**Table 3. Association of gene mutations with response rate in logistic regression analysis**

Mutated gene*	Unadjusted OR (95% CI)	P value	Adjusted† OR (95% CI)	P value
<b>Mutations with VAF ≥10%</b>				
<i>TET2</i> -mut vs <i>TET2</i> -WT	1.99 (1.05, 3.80)	.036	1.98 (1.02, 3.85)	.044
<i>ASXL1</i> -mut vs <i>ASXL1</i> -WT	0.69 (0.40, 1.20)	.19	0.68 (0.38, 1.19)	.17
<i>TET2</i> -mut + <i>ASXL1</i> -WT vs other	3.65 (1.38, 9.67)	.009	3.64 (1.35, 9.79)	.011
<i>TET2</i> -mut + <i>ASXL1</i> -WT vs both WT	3.40 (1.24, 9.35)	.011	3.36 (1.20, 9.38)	.013
<i>TET2</i> -WT + <i>ASXL1</i> -mut vs both WT	0.77 (0.41, 1.46)	.35	0.80 (0.39, 1.46)	.39
<i>TET2</i> -mut + <i>ASXL1</i> -mut vs both WT	1.11 (0.48, 2.61)	.62	1.07 (0.44, 2.61)	.59
<i>CBL</i> -mut vs <i>CBL</i> -WT	0.27 (0.06, 1.29)	.10	0.28 (0.06, 1.40)	.12
<i>ASXL1</i> -mut vs <i>ASXL1</i> -WT	0.77 (0.45, 1.32)	.34	0.74 (0.42, 1.30)	.29



*Souris TET2*<sup>null</sup>

*Souris TET2*<sup>WT</sup>

Regular Article

MYELOID NEOPLASIA

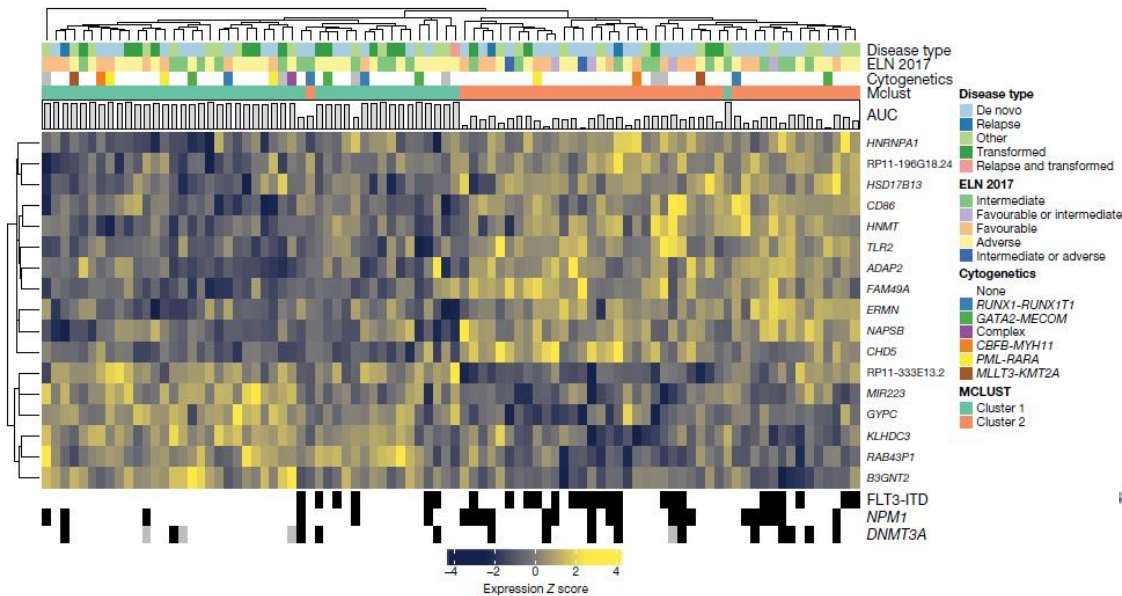
## *TET2* mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients

Rafael Bejar,<sup>1</sup> Allegra Lord,<sup>2</sup> Kristen Stevenson,<sup>3</sup> Michal Bar-Natan,<sup>4</sup> Albert Pérez-Ladaga,<sup>1</sup> Jacques Zaneveld,<sup>5</sup> Hui Wang,<sup>5</sup> Bennett Caughey,<sup>1</sup> Petar Stojanov,<sup>6</sup> Gad Getz,<sup>6</sup> Guillermo Garcia-Manero,<sup>7</sup> Hagop Kantarjian,<sup>7</sup> Rui Chen,<sup>5</sup> Richard M. Stone,<sup>4</sup> Donna Neuberg,<sup>3</sup> David P. Steensma,<sup>4</sup> and Benjamin L. Ebert<sup>2,6</sup>

<sup>1</sup>Division of Hematology and Oncology, University of California San Diego Moores Cancer Center, La Jolla, CA; <sup>2</sup>Division of Hematology, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA; <sup>3</sup>Department of Biostatistics and Computational Biology and <sup>4</sup>Department of Medical Oncology, Division of Hematological Malignancies, Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA; <sup>5</sup>Department of Molecular and Human Genetics, Baylor College of Medicine, Houston, TX; <sup>6</sup>Broad Institute of Harvard and Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA; and <sup>7</sup>Department of Leukemia, University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, TX

# Le génotype pour prédire la réponse au traitement

- Signatures géniques et réponse au traitement
  - Sensibilité à l'ibrutinib :
    - 20% des cas les plus/ moins sensibles à l'ibru



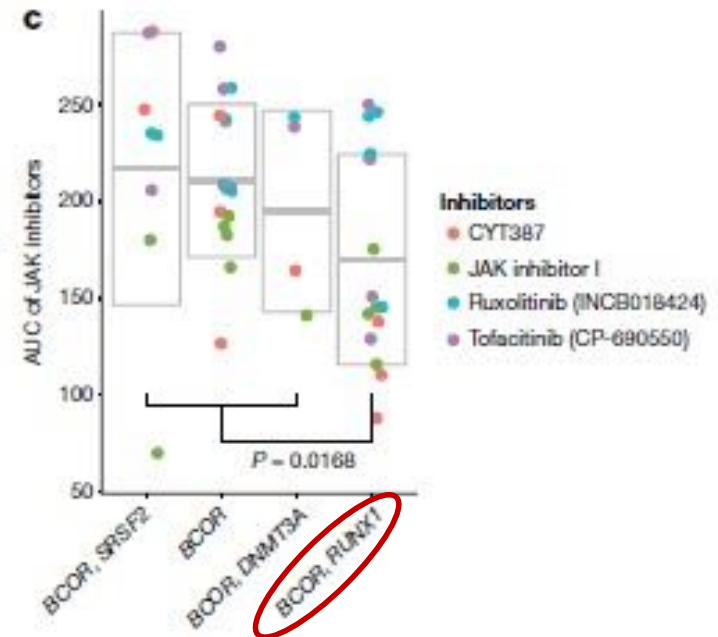
## ARTICLE

<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0423-z>

### Functional genomic landscape of acute myeloid leukaemia

Jeffrey W. Tyner<sup>1,2</sup>, Carolina E. Fogarty<sup>1,2</sup>, Daniel Hottel<sup>1,2</sup>, Beth Wilmer<sup>1,2,3</sup>, Stephen E. Kurtz<sup>2,3</sup>, Samantha L. Savage<sup>1,2</sup>, Nicola Long<sup>1,2</sup>, Anna Reister-Schultz<sup>2,3</sup>, Elie Traer<sup>2,3</sup>, Melissa Abel<sup>2,3</sup>, Anupriya Agarwal<sup>2,3</sup>, Aurora Blucher<sup>2,3</sup>, Uma Borate<sup>2,3</sup>, Jake Bryant<sup>2,3</sup>, Russell Burke<sup>2,3</sup>, Amy Carlow<sup>2,3</sup>, Richie Carpenter<sup>2,3</sup>, Joseph Carroll<sup>2,3</sup>, Bill H. Chung<sup>2,3</sup>, Cody Coblenz<sup>2,3</sup>, Amanda d'Almeida<sup>2,3</sup>, Rachel Cook<sup>2,3</sup>, Alexey Danilov<sup>2,3</sup>, Kim-Hen T. Dao<sup>2,3</sup>, Michèle Doguin<sup>2,3</sup>, Delphine Devine<sup>2,3</sup>, James D'Nag<sup>2,3</sup>, David K. Edwards<sup>2,3</sup>, Christopher A. Eide<sup>2,3</sup>, Isabel English<sup>2,3</sup>, Jason Glover<sup>2,3</sup>, Rachel Henson<sup>2,3</sup>, Hilary Ho<sup>2,3</sup>, Abdusshar Khan<sup>2,3</sup>, Kara Johnson<sup>2,3</sup>, Ryan Johnson<sup>2,3</sup>, Brian Juno<sup>2,3</sup>, Andy Kaempfer<sup>2,3</sup>, Jessica Leonard<sup>2,3</sup>, Chenwei Lin<sup>2,3</sup>, Selina Qinyang Liu<sup>2,3</sup>, Peppette Lo<sup>2,3</sup>, Marc M. Loriaux<sup>2,3</sup>, Samuel Lutz<sup>2,3</sup>, Tara Macey<sup>2,3</sup>, Jason MacIntyre<sup>2,3</sup>, Jacqueline Martinez<sup>2,3</sup>, Motomi Mori<sup>2,3</sup>, Dylan Nelson<sup>2,3</sup>, Celedith Nichols<sup>2,3</sup>, Jill Peters<sup>2,3</sup>, Justin Ramstath<sup>2,3</sup>, Angela Rotely<sup>2,3</sup>, Robert Schaff<sup>2,3</sup>, Robert Seaton<sup>2,3</sup>, Eric Segardal<sup>2,3</sup>, Rebecca I. Smith<sup>2,3</sup>, Stephen E. Spurgeon<sup>2,3</sup>, Tyler Sweeney<sup>2,3</sup>, Aashis Thapa<sup>2,3</sup>, Corinne Visser<sup>2,3</sup>, Jake Wagner<sup>2,3</sup>, Kevin Watanabe-Smith<sup>2,3</sup>, Kristen Werth<sup>2,3</sup>, Jodie Wolf<sup>2,3</sup>, Libbey White<sup>2,3</sup>, Amy Yates<sup>2,3</sup>, Haijiao Zhang<sup>2,3</sup>, Christopher R. Cogoli<sup>2,3</sup>, Robert H. Collins<sup>2,3</sup>, Denise C. Connolly<sup>2,3</sup>, Michael W. Deininger<sup>2,3</sup>, Leylah Druksoski<sup>2,3</sup>, Christopher S. Hourigan<sup>2,3</sup>, Craig T. Jordan<sup>2,3</sup>, Patricia Kropf<sup>2,3</sup>, Tara L. Liu<sup>2,3</sup>, Mariana F. Martinez<sup>2,3</sup>, Bruno C. Medeiros<sup>2,3</sup>, Rachel R. Pallapati<sup>2,3</sup>, Daniel A. Polya<sup>2,3</sup>, Ronan T. Swords<sup>2,3</sup>, Justin M. Watts<sup>2,3</sup>, Scott J. Weir<sup>2,3</sup>, David L. West<sup>2,3</sup>, Ryan M. Winters<sup>2,3</sup>, Shannon K. Mcweeney<sup>2,3,4</sup> & Brian J. Druker<sup>1,2,3,4</sup>

Nature, 2018

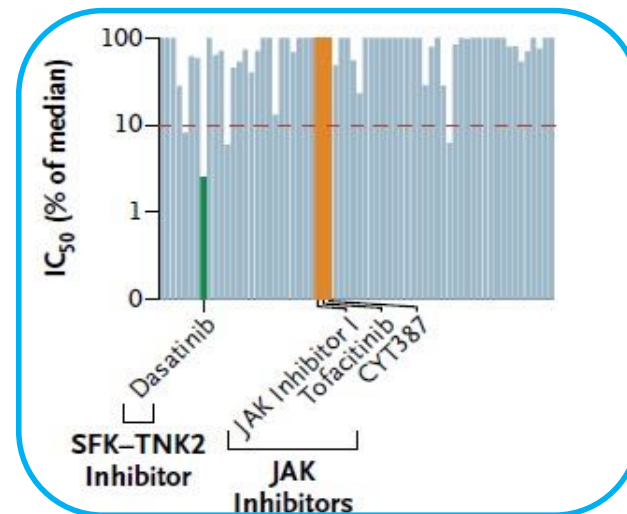
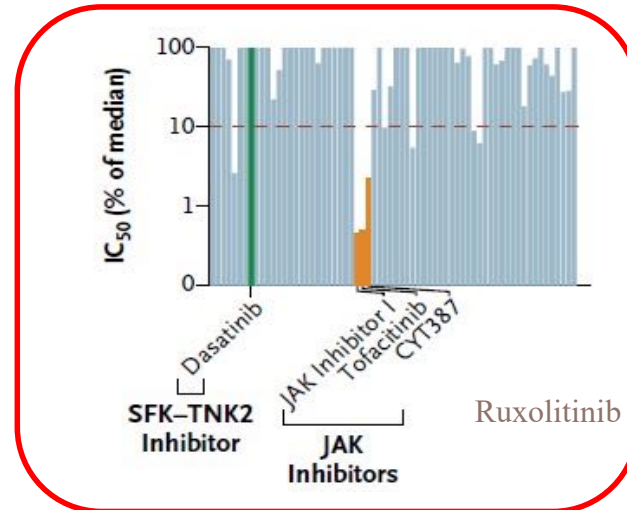
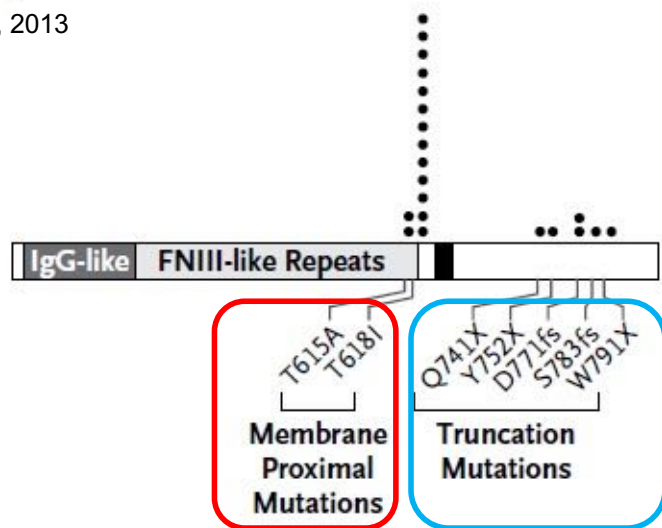


# Impact théranostic

## Oncogenic *CSF3R* Mutations in Chronic Neutrophilic Leukemia and Atypical CML

Julia E. Maxson, Ph.D., Jason Gotlib, M.D., Daniel A. Pollyea, M.D.,  
 Angela G. Fleischman, M.D., Ph.D., Anupriya Agarwal, Ph.D.,  
 Christopher A. Eide, B.A., Daniel Bottomly, M.S., Beth Wilmot, Ph.D.,  
 Shannon K. McWeeney, Ph.D., Cristina E. Tognon, Ph.D., J. Blake Pond, M.S.,  
 Robert H. Collins, M.D., Basem Goueli, M.D., Ph.D., Stephen T. Oh, M.D., Ph.D.,  
 Michael W. Deininger, M.D., Ph.D., Bill H. Chang, M.D., Ph.D.,  
 Marc M. Loriaux, M.D., Ph.D., Brian J. Druker, M.D.,  
 and Jeffrey W. Tyner, Ph.D.

NEJM, 2013



# Génotype et architecture clonale



- Évolution clonale
  - Traitements de support
  - Lenalidomide

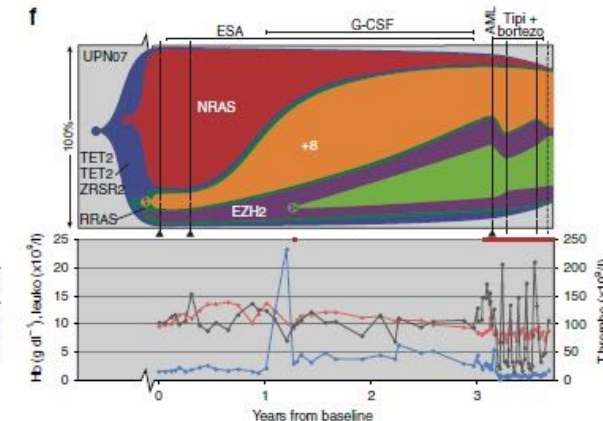
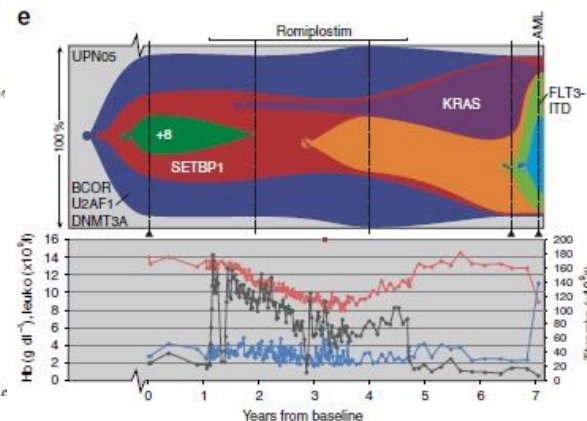
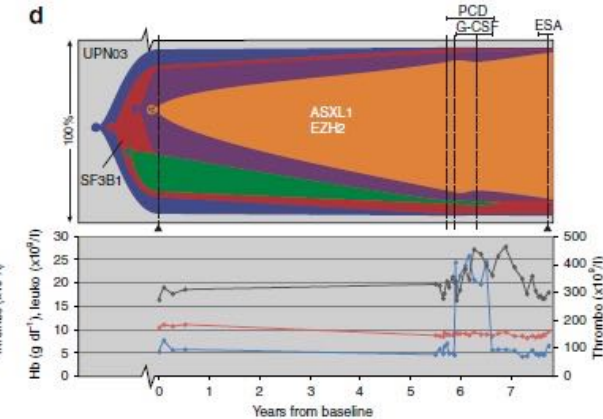
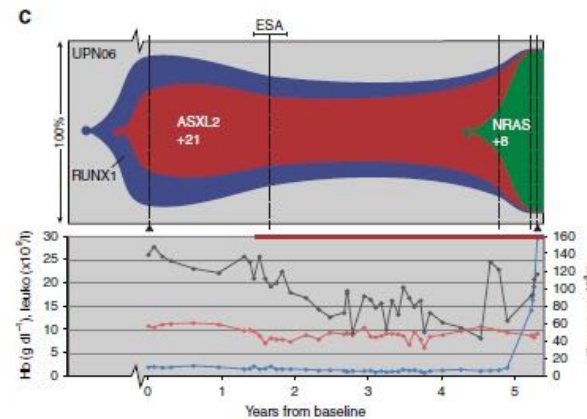
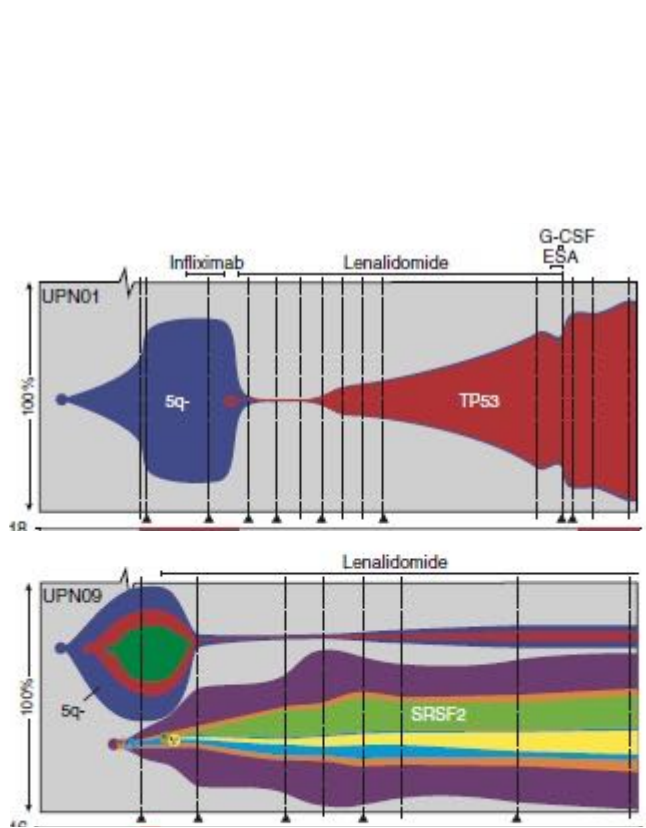
ARTICLE

Received 11 Jul 2016 | Accepted 24 Feb 2017 | Published 21 Apr 2017

DOI: 10.1038/ncomms15099 OPEN

## Clonal evolution in myelodysplastic syndromes

Pedro da Silva-Coelho<sup>1,2\*</sup>, Leonie I. Kroeze<sup>1\*</sup>, Kenichi Yoshida<sup>3\*</sup>, Theresia N. Koorenhof-Scheele<sup>1</sup>



— Haemoglobin level    — Platelet count    ▲ WES BM sample  
— Leukocyte count    — Erythrocyte transfusions

MDS/MPN

AML

RC AML

SF3B1 38%  
JAK2 33%

JAK2 39%  
(qPCR)

SF3B1  
JAK2 6%

SF3B1  
JAK2

SF3B1  
JAK2

SF3B1

SF3B1 +  
copains

IDH1/SRSF2  
nég (Sanger)

SF3B1 49%  
IDH1 45%  
SRSF2 46%

CBL 12%  
FLT3 (x2) 13%

STAG2 78%

2015

2016

2017



MDS/MPN

AML

RC AML

Relapse  
AML

JAK2 39%  
(qPCR)

SF3B1 38%  
JAK2 33%

SF3B1  
JAK2 6%

SF3B1  
JAK2

SF3B1 +  
copains

SF3B1

SF3B1 49%  
IDH1 45%  
SRSF2 46%

CBL 12%  
FLT3 (x2) 13%

IDH1/SRSF2 nég  
(Sanger)

IDH1 45%  
SRSF2 46%

FLT3

STAG2 78%

NGS

NGS

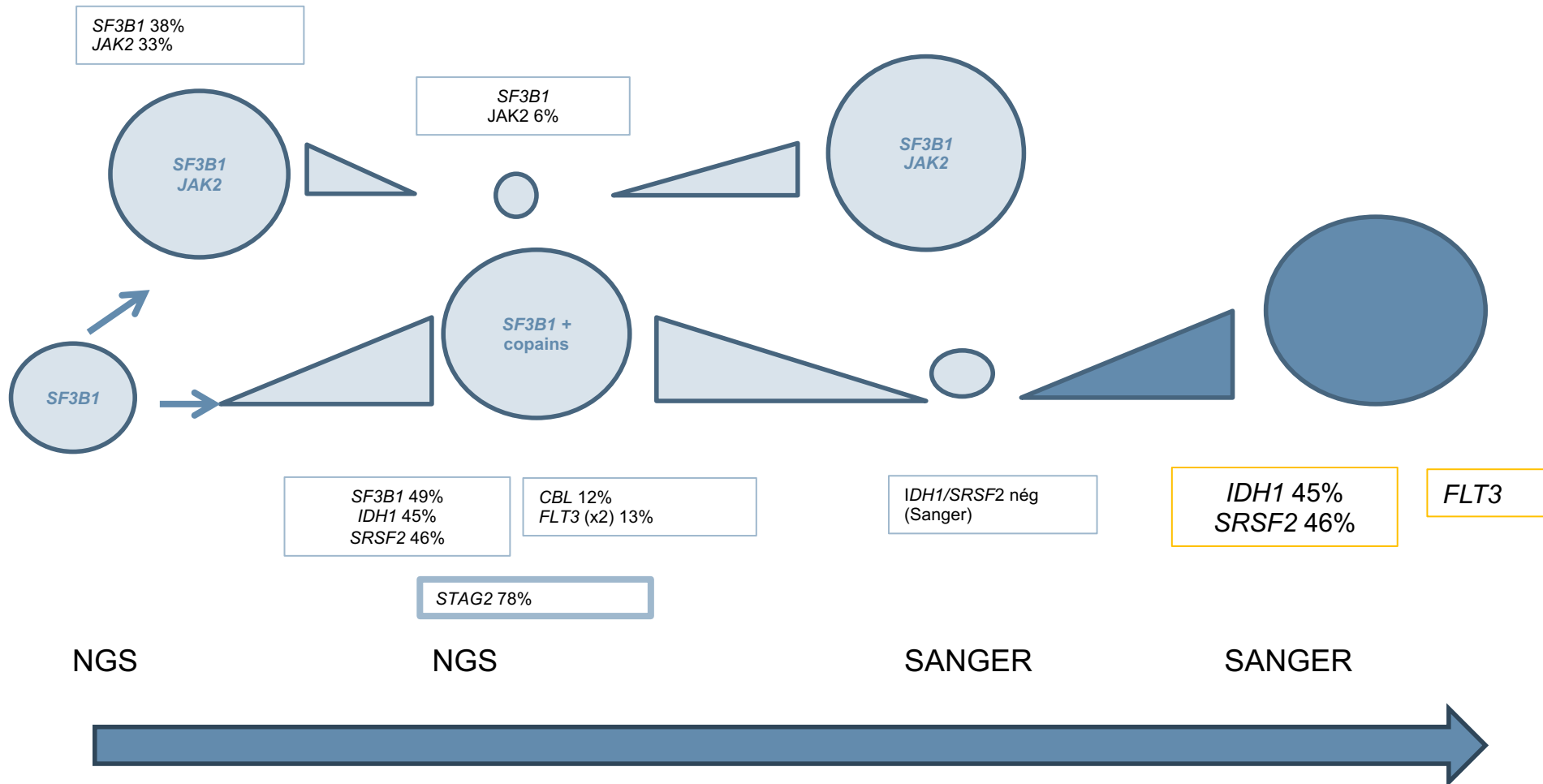
SANGER

SANGER

2015

2016

2017



## Le NGS à Cochin

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC  
**ion torrent**  
ION S5 & S5XL LAUNCH

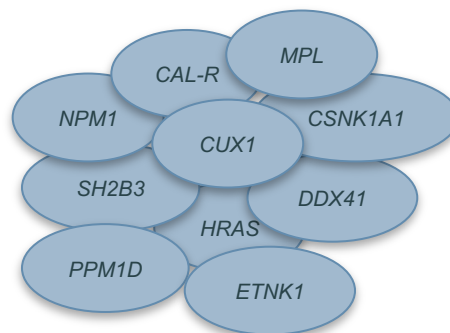


- La technologie
  - Ion torrent PGM → S5

- Le panel :

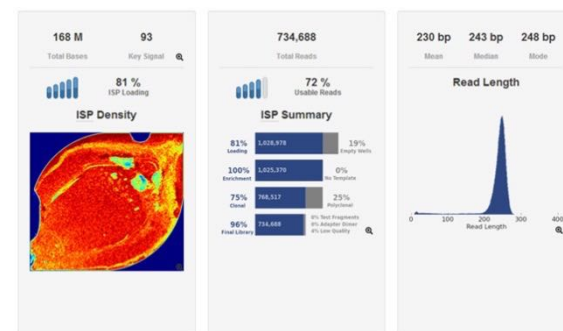
- Octobre 2018
  - 39 gènes
- Novembre 2018
  - -3 G +11 G
  - 47 gènes

ASXL1, ATRX, BCOR, BCORL1, BRAF, CBL, CSF3R, DNMT3A, ETV6, EZH2, FLT3, GATA2, IDH1, IDH2, JAK2, KDM6A, KIT, KRAS, MYD88, NRAS, OGT, PHF6, PTEN, PTPN11, RAD21, RHOA, RIT1, RUNX1, SETBP1, SF3B1, SRSF2, STAG1, STAG2, STAT3, TET2, TP53, U2AF1, WT1, ZRSR2.



- Les indications

- SMD < 75 ans
- LAM quasi systématique (sauf patient >90 ans...)
- SMD/SMP
- SMP : MF essentiellement



- → Discussion des cas en RCP moléculaire



# ADN

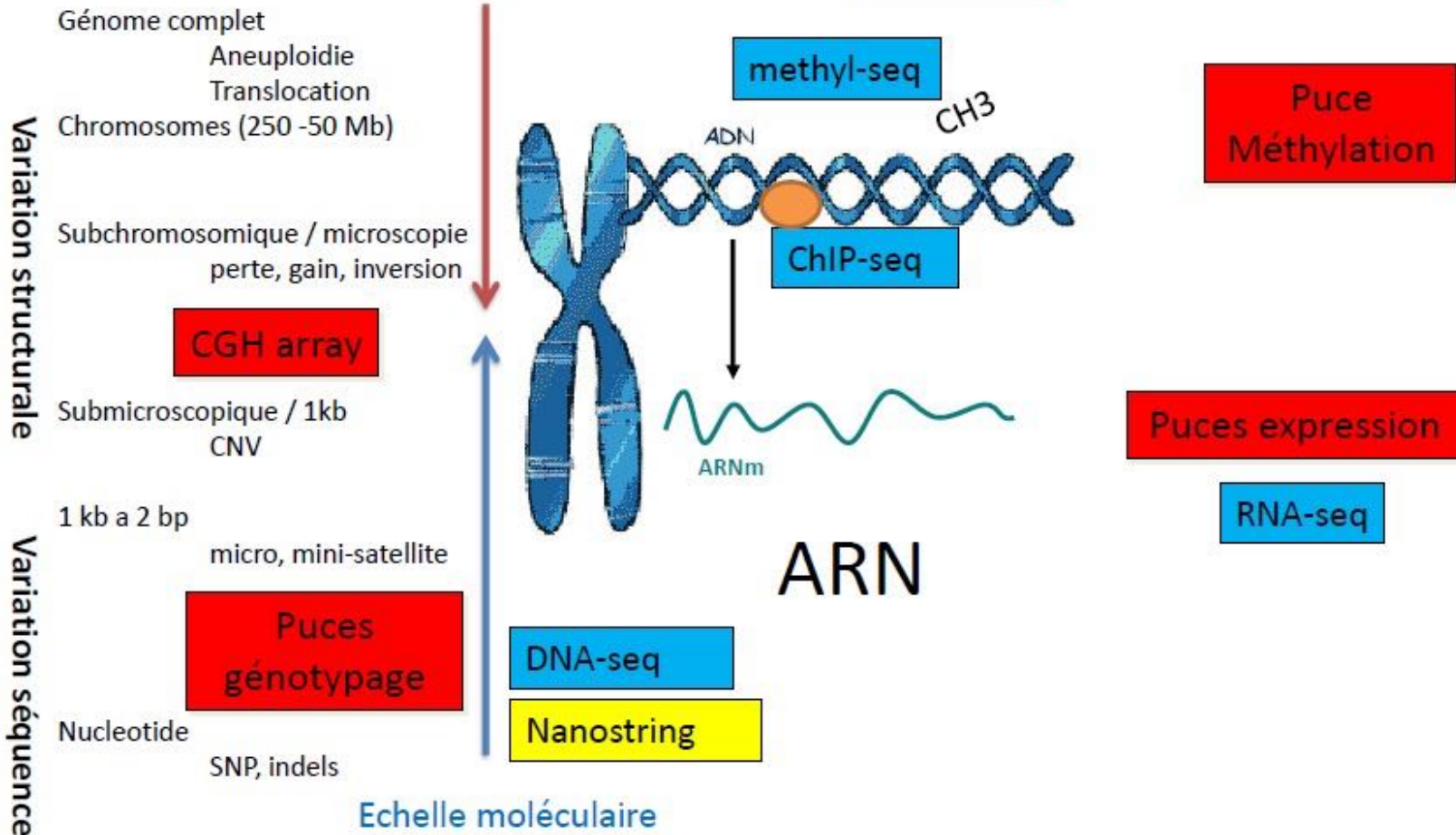
## Les techniques d'études omiques

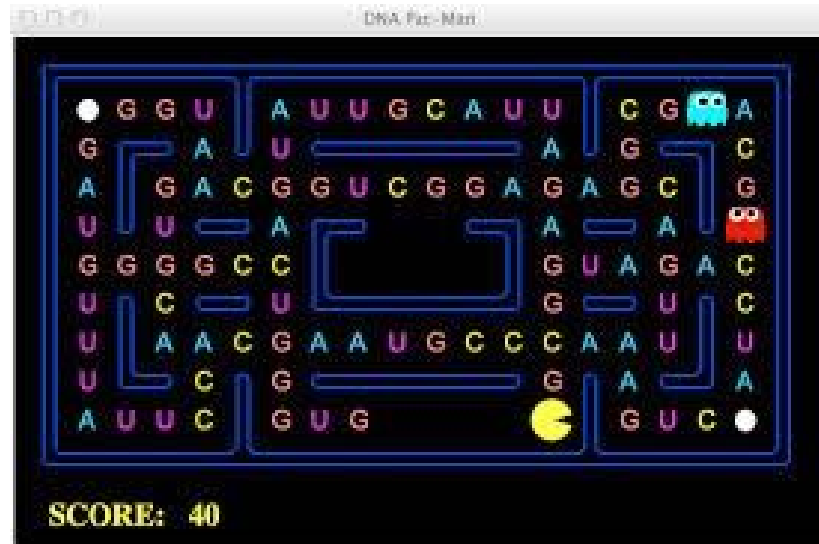
Puce a ADN

NGS

Nanostring

Echelle Cytogénétique





FIN