

**UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

ANNEE : 2020

THESE : 2020 TOU3 2033

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement
Le 5 octobre 2020
par

Malika NOUHAUD

Née le 28/12/1992 à Perpignan

**Intérêt de la CGH-array
dans les hémopathies malignes**

Directrice de thèse: Dr Nathalie GACHARD

JURY:

Présidente du jury

Mme Véronique De Mas, PU-PH, laboratoire d'hématologie, CHU Toulouse

Membres du jury

Mr Jean Feuillard, PU-PH, laboratoire d'hématologie, CHU Limoges

Mme Jill Corre, MCU-PH, laboratoire d'hématologie, CHU Toulouse

Mme Jasmine Chauzeix, MCU-PH, laboratoire d'hématologie, CHU Limoges

PROFESSEURS EMERITES

M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. CHAVANT L.	Mycologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. GAIRIN J.E.	Pharmacologie
M. ROUGE P.	Biologie cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie
M. SIE P.	Hématologie

ENSEIGNANTS NON TITULAIRES

Assistants Hospitalo-Universitaires

Mme LARGEAUD L.	Immunologie
M. LE LOUEDEC F.	Pharmacologie
M. MOUMENI A.	Biochimie
M. PAGES A.	Pharmacie clinique
Mme SALABERT A-S.	Biophysique

Assistant associé des Universités

Mme ROUCH L.	Pharmacie clinique
--------------	--------------------

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Hospitalo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie- Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie- Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BARRE A.	Biologie
Mme BERNADES- GENISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie-Sémiologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice- Doyen)	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie galénique
M. GUIARD B.	Pharmacologie
Mme MULLER- STAUMONT C.	Toxicologie-Sémiologie
Mme REYBIER- VUATTOUX K.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie thérapeutique

MAITRES DES CONFERENCES DES UNIVERSITES

Hospitalo-Universitaires		Universitaires	
M. CESTAC P. (*)	Pharmacie clinique	Mme ARELLANO C. (*)	Chimie thérapeutique
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droite pharmaceutique	Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. PUISSET F.	Pharmacie clinique	M. BERGE M. (*)	Bactériologie-Virologie
Mme ROUZEAU LABORDE C.	Pharmacie clinique	Mme BON C.	Biophysique
Mme SERONIE-VIVIEN S. (*)	Biochimie	M. BOUAJILA J. (*)	Chimie Analytique
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie	M. BROUILLET F.	Pharmacie galénique
		Mme CABOU C.	Physiologie
		Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie galénique
		Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie-Virologie
		Mme COLACIOS S.	Immunologie
		Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
		M. DELCOURT N.	Biochimie
		Mme DERA EVE C.	Chimie thérapeutique
		Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
		Mme EL GARAH F.	Chimie pharmaceutique
		Mme EL HAGE S.	Chimie pharmaceutique
		Mme FALLONE F.	Toxicologie
		Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
		Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie pharmaceutique
		Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
		Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
		Mme LEFEVRE L.	Physiologie
		Mme LE LAMER A-C.	Pharmacognosie
		M. LEMARIE A.	Biochimie
		M. MARTI G.	Pharmacognosie
		Mme MONFERRANS S.	Biochimie
		M. OLICHON A.	Biochimie
		M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
		M. STIGLIANI J-L.	Chimie pharmaceutique
		M. SUDOR J. (*)	Chimie analytique
		Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
		Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*)	Pharmacie galénique
		Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie
		Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Remerciements

A madame le Dr Nathalie Gachard

Je vous remercie d'avoir acceptée de diriger ma thèse. Merci pour votre disponibilité, vos conseils et votre bienveillance. Ça a été un plaisir de travailler avec vous.

A madame le Pr Véronique De Mas

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider ma thèse. Je vous remercie également pour toutes ces connaissances que vous m'avez transmises au cours de mon stage à l'IUCT.

A madame le Dr Jill Corre

Je vous remercie d'accepter d'évaluer mon travail. J'en profite pour vous remercier d'avoir partagé vos connaissances durant mon stage d'hématologie de l'IUCT, ce stage a été particulièrement profitable en grande partie grâce à vous.

A monsieur le Pr Jean Feuillard

Un grand merci pour participer à ce jury, votre présence est pour moi un honneur. Toutes ces après-midis au microscope à vos côtés m'ont fait découvrir et aimer l'hématologie. Merci pour toutes ces questions d'hématologie qui m'ont fait avancer, merci pour votre disponibilité malgré votre emploi du temps chargé et merci pour votre gentillesse.

A madame le Dr Jasmine Chauzeix

Je te remercie d'accepter de participer à ce jury, sois sûre de ma profonde reconnaissance.

Aux membres du laboratoire d'hématologie de Limoges

Un grand merci pour cette formation de qualité. Je remercie l'ensemble des biologistes, plus particulièrement le Dr Franck Trimoreau. Votre partage de savoir m'a été très enrichissant. Merci pour votre aide.

Je remercie le Dr Estelle Guérin, ces après-midis au microscope et en cytométrie en flux à tes cotés ont été très instructifs.

Un merci à tous les techniciens, plus particulièrement Mélanie Boulin avec qui j'ai travaillé sur ce projet. Travailler avec toi a été très agréable.

Je remercie Marie Pierre Laforêt qui s'est occupée de la réalisation des techniques de PCR.

Je remercie Mr Lozach, ingénieur applications chez Agilent pour ses conseils.

Un grand merci au Dr Sylvie Bourtoutmieu qui nous a gentiment prêté ses locaux pour la réalisation des techniques.

Je remercie toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ma formation durant mes stages au CBRS. J'en garde de très bons souvenirs.

Aux membres des laboratoires d'hématologie de Rangueil, Purpan, IUCT et laboratoire du CH de Montauban

Merci pour votre participation à ma formation.

A mes co-internes et amis

Sans vous, mon internat ne se serait pas passé aussi bien:

Théo, Rémy, Sébastien, Guillaume, Charlotte F, Marc, Marine, Mylène, Etienne C, Léa Z, Agnès R, Caroline B, Léa D, Victor, Nicolas, Maxime R, Maxime L, Charlotte R, Wasfi, Sarah N, Cassandra, Pauline, Ali R, Camille, Sylvain, Virginie, Marie-Fleur et tous les autres.

A Céline

Je te remercie pour tous ces bons moments à tes côtés, ces rires, ces joies, ces découvertes, tu es ma boule d'énergie. Merci pour ton amitié.

A Florence

Merci d'être comme tu es, brillante, bosseuse, le cœur sur la main et surtout, une bonne amie sur qui on peut compter.

A Clarisse

Je te remercie d'apporter un peu de sagesse à ce groupe ☺.

Un merci particulier à Yohan et Adélaïde

Vous m'avez fait passer de très bons moments à vos côtés, vous avez été la révélation de Limoges, merci pour votre hospitalité parfois quelque peu baveuse (Merci Matthew).

A Cloé

Mon avocate préférée ☺, même si chacune a fait son chemin, je n'oublie pas notre amitié.

A Ikram et Mounia

Quelques années se sont écoulées maintenant et notre amitié est restée intacte. Merci d'être toujours là.

A Flavie

Merci pour ton authenticité et ton franc-parler. Tu es une des rares personnes sur qui je peux compter. Tu es une précieuse amie.

A Rachel

Tu es quelqu'un de très cher à mes yeux et j'espère que la vie ne nous éloignera pas. Je te remercie d'être toujours présente dans les bons moments comme dans les mauvais. Merci pour tes encouragements lorsque j'en avais besoin et merci pour ta compréhension lorsque je faisais l'ermite.

A ma mère

Je te dédie cette thèse, toi qui as toujours été présente, tu as toujours pensé à nous avant de penser à toi et tes sacrifices n'ont pas été inutiles. Une dédicace me semble dérisoire pour te montrer à quel point tu as tout mon respect et mon amour. Merci pour tout.

A mes frères et sœurs, sans oublier la belle-sœur et le beau frère

Merci d'être toujours présents quand j'en ai besoin, de m'avoir fait grandir, de vos conseils. Vous êtes ma force. Je vous aime.

A Mouaffak

Je te remercie pour avoir été toujours présent tout le long de cet internat. Merci pour ton soutien durant l'élaboration de cette thèse. Tu me pousses vers le haut et je te remercie pour ça. Je suis heureuse de partager cet important moment de ma vie et espère que ce n'est que le début. Je suis chanceuse de t'avoir.

A mon père

Que Dieu t'accorde sa clémence, repose en paix.

Table des matières

TABLE DES ILLUSTRATIONS	1
TABLE DES TABLEAUX	3
LISTE DES ABREVIATIONS	4
INTRODUCTION	7
I. TECHNIQUES DE CYTOGENETIQUE	8
I.1. NOTIONS DE BASES.....	8
I.2. HISTORIQUE	9
I.3. ANOMALIES CHROMOSOMIQUES: DEFINITIONS.....	9
I.4. CARYOTYPE	10
I.4.1. Pré-analytique	10
I.4.2. Mise en culture.....	11
I.4.3. Étalement sur lame.....	12
I.4.4. Dénaturation et coloration	12
I.4.5. Fixation des métaphases.....	12
I.4.6. Établissement du caryotype	13
I.4.7. Avantages et limites	13
I.5. FISH.....	14
I.5.1. Principe.....	14
I.5.2. Indications.....	18
I.5.3. Avantages et limites	18
I.6. CGH.....	18
I.6.1. Historique: la CGH sur étalement métaphasique.....	18
I.6.2. Avancée technologique: la CGH array	19
I.6.3. Une variante: la SNP array.....	20
I.6.4. Les puces à ADN utilisées.....	21
I.6.5. La CGH array: Applications.....	24
I.6.6. Avantages et limites	25
II. APPORT DE LA CGH ARRAY DANS LES HEMOPATHIES MALIGNES	27
II.1. HISTORIQUE DES HEMOPATHIES MALIGNES.....	27
II.2. HEMOPATHIES MALIGNES LYMPHOÏDES	28
II.2.1. Lymphomes non hodgkiniens.....	28
II.2.2. Leucémie lymphoïde chronique	29
II.2.3. Myélome multiple	32
II.2.4. Leucémies aiguës lymphoïdes.....	34
II.3. HEMOPATHIES MALIGNES MYELOÏDES	36
II.3.1. Leucémies aiguës myéloïdes.....	36
II.3.2. Syndromes myélodysplasiques et syndromes myélodysplasiques/ myéloprolifératifs	36
II.3.2.1. Syndromes myélodysplasiques	36
II.3.2.2. Syndromes myélodysplasiques / myéloprolifératifs : exemple de la leucémie myélomonocytaire.....	38
II.3.3. Syndrome myéloprolifératif : exemple de la leucémie myéloïde chronique.....	38
III. MATERIEL & METHODES	40
III.1. MISE EN PLACE DE LA TECHNIQUE DE CGH ARRAY AU LABORATOIRE.....	40
III.1.1. Digestion.....	42
III.1.2. Marquage	42
III.1.3. Purification	45
III.1.4. Hybridation.....	46
III.1.5. Lavage.....	49
III.1.6. Scan des lames array.....	50
III.1.7. Analyse des données et interprétation.....	51
III.2. PRESENTATION CLINICO-BIOLOGIQUE DES PATIENTS.....	55
III.2.1. Patient A.....	55
III.2.2. Patient B.....	58

III.2.3.	<i>Patient C</i>	60
III.2.4.	<i>Patient D</i>	61
IV.	RESULTATS ET DISCUSSION	63
IV.1.	MISE EN PLACE DE LA TECHNIQUE	63
IV.2.	PATIENT A	64
IV.3.	PATIENT B	67
IV.4.	PATIENT C	72
IV.5.	PATIENT D	74
	CONCLUSION	79
	ANNEXES	80
	ANNEXE 1: SCORE DE MATUTES (123)	80
	ANNEXE 2: CLASSIFICATION DE BINET (52).....	80
	ANNEXE 3: CLL-IPI (52).....	80
	ANNEXE 4: LEUCEMIE AIGUË / LYMPHOME LYMPHOBLASTIQUE B AVEC ANOMALIES CYTOGENETIQUES RECURRENTES (124)	81
	ANNEXE 5: LISTE DES ANOMALIES REPERTORIEES AU LABORATOIRE D'HEMATOLOGIE DE LIMOGES ET CONDUITE A TENIR DANS LES LAL-T (EN BLEU LES ANOMALIES DETECTABLES EN CGH ARRAY) (78).....	82
	ANNEXE 6: LAM AVEC ANOMALIES CYTOGÉNÉTIQUES RÉCURRENTES (124).....	90
	ANNEXE 7: IPPS-R (84)	90
	ANNEXE 8: PROTOCOLE PCR MULTIPLEX GENES D'IMMUNOGLOBULINES (125)	91
	ANNEXE 9: PCR RUNX1-USP16 (117).....	93
	BIBLIOGRAPHIE	95
	SERMENT DE GALIEN	102

Table des illustrations

Figure 1: Schéma simplifié de la mitose (7).....	8
Figure 2: Aspect morphologique d'un chromosome métaphasique (8).....	8
Figure 3: Technique du caryotype d'après (14)	11
Figure 4: Principe de la FISH (16).....	14
Figure 5: La microscopie en épifluorescence (15).....	15
Figure 6: Exemple de sondes sur noyau interphasique (19).....	17
Figure 7: CGH sur chromosome vs CGH array (26)	20
Figure 8: UPD: perte d'un allèle et duplication de l'allèle restant	21
Figure 9: Technologie des puces Affymetrix (35)	22
Figure 10: Technologie par impression à jet d'encre d'Agilent (38)	23
Figure 11: Cycle général de la synthèse d'oligonucléotides via la chimie des phosphoramidites (38)	24
Figure 12: Représentation graphique des anomalies visibles en CGH array (22).....	26
Figure 13: Représentation des maladies hématopoïétiques d'une «leucémie» (44)..	27
Figure 14: Frottis sanguin d'une LLC (54).....	29
Figure 15: Exemple de prolymphocytes (54).....	30
Figure 16: Classification des LAL-T et principales caractéristiques de chaque sous-groupe (81)	35
Figure 17: Pipeline de la technique de CGH array	41
Figure 18: Marquage par « random priming »	43
Figure 19: Lame de joint.....	46
Figure 20: Chambre d'hybridation	46
Figure 21: Puce à ADN	47
Figure 22: Fermeture chambre d'hybridation.....	48
Figure 23: Vérification de l'absence des bulles	48
Figure 24: Porte-lame	50
Figure 25: Illustration du scanner	50
Figure 26: Exemple d'une image en format TIF après scanner.....	51
Figure 27: Interprétation en CGH array.....	52
Figure 28: Cellules sanguines vu au DM (Patient A).....	55
Figure 29: Caryotype.....	56
Figure 30: FISH c-MYC break apart	57
Figure 31: Métaphase représentative du caryotype (Patient B)	59
Figure 32: Métaphase du caryotype au diagnostic (46,XX,t(9;22)(q34;q11)[20])	60
Figure 33: Métaphase illustrant le clone majoritaire du caryotype de la patiente en 2018	61
Figure 34: Métaphase illustrant le sous-clone du caryotype de la patiente en 2018..	62
Figure 35: Chromosome 4 (patient A)	64
Figure 36: Chromosome 6 (Patient A).....	64
Figure 37: Chromosome 12 (Patient A).....	65
Figure 38: Chromosome X (Patient A)	66
Figure 39: CGH array chromosome 5 patient B.....	67
Figure 40: FISH avec sonde centromérique verte des chromosomes 13 et 21	67
Figure 41: FISH RUNX1 break apart: sonde double couleur rouge en 3' du gène et verte en 5' du gène.....	68
Figure 42: Isochromosome 21 en CGH array.....	68
Figure 43: Interprétation des gains et délétions de l'iso(21) en CGH array	70

Figure 44: Points de cassure du chromosome 21 (Patient A)	71
Figure 45: Délétion des gènes TP53 et WRAP53.....	72
Figure 46: Chromosome 14 (vs Témoin Agilent)	74
Figure 47: Chromosome 14 (vs Patient C)	74
Figure 48: Délétion sur chromosome 14 niveau IGH	75
Figure 49: Chromosome 8 (vs Témoin Agilent).....	75
Figure 50: Zoom sur CASC19.....	76
Figure 51: Visualisation en CGH array de la del11q	77
Figure 52: Chromosome 10 (Patient D vs Témoin Agilent).....	77
Figure 53: Exemple d'électrophorégramme.....	92
Figure 54: Migration sur gel d'agarose	93
Figure 55: Migration sur gel d'agarose (bis)	94
Figure 56: Résultats migration sur MultiNA	94

Table des tableaux

Tableau 1: Les principaux types de sondes spécifiques d'un locus (19)	17
Tableau 2: Principales caractéristiques des différents formats de puces Sureprint G3 par Agilent (41).....	25
Tableau 3: Critères diagnostics du Myélome multiple.....	32
Tableau 4: Présentation des patients de l'étude	40
Tableau 5: Quantités ADN avant digestion.....	41
Tableau 6: Mix de digestion	42
Tableau 7: Dénaturation et hybridation	43
Tableau 8: Mix de marquage	44
Tableau 9: Après marquage.....	44
Tableau 10: Rendement et degré de marquage	45
Tableau 11: Purification	45
Tableau 12: Résultats après purification	45
Tableau 13: Protocole de pré-hybridation.....	46
Tableau 14: Protocole d'hybridation.....	47
Tableau 15: Tableau résumant les critères qualité des puces de CGH Array.....	63
Tableau 16: Mix PCR IgH FR1	91
Tableau 17: Réactifs Genemapper	92

Liste des abréviations

ACA	Anomalies cytogénétiques additionnelles
ADN	Acides Désoxyribonucléiques
Amp	Amplification
BSA	Bovine serum albumin
CGH	Comparative genomic hybridization
CLL-IPI leukaemia	International prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia
CNV	Copy Number Variant
Cy	Cyanine
dATP	Désoxyadénosine triphosphate
dCTP	Désoxycytidine triphosphate
dGTP	Désoxyguanosine triphosphate
DLBCL	Diffuse large B-cell lymphoma
dTTP	Désoxythymidine triphosphate
dUTP	Désoxyuridine triphosphate
ETP	Early-T precursors
FAB	French-American-British
FISH	Fluorescent In Situ Hybridization
GC	Guanine-Cytosine
Ig	Immunoglobuline
IGH	Immunoglobulin heavy
IGHV	Immunoglobulin heavy variable region gene
IPSS	International Prognostic Scoring System
Kb	Kilobase
LAL	Leucémie aigue lymphoïde
LAM	Leucémie aigue myéloïde
LCR	Liquide céphalorachidien
LDH	Lactate déshydrogénase
LFS	Li-Fraumeni syndrome
LLC	Leucémie lymphoïde chronique
LMC	Leucémie myéloïde chronique
LMMC	Leucémie myélo-monocytaire chronique
LNH	Lymphomes non hodgkiniens
LOH	Loss of heterozygosity
Mb	Mégabase
MLPA	Multiplex ligation-dependant probe amplification
MM	Myélome multiple
NGS	Next Generation Sequencing
OMS	Organisation mondiale de la santé
PCR	Polymerase chain reaction
Ph	Philadelphie
RCP	Réunion de concertation pluridisciplinaire
REAL	Revised European-American Lymphoma
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium

RT	Reverse transcriptase
SMD	Syndromes myélodysplasiques
SNP	Single-nucleotide polymorphism

Introduction

Les hémopathies malignes sont des maladies malignes des cellules sanguines et ganglionnaires. Tout comme les autres cancers, elles résultent de l'accumulation d'altérations génétiques (1).

Dans les classifications précédentes, telles que la classification du Groupe coopératif franco-américain-britannique (FAB) pour la leucémie (2), et la classification européenne et américaine pour les lymphomes (REAL) (3), les hémopathies malignes étaient classées en fonction des caractéristiques morphologiques de la population de cellules anormales en combinaison avec la clinique. Avec l'élargissement des connaissances sur l'oncogenèse, en particulier sur les mécanismes génétiques, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a élaboré un système de classification universellement accepté en 2001, puis révisé en 2008 et 2016, selon la lignée d'origine des cellules et la combinaison de critères morphologiques, immunophénotypiques, génétiques et cliniques (4).

Les études cytogénétiques jouent un rôle essentiel dans le diagnostic, la classification, le pronostic et le traitement (5).

L'explosion récente des techniques de biologie moléculaire peut rendre obsolète, pour certains, la réalisation du caryotype, technique longue, coûteuse et relativement peu sensible. L'avantage le plus évident est la vision globale qu'elle donne des anomalies génétiques présentes au sein du clone tumoral. En effet, alors que les techniques de biologie moléculaire et de FISH ciblent une anomalie, le caryotype permet la détection de toute anomalie, sans préjuger de sa nature, à condition qu'elle ait une taille suffisante pour être détectée et que des métaphases aient pu être générées au sein du clone tumoral. La CGH array peut combler le fossé entre la faible résolution du caryotype standard et les techniques ciblées de la FISH et la biologie moléculaire en fournissant une analyse pan-génomique à haute résolution.

Le but de ce travail est d'étudier l'intérêt de la CGH array dans les hémopathies malignes. Pour cela, nous avons comparé l'analyse par CGH array au caryotype chez divers patients. La première partie présentera les différentes techniques de cytogénétique, puis nous verrons la mise en place de la technique de CGH array pour enfin finir par la discussion des résultats.

I. Techniques de cytogénétique

I.1. Notions de bases

Le noyau de la cellule humaine contient près de deux mètres d'ADN qui peuvent être condensés jusqu'à 10.000 fois. L'ADN contient les gènes qui constituent le patrimoine génétique d'une personne. Au cours de la division cellulaire, aussi appelée mitose, l'ADN va prendre une structure particulière en forme de X nommée chromosome. Plus précisément, l'observation des chromosomes devient possible lors de la métaphase, troisième phase de la mitose. La mitose se divise en six étapes : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase, la télophase et la cytokinèse (cf figure 1). Chez l'être humain, chaque cellule contient 23 paires de chromosomes, soit 46 chromosomes. Une paire de chromosomes dits sexuels ou gonosomes déterminent le sexe d'une personne: XX pour une fille et XY pour un garçon. Chaque paire de chromosomes est composée d'un chromosome d'origine maternelle et d'un chromosome d'origine paternelle réunis au moment de la fécondation par la rencontre des deux gamètes. Sur le plan structural, le chromosome métaphasique est constitué de deux chromatides, la présence du centromère forme une constriction permettant de différencier un bras court désigné par la lettre «p» et un bras long désigné par la lettre «q», les deux extrémités sont appelées télomères (cf figure 2) (6). Le centromère joue un rôle important au cours de la mitose. A la hauteur du centromère vont se fixer des structures protéiques cylindriques appelées microtubules, qui assureront la migration des chromosomes à chaque pôle de la cellule. Après cette étape de migration des chromosomes, la cellule pourra se diviser en deux, c'est la cytokinèse.

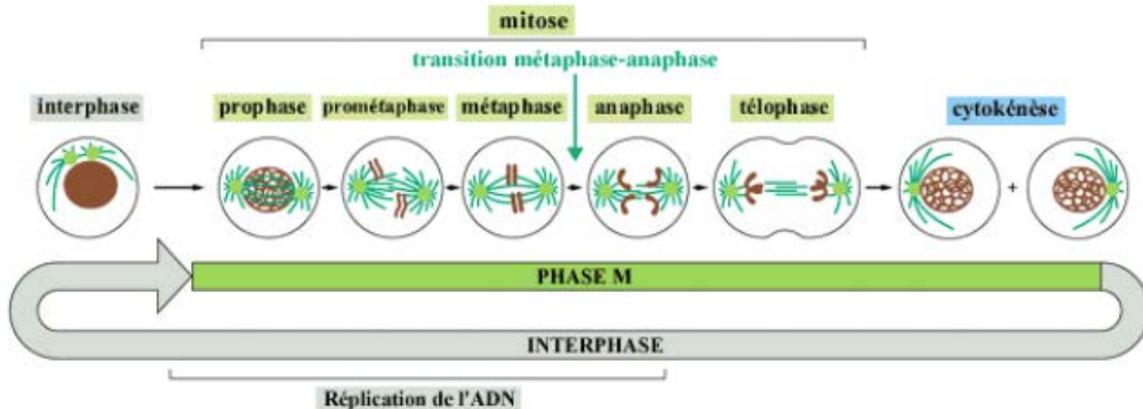


Figure 1: Schéma simplifié de la mitose (7)

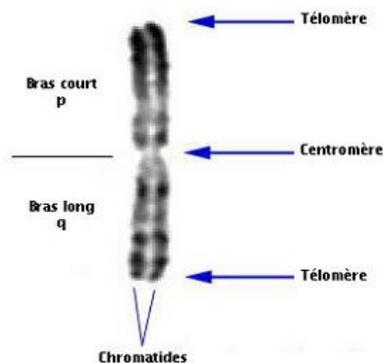


Figure 2: Aspect morphologique d'un chromosome métaphasique (8)

En pratique clinique, la cytogénétique hématologique a trois principaux intérêts. Elle a tout d'abord un intérêt diagnostique, les anomalies observées étant parfois un critère diagnostique majeur. Elle a surtout un intérêt pronostique: en fonction du type et du nombre d'anomalies. Enfin, elle a un intérêt dans la prise en charge thérapeutique: la découverte de certaines anomalies permet d'orienter le traitement. La cytogénétique permet également de suivre l'évolution de la pathologie dans le temps et d'évaluer la réponse de la maladie au traitement.

I.2. Historique

Le point de départ de la cytogénétique moderne fut le dénombrement correct des chromosomes humains en 1956 par Tjio et Levan à partir de cultures de fibroblastes de poumon embryonnaire (9).

La première étude des anomalies cytogénétiques associées aux hémopathies fut la découverte d'un chromosome «minute» par Nowell et Hungerford en 1960 dans les cellules de patients atteints de leucémie myéloïde chronique (LMC) (10). Ce chromosome rebaptisé chromosome Philadelphie (Ph) correspond au chromosome 22 avec une délétion partielle du bras long. L'intérêt de cette découverte est que pour la première fois une anomalie cytogénétique est corrélée à un type de leucémie, laissant supposer une relation de cette anomalie avec un évènement causal.

Cette découverte initia de nombreuses recherches de nouvelles anomalies chromosomiques. Mais aucune avancée majeure n'est faite jusqu'au développement des techniques de bandes chromosomiques.

Ce n'est qu'en 1973 que Janet Rowley a montré que le chromosome Philadelphie résulte d'une translocation $t(9;22)(q34;q11)$ (11).

Ces découvertes ont relancé l'intérêt des biologistes moléculaires vis à vis de l'identification de nouvelles anomalies chromosomiques acquises.

Plusieurs centaines d'anomalies récurrentes des hémopathies malignes sont maintenant connues et un grand nombre d'entre elles a pu être caractérisé sur le plan moléculaire (12). L'étude et la recherche des anomalies moléculaires fait appel à des techniques de cytogénétique que nous allons développer et en particulier les techniques de cytogénétique moléculaire.

I.3. Anomalies chromosomiques: Définitions

Une anomalie chromosomique peut être constitutionnelle ou acquise. En ce qui concerne l'anomalie constitutionnelle, l'individu la porte dans toutes ses cellules. Cela s'applique aux pathologies constitutionnelles, non abordées ici. En ce qui concerne l'anomalie acquise, un seul organe est touché. L'accident chromosomique s'est produit au cours de la vie de l'individu. Le sujet est porteur d'un processus cancéreux sur l'organe impliqué.

Une anomalie chromosomique peut être homogène ou mosaïque. Elle est dite homogène si toutes les cellules du tissu examiné portent la même anomalie. Une anomalie acquise survenue lors d'une leucémie peut être présente sur toutes les cellules sanguines étudiées chez cet individu (à condition que les cellules sanguines normales soient suffisamment inhibées pour que l'on n'en retrouve aucune en mitose).

L'anomalie est dite mosaïque si certaines cellules du tissu examiné portent l'anomalie alors que d'autres sont normales (notion de clone). Par exemple, une anomalie acquise peut n'être présente que sur une partie des mitoses si des cellules normales entrent en division; un clone supplémentaire peut porter des anomalies additionnelles. Les mosaïques sont fréquentes dans les processus malins, soit parce que des cellules normales demeurent et entrent en division, soit parce que le clone malin engendre des sous clones porteurs d'anomalies additionnelles, dites aussi anomalies secondaires (notion d'évolution clonale). Au contraire, l'anomalie acquise est homogène, lorsque seules les cellules porteuses de l'anomalie ont pu être caryotypées. Ces cellules malignes ont envahi le tissu, il n'y a plus de cellules normales ou bien celles-ci n'ont pas été vues en mitose.

Une anomalie chromosomique peut être de nombre ou de structure. Une anomalie de nombre correspond à une perte (on parle de monosomie) ou un gain d'un chromosome (trisomie).

Une anomalie de structure survient lorsque les chromosomes subissent des cassures suivies de recollement des extrémités libres.

Le plus souvent le site de cassure ne se trouve pas dans une séquence codante et ne provoque pas de mutation.

Lors des processus malins, la perte (ou la mutation) d'un gène suppresseur de tumeur est un événement primordial: la cellule garde un comportement normal, mais la perte du deuxième allèle permet l'apparition de la tumeur.

Un recollement erroné d'une région contenant un oncogène d'un côté et un enhanceur (pour amplificateur) de l'autre peut donner naissance à une protéine ayant des propriétés oncogéniques.

Bon nombre d'anomalies structurales sont létales pour la cellule. Parmi celles qui ne le sont pas, les plus fréquentes sont les translocations, les délétions et les petites inversions.

Les chromosomes remaniés sont souvent appelés dérivés (der) et le dérivé porte le numéro du chromosome dont il possède le centromère (13).

I.4. Caryotype

Le caryotype analyse les chromosomes visibles au stade métaphasique à la recherche d'anomalies chromosomiques de nombre ou de structure (6).

I.4.1. Pré-analytique

Les cellules doivent être vivantes, nucléés et capables de se diviser spontanément (exemple des blastes) ou après stimulation par des mitogènes (exemple des lymphocytes). Le tissu utilisé est préférentiellement la moelle osseuse. Le sang périphérique peut être utilisé en cas de passage dans la circulation sanguine des cellules d'intérêt (exemple de la leucémie lymphoïde chronique (LLC)). Plus rarement les ganglions, le liquide céphalorachidien (LCR), les épanchements et tout tissu infiltré peuvent également être exploités.

À la réception de l'échantillon, les informations cliniques sont recueillies. Ces informations sont essentielles au choix des temps de culture et du type d'analyse à effectuer. Elles permettent aussi d'établir l'ordre de traitement des échantillons.

Par exemple, une analyse réalisée dans le cadre d'un suivi sera souvent considérée moins urgente qu'une analyse réalisée à des fins diagnostiques.

La technique nécessite plusieurs étapes jusqu'à l'analyse des métaphases (cf figure 3)

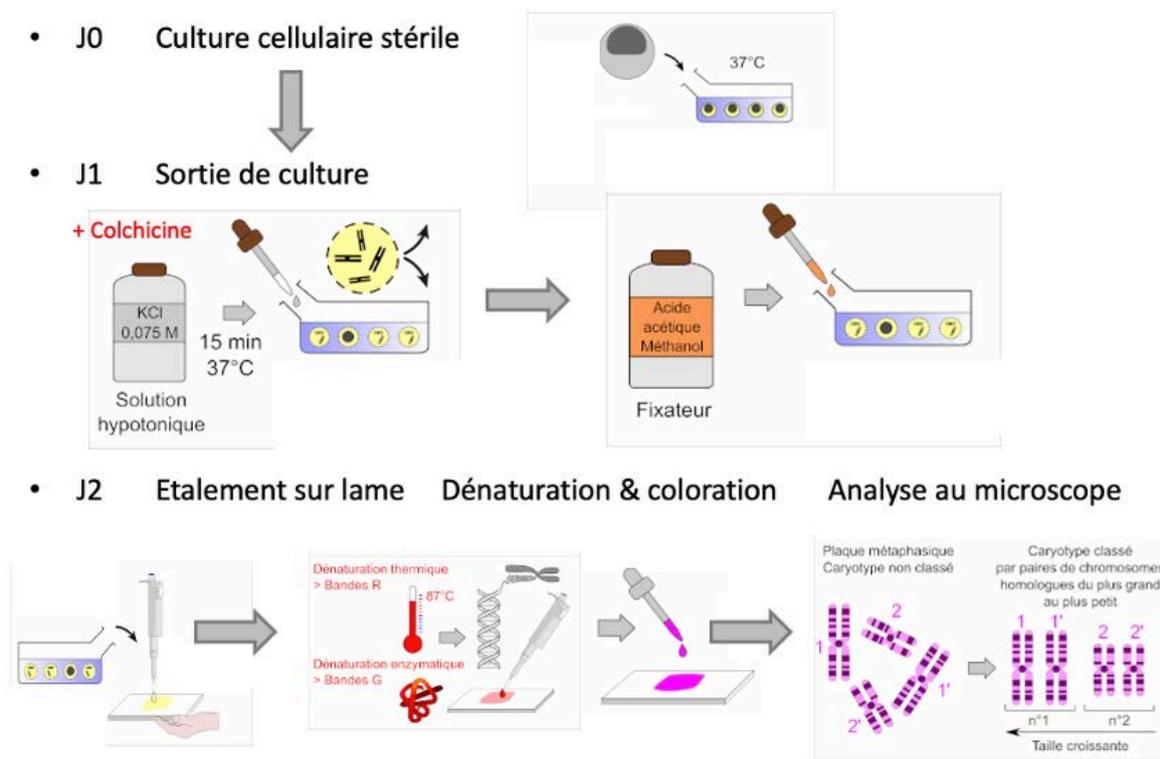


Figure 3: Technique du caryotype d'après (14)

1.4.2. Mise en culture

La réalisation d'un caryotype passe obligatoirement par une étape de mise en culture des cellules. La notion de stérilité prend toute son importance à cette étape. Une contamination peut en effet faire échouer la culture. Avant la mise en culture, on procède à la numération des cellules. La numération permet d'ensemencer en respectant le ratio de un million de cellules par millilitre de milieu d'ensemencement. On offre ainsi aux cellules des conditions optimales pour se diviser. La liste des réactifs constituant le milieu d'ensemencement peut varier entre laboratoires, mais elle comprend généralement du RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium), du sérum de veau foetal décomplémenté, de la L-glutamine et un antibiotique. La culture cellulaire se fait en flacons de culture dans une étuve à 37 °C en présence de 5% de CO₂. Le temps de culture est habituellement de 24 à 48h, durée d'un cycle cellulaire. En cytogénétique, on cible la métaphase, étape où les chromosomes sont le plus condensés. Après une culture de 24 heures, on ajoute un réactif appelé colchicine au milieu de culture. La colchicine est un inhibiteur de la polymérisation des microtubules, permettant ainsi de bloquer la mitose en métaphase. Les cellules sont incubées pendant environ une heure en présence de colchicine de façon à accumuler un certain nombre de cellules bloquées.

Après l'exposition des cellules à la colchicine, la prochaine étape consiste à faire subir un choc hypotonique aux cellules en leur ajoutant une solution de chlorure de potassium. Cette étape permet à la fois de lyser les hématies présentes et de faire gonfler les cellules, pour faciliter la dispersion des chromosomes à l'intérieur de la cellule. Cette étape est réalisée à une température de 37°C et dure de 20 à 30 minutes. Par la suite, les métaphases obtenues sont fixées avec un mélange d'acide acétique glacial et de méthanol absolu (solution de Carnoy). Ce mélange a pour effet de déshydrater les cellules et de dénaturer les protéines qui fragilisent la membrane cytoplasmique, préparant ainsi le matériel pour l'étape suivante, soit l'étalement sur lame. Le culot cellulaire fixé, communément appelé culot cytogénétique, est le matériel de base qui servira aux analyses de cytogénétiques. Ce culot contient un mélange de cellules bloquées en métaphase, qui serviront à l'analyse des chromosomes, et de cellules en interphase, c'est-à-dire des cellules qui n'étaient pas à l'étape appropriée au moment de l'exposition à la colchicine.

I.4.3. Étalement sur lame

L'étalement consiste à déposer les préparations chromosomiques récoltées sur une lame, dans une enceinte à humidité et température contrôlées. On adapte la technique au type d'échantillon en s'assurant de ne pas trop disperser ou enchevêtrer les chromosomes afin de bien les analyser. Cette étape est importante pour la réalisation d'un caryotype de bonne qualité. Une fois l'étalement effectué, les lames sont séchées à l'air. Cette étape est également importante car elle conditionne la qualité de la dénaturation et de la coloration des chromosomes.

I.4.4. Dénaturation et coloration

La dénaturation est l'étape qui permet de faire apparaître les bandes chromosomiques. Il existe deux techniques de dénaturation: thermique ou enzymatique. La dénaturation enzymatique sous l'action de la trypsine permet d'obtenir un marquage en bandes G. Cette dernière est la plus utilisée dans le monde. La technique par action thermique est celle la plus utilisée en France et permet d'obtenir un marquage en bandes R.

La dénaturation repose sur les propriétés physico-chimiques de l'ADN: les diverses régions chromosomiques vont se comporter de façon différente lorsqu'elles sont exposées à l'agent dénaturant. Après la dénaturation, la coloration au Giemsa (mélange de bleu de méthylène et d'éosine qui colore l'ADN) rend visibles les bandes obtenues par dénaturation.

I.4.5. Fixation des métaphases

Après toutes les étapes décrites précédemment, l'analyse des chromosomes peut débuter. Au moyen du microscope, on cherche et photographie les métaphases sur les lames en sélectionnant des métaphases de qualité satisfaisante.

I.4.6. Établissement du caryotype

Après avoir photographié un nombre suffisant de métaphases (20 minimum), on passe à l'étape de classement des chromosomes à l'aide d'un logiciel d'analyse. Il apparie les chromosomes deux par deux et les range par ordre, en vue du repérage d'éventuelles anomalies.

La reconnaissance et le classement des chromosomes demandent de l'expérience. Il faut être capable de repérer des anomalies parfois très petites.

On parle de «clone» lorsqu'une anomalie est observée sur au moins deux mitoses dans le cas d'une anomalie de structure ou d'un gain de chromosome, et sur au moins trois mitoses dans le cas d'une perte d'un chromosome. Le dossier du patient est par la suite remis au cytogénéticien dont le rôle est de valider le caryotype et de rédiger le rapport en tenant compte du contexte clinico-biologique.

Ainsi se déroule l'analyse de cytogénétique conventionnelle, qui présente l'intérêt de permettre l'analyse de toutes les anomalies présentes dans une cellule (cf figure 3). Encore très manuelle, cette technique peut demander beaucoup de temps.

Le classement se base sur la taille des chromosomes (du plus grand au plus petit) et l'indice centromérique (taille du bras court/taille du bras court + long). La formule s'écrit de la façon suivante: nombre de chromosome par cellule, chromosome sexuel, anomalie par ordre numérique croissant. Notons que chaque bras est arbitrairement divisé en régions, notées de un jusqu'à quatre (pour certains chromosomes) en partant du centromère. Pour une translocation, une première parenthèse correspondra aux chromosomes transloqués suivie d'une virgule puis d'une seconde parenthèse avec les points de cassures. Le nombre de métaphases est noté entre crochet. Par exemple, on note 46,XX,t(9;22)(q34;q11)[10] pour la translocation impliquant la région q34 du chromosome 9 et la région q11 du chromosome 22 dans la LMC chez une femme vu sur 10 métaphases. Un sous clone sera précédé de «sl».

I.4.7. Avantages et limites

Le caryotype est une technique longue, coûteuse et assez peu sensible. Son avantage principal est l'image globale qu'elle donne des anomalies génétiques présentes au sein du clone tumoral. En effet, le caryotype permet la détection de toute anomalie, si sa taille est assez grande pour être détectée et que des métaphases aient pu être produites. Ainsi, en un seul examen, cette technique peut mettre en évidence des anomalies de nombre ou de structure chromosomique, et également de préciser le caractère complexe ou non du caryotype. Il est établie qu'un caryotype est complexe si le nombre d'anomalies est au moins égale à trois ou cinq selon la pathologie ou la grille de score pronostique. Enfin, il est possible de mettre en évidence des sous-clones, signes de l'évolutivité tumorale. Comme tout examen, il existe des limites qu'il faut prendre en compte.

La première limite est l'absence totale de métaphases correspondant au clone tumoral. La seconde limite est le besoin de génération de métaphases, et donc la nécessité d'avoir un prélèvement fraîchement prélevé. Une troisième limite importante est la résolution de la technique.

En effet, l'analyse repose sur la microscopie optique et sur le décodage de la succession de bandes claires et sombres obtenues par le marquage. Cette résolution varie également avec la qualité des chromosomes. La résolution est de l'ordre de 10 millions de paires de bases (soit 10Mb). Ainsi, toute anomalie chromosomique portant sur un fragment dont la taille est inférieure à ce seuil est invisible par le caryotype. Pour remédier à ces limites, l'hybridation in situ fluorescente (ou FISH pour Fluorescent In Situ Hybridization) est une alternative (5).

I.5. FISH

I.5.1. Principe

Cette méthode permet la mise en évidence d'anomalies de l'ordre de quelques milliers de paires de bases (kb). Cette technique repose sur les propriétés de dénaturation et de renaturation de la molécule d'ADN (15). Dans certaines conditions de température, de pH ou de salinité, les deux brins d'une molécule d'ADN peuvent se séparer (phénomène appelé dénaturation) puis se réassocier (étape appelée la renaturation) de façon spécifique du fait de la complémentarité des bases de la molécule d'ADN (cf figure 4).

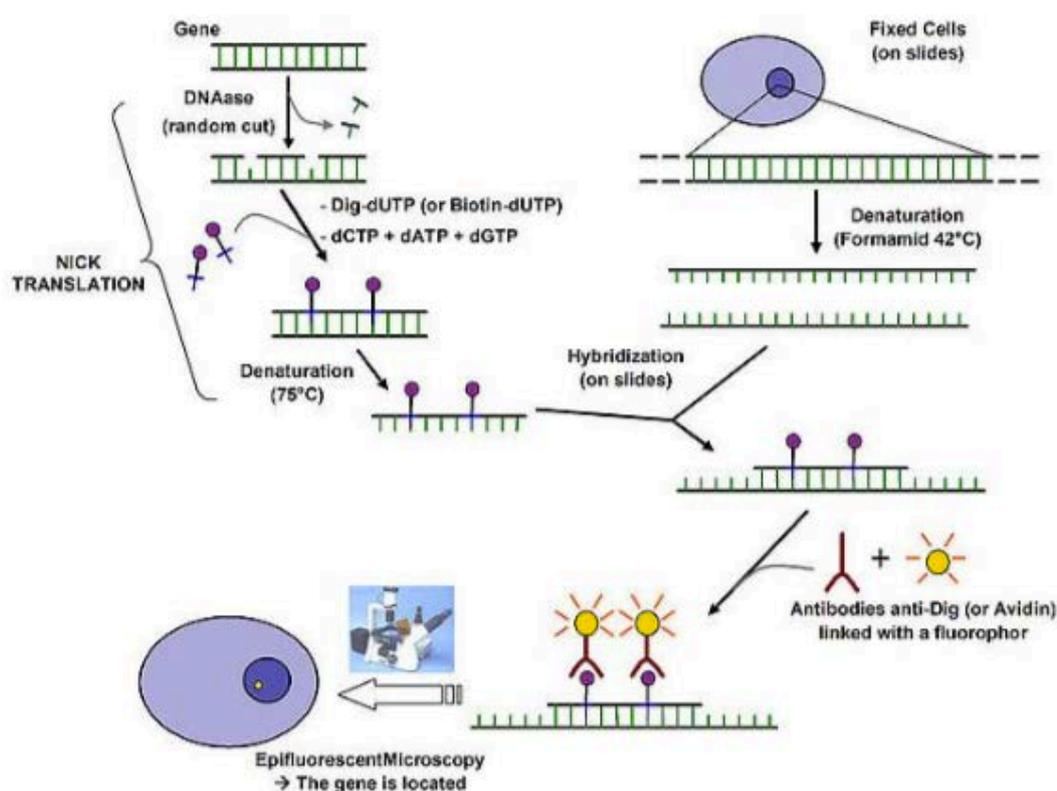


Figure 4: Principe de la FISH (16)

En 1981, l'équipe de David Ward intègre par voie chimique un nucléotide (dUTP) couplé à de la biotine dans un fragment d'ADN (cette opération s'appelle le «marquage») qui est alors appelé «sonde» (17). Dénaturée, puis hybridée sur des préparations chromosomiques, elles aussi préalablement dénaturées, la sonde est révélée par des anticorps anti-biotine couplés à un fluorochrome, le FITC.

Grâce à un microscope qui émet un faisceau lumineux excitant le FITC, David Ward visualisa directement sur des chromosomes la localisation de la sonde. Ainsi naît l'hybridation in situ fluorescente, permettant l'observation de loci sur des métaphases ou des noyaux, d'où le terme in situ.

Aujourd'hui, la technique utilise les mêmes procédés et nécessite plusieurs étapes. Une première étape de digestion permet une meilleure pénétration de la sonde dans le noyau. Ensuite, l'ADN de la sonde et de l'ADN cible sont dénaturés, habituellement par chaleur. Cela provoque la séparation des deux brins d'ADN par rupture des liaisons hydrogènes. Une étape d'hybridation permet à l'ADN de la sonde de s'hybrider à l'ADN cible. Un lavage conduit à l'élimination des hybrides infidèles et des sondes non hybridées. Une contre-coloration de l'ADN cible est ensuite effectuée. Les résultats sont étudiés avec un microscope à épifluorescence. En analysant les signaux fluorescents, il est possible de déterminer la présence, la localisation et le nombre de copies d'une séquence cible et de détecter les remaniements de nombre ou de structure.

Le microscope à épifluorescence

Le microscope à épifluorescence est équipé de plusieurs filtres permettant de voir les différents fluorochromes. Les molécules émettent une lumière lorsqu'elles sont excitées par une longueur d'onde appropriée. Des filtres sont disponibles avec plusieurs bandes passantes permettant de détecter plusieurs couleurs durant la même observation.

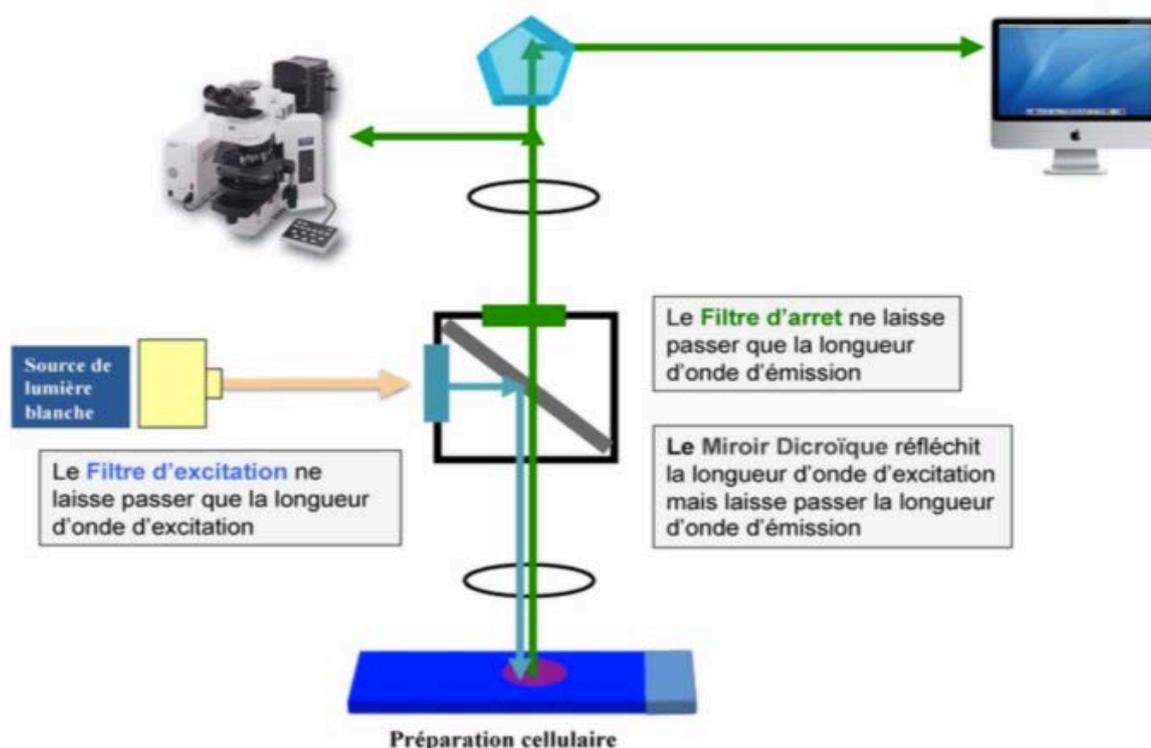


Figure 5: La microscopie en épifluorescence (15)

La figure 5 ci-dessus illustre la microscopie en épifluorescence. Un rayon lumineux de lumière blanche (contenant l'ensemble des longueurs d'onde de l'ultra-violet aux infrarouges) est généré par des lampes à mercure (donnant des pics d'intensité dans les longueurs d'onde du visible) ou à Xénon (pics d'intensité homogène pour toutes les longueurs d'onde). Cette lumière est transmise au niveau d'un dispositif contenant deux filtres et un miroir dichroïque. Le premier filtre sélectionne une longueur d'onde d'excitation correspondant au fluorochrome intégré dans la sonde d'intérêt qui est ensuite réfléchi par le miroir dichroïque sur la lame hybridée. Une fois le fluorochrome excité, il émet une longueur d'onde d'émission, d'intensité plus faible, qui peut alors passer à travers le miroir dichroïque pour arriver ensuite au filtre d'émission de façon à éliminer des longueurs d'onde parasites. Cette longueur d'onde d'émission est par la suite transmise aux oculaires du microscope pour être observée par l'œil de l'observateur ou au niveau d'une caméra qui numérise ce signal. En changeant de filtres, on peut alors étudier de cette façon plusieurs sondes marquées par des fluorochromes différents, la fluorescéine (FITC) et la rhodamine étant les plus utilisées. Les sondes sont marquées soit par des procédés enzymatiques par introduction d'haptènes (biotine, digoxigénine), soit par procédés chimiques (18).

Les sondes

Les plus anciennement utilisées sont les sondes dites « centromériques » ou « alphas » , formées de séquences répétées, spécifiques de la plupart des régions centromériques des chromosomes humains. Ces sondes sont très utiles pour la détection des anomalies numériques, directement sur noyaux interphasiques.

Le second type de sonde est formé par les sondes dites de « peinture chromosomique ». La sonde est alors un chromosome humain entier (ou un bras chromosomique), marqué par un fluorochrome. Ce type de sonde est utile pour l'identification de chromosomes inconnus ou la mise en évidence de translocations. La limite est qu'elles ne peuvent être utilisées que sur chromosomes métaphasiques.

Enfin, le dernier type de sonde est formé des sondes dites « séquences uniques » ou monocus (cf tableau 1). Chaque sonde est alors spécifique d'une région chromosomique présente en un seul exemplaire par génome haploïde. Le nombre de sondes de ce type est virtuellement infini. Ces sondes peuvent avoir de multiples indications: recherche de délétions ou d'amplifications et, de plus en plus, recherche de translocations spécifiques. Elles peuvent s'utiliser sur chromosomes métaphasiques comme sur noyaux interphasiques, à condition d'avoir une taille suffisante (de l'ordre de 30 kb) (5). Concernant la recherche de translocations spécifiques, il existe trois principaux types de sondes. Concernant les sondes dites de fusion, un gène est marqué par rhodamine (donnant une fluorescence rouge) et l'autre gène est marqué par FITC (donnant une fluorescence verte). Si une translocation existe, elle entraîne un gène de fusion conduisant à la visualisation d'un spot rouge et un spot vert correspondant aux allèles non réarrangés et un ou deux signaux de fusion (vert + rouge) correspondant au gène de fusion. Le second type de sonde possède un système de signal supplémentaire (Extra Signal) permettant de réduire la fréquence des cellules normales présentant une FISH anormale en raison de la co-localisation aléatoire de signaux de la sonde dans un noyau normal.

Le dernier type de sonde dite « break apart » (ou sonde de séparation) fonctionne à l'inverse des précédentes. La partie 5' du gène est marquée par FITC et la partie 3' du gène, par rhodamine. Si une translocation entraîne un réarrangement du gène en question, le gène normal est visualisé par la fusion des deux fluorochromes, un spot vert et un spot rouge séparés correspondra au gène réarrangé (19) (cf figure 6).

Tableau 1: Les principaux types de sondes spécifiques d'un locus (19)

Type de sondes	Résultats			Exemples de sondes
Single color	Délétion Noyau normal : 2 signaux rouges + 2 signaux verts Noyau anormal : Perte d'un signal vert (figure 6.H)	Monosomie Noyau anormal : 1 signal vert + 1 signal rouge	Trisomie Noyau anormal : 3 signaux rouges + 3 signaux verts	Délétion TP53
	Amplification Noyau normal : 2 signaux rouges + 2 signaux verts (figure 6.E) Noyau anormal : Amplification du signal rouge (figure 6.F)			Amplification HER2
Dual color Dual Fusion	Noyau normal : 2 signaux rouges + 2 signaux verts (figure 6.C) Noyau anormal : 2 signaux jaunes + 1 signal rouge + 1 signal vert (figure 6.D)			Translocation IGH-BLC2
Dual color Extra signal	Noyau normal : 2 signaux rouges + 2 signaux verts Noyau anormal : 2 signaux jaunes + 2 signaux rouges (dont un extra-signal) + 1 signal vert (figure 6.G)			Translocation BCR-ABL
Dual color Break apart	Noyau normal : 2 signaux jaunes (figure 6.A) Noyau anormal : 1 signal jaune + 1 signal rouge + 1 signal vert (figure 6.B)			BCL6

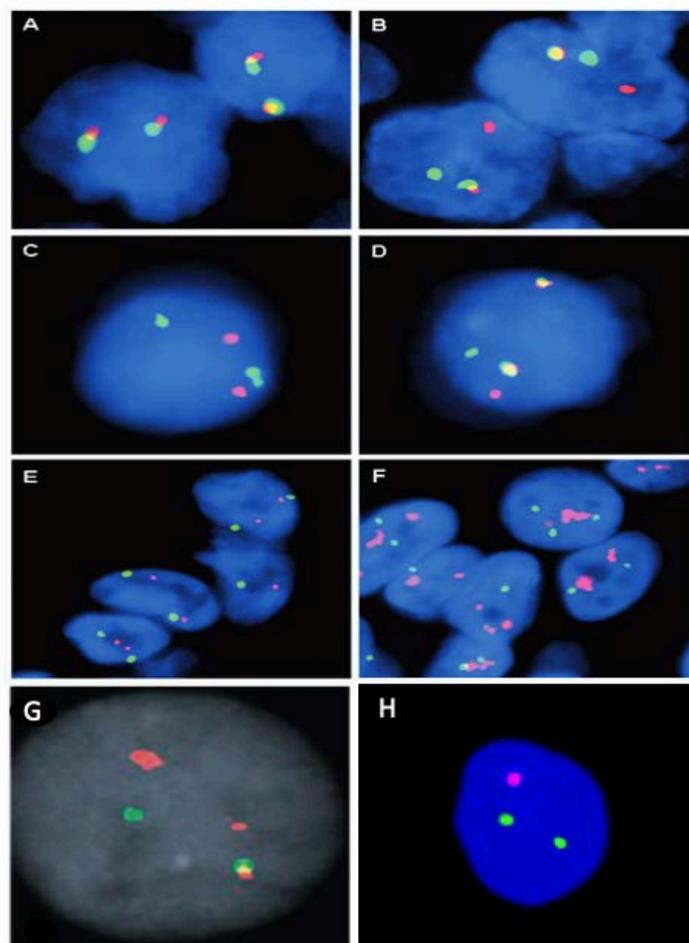


Figure 6: Exemple de sondes sur noyau interphasique (19)

I.5.2. Indications

Cette méthode permet de détecter la présence ou l'absence, la position et le nombre de copies d'une séquence particulière d'ADN. En hématologie, il existe de nombreuses anomalies cytogénétiques récurrentes, de sorte que le choix des sondes est en fonction de la maladie étudiée : par exemple, la recherche d'un réarrangement des gènes BCR et ABL dans le cadre d'un syndrome myéloprolifératif ou la recherche des délétions des gènes TP53 et ATM dans le cadre d'une LLC. La technique FISH permet également de détecter des anomalies cryptiques, non détectables par analyse cytogénétique conventionnelle, comme la translocation $t(12;21)(p13;q22)$ impliquant respectivement ETV6 et RUNX1, retrouvée dans 25% des cas de leucémie aigue lymphoblastique B de l'enfant. Elle sert également à mettre en évidence des anomalies non détectables en cytogénétique conventionnelle ou en biologie moléculaire telles que les amplifications de gènes. Différents types de sondes permettent de rechercher différents types d'anomalies. Les sondes sont soit spécifiques d'un locus pour mettre en évidence des anomalies de structure, soit des sondes centromériques pour des anomalies de nombres, soit des sondes de peinture chromosomique pour explorer les réarrangements chromosomiques complexes. La technique FISH permet de déceler les principales anomalies récurrentes ayant une portée pronostique (6).

I.5.3. Avantages et limites

De nombreuses améliorations ont permis d'obtenir une qualité et une reproductibilité remarquables. Son utilisation pratique est relativement facile et rapide. Contrairement au caryotype et comme pour la biologie moléculaire, la FISH permet une analyse ciblée explorant un nombre restreint d'anomalies. Outre son niveau de résolution, la FISH présente de nombreux avantages par rapport à la cytogénétique classique. Elle peut être utilisée sur cellules congelées, voire fixées et incluses en paraffine. En cas d'échec du caryotype (absence de métaphases clonales), le culot de cellules fixées peut être utilisé pour analyse par FISH interphasique (5).

I.6. CGH

I.6.1. Historique: la CGH sur étalement métaphasique

En 1992, l'équipe de Kallioniemi développe une nouvelle technique de cytogénétique: l'hybridation génomique comparative (ou CGH pour «Comparative genomic hybridization») (20). Le principe est de comparer le nombre de molécules d'une même quantité d'ADN de deux individus. Pour cela, le marquage de l'ADN test et l'ADN témoin est effectué par 2 fluorochromes différents afin d'être cohybridé sur chromosome métaphasique normal. Les régions de gain ou de perte de séquences auront des changements d'intensité des deux fluorochromes en fonction des chromosomes cibles. Ainsi, cette technique a permis de s'affranchir de l'analyse morphologique des chromosomes d'un patient en analysant son contenu global en ADN.

La CGH est une méthode de cytogénétique moléculaire permettant de détecter les variations du nombre de copies (ou CNV pour Copy Number Variant) entre deux génomes.

Dans sa forme originale, l'ADN des échantillons de référence et d'essai était marqué de différentes couleurs et hybridé aux chromosomes en métaphase. Les rapports entre les intensités de fluorescence de l'échantillon à tester et de l'échantillon de référence ont été quantifiés à l'aide d'une analyse d'image numérique et utilisés pour identifier les pertes ou les gains génomiques de l'échantillon à tester (par exemple, un échantillon de tumeur) par rapport à l'échantillon de référence (20). La CGH conventionnelle est laborieuse, fournissant des résolutions relativement faibles de 5-10 Mb pour les délétions et 2 Mb pour les amplifications car le ratio d'intensité des fluorochromes est établi au niveau de chaque bande chromosomique (21). Cependant, la CGH peut être utilisée comme un outil de détection car il ne nécessite aucune connaissance préalable des déséquilibres chromosomiques (22).

1.6.2. Avancée technologique: la CGH array

La CGH a évolué et est maintenant réalisée non plus sur chromosomes mais sur des séquences d'ADN courtes, fixées sur un support (23)(24). Ces supports sont appelés puce à ADN d'où le nom de CGH array (array = puce en anglais). Le principe de la CGH array est similaire à celui de la CGH (cf figure 7). La technologie des puces à ADN repose sur l'hybridation d'un jeu ordonné de molécules d'ADN (appelées sondes) fixées sur un support solide avec de l'ADN d'un échantillon biologique.

Une puce comporte quelques centaines à plusieurs dizaines de milliers d'unités d'hybridation appelées «spots» (de l'anglais spot = tache), chacune étant constituée d'un dépôt de fragments d'ADN ou d'oligonucléotides correspondant à des sondes de séquences données. Lors de l'hybridation, les molécules marquées en solution vont se fixer sur les molécules d'ADN correspondantes présentes sur la puce. Après lavages et exposition, une image d'hybridation est obtenue, avec des signaux quantifiables, d'intensité variable selon les spots. Ces intensités sont ensuite quantifiées, normalisées, puis analysées par des outils bio-informatiques. Les puces à ADN sont généralement recouvertes de sondes oligonucléotidiques de 25 à 200 pb, autorisant une résolution de l'ordre du kilobase, soit bien supérieure aux 10Mb du caryotype, ou aux 5Mb de la CGH sur chromosome (25).

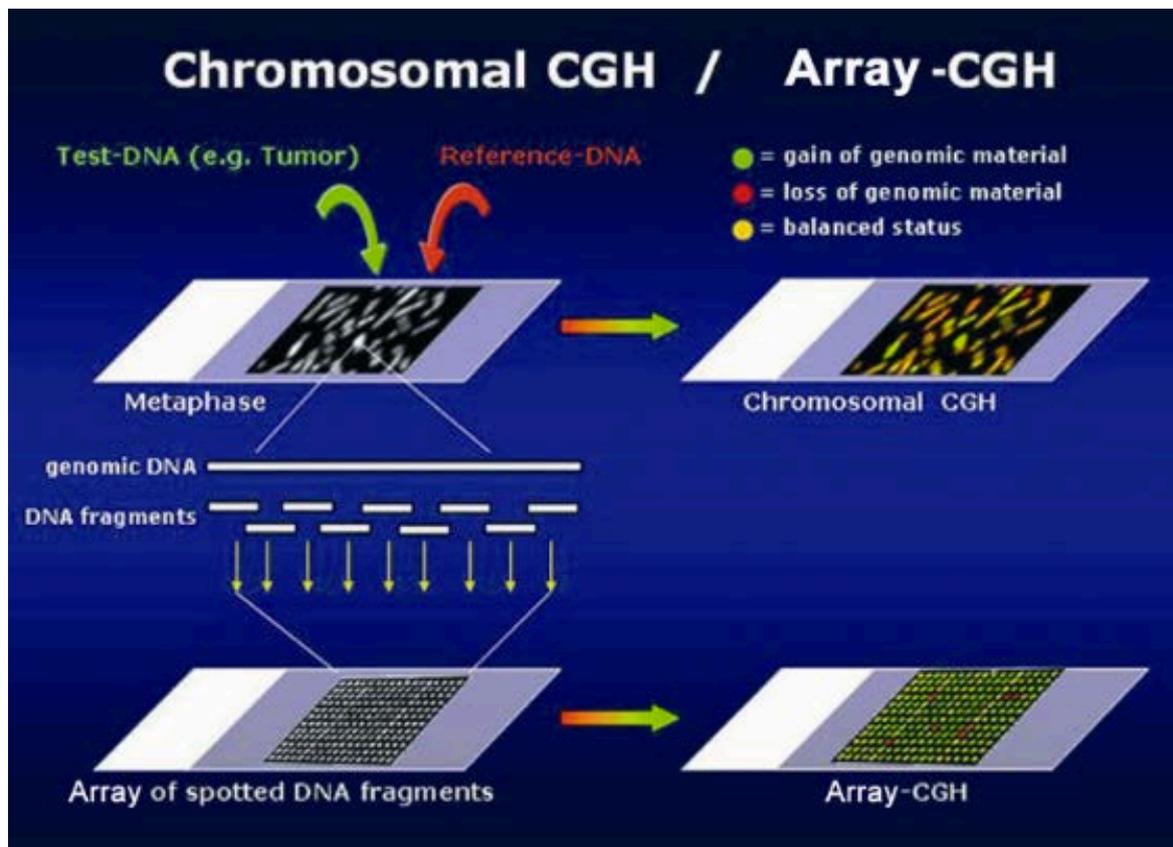


Figure 7: CGH sur chromosome vs CGH array (26)

I.6.3. Une variante: la SNP array

Des oligonucléotides contenant des « Single Nucleotide Polymorphisms » (SNPs) sont fixés sur les lames. Un SNP est la variation génétique d'un seul nucléotide, ces variations sont distribuées uniformément dans le génome humain. Le nombre de SNPs est estimé à plus de 10 millions avec un SNP tous les 100 à 1000 paires de bases. L'avantage de ces puces dans les hémopathies malignes est de pouvoir détecter les disomies unparentales (UPD) et les pertes d'hétérozygoties (LOH), ce qui n'est pas le cas de la CGH array. Les UPD sont consécutives à une perte d'hétérozygotie suivie d'une duplication de l'allèle restant (cf figure 8). Les LOH est la présence d'un seul allèle à un locus donné, avec perte du second allèle.

Le mécanisme d'UPD peut conduire à la duplication de gènes mutés. Un exemple est la mutation JAK2 des syndromes myéloprolifératifs, dupliquée par UPD dans la majorité des maladies de Vaquez. Les LOH par délétion seule peuvent être également leucémogènes par insuffisance allélique ou par délétion d'un allèle fonctionnel unique, l'autre allèle étant muté. Les LOH touchent essentiellement les gènes suppresseurs de tumeur.

Contrairement à la CGH array, un seul échantillon marqué est hybridé à la matrice de SNP à la fois; les CNV sont également détectées, par comparaison avec un ou plusieurs échantillons de référence analysés dans des hybridations séparées. Un inconvénient de cette technologie est l'exigence d'une étape d'amplification par PCR pour augmenter le rapport signal/bruit; en conséquence, des biais d'amplification peuvent être introduits, donnant lieu à des CNV parasites (27).

Le manque de mises à jour récentes des matrices SNP pourrait être dû à l'émergence du séquençage nouvelle génération (NGS). Les séquenceurs utilisés en NGS sont capables de produire toutes les informations que les matrices SNP peuvent produire, mais avec une résolution et une précision supérieure.

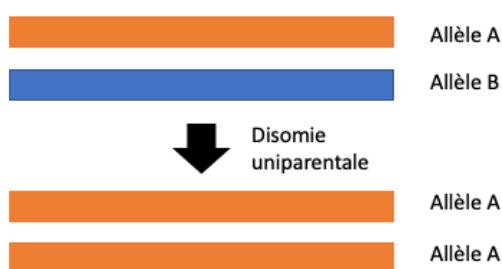


Figure 8: UPD: perte d'un allèle et duplication de l'allèle restant

1.6.4. Les puces à ADN utilisées

Les types de puces à ADN varient selon plusieurs points. D'abord conçues sur des membranes poreuses de nylon, les puces à ADN ont été progressivement mises au point sur lames de verre à la fin des années 90. Le changement de la surface de support d'une membrane poreuse à une surface solide, a apporté des améliorations significatives (28) en augmentant la cinétique de réaction (29) et en réduisant le bruit de fond (30). Le format de la puce va de 1 à 10cm². La miniaturisation, rendue possible par l'utilisation d'un support solide, de marqueurs fluorescents et par les progrès de la robotique, permet aujourd'hui de fabriquer des puces comportant une très haute densité de spots, susceptibles de recouvrir l'intégralité du génome d'un organisme sur une simple lame de microscope. Plusieurs types de puces existent selon la densité des spots, le mode de fabrication, la nature des fragments fixés à la surface et les méthodes d'hybridation. De nombreuses puces à ADN ont été produites, chacune différant par la taille des éléments génomiques repérés et leur couverture correspondante du génome humain (31). Les puces pangénomiques ont des sondes qui couvrent l'intégralité du génome, de la manière la plus uniforme possible.

Au contraire, les puces ciblées ont des sondes couvrant des régions d'intérêt, qui varient en fonction de la pathologie analysée. Il existe également des puces ciblées sur un chromosome, ou sur les régions codantes. La première approche de CGH pangénomique signalée a été l'utilisation de puces à ADNc en 1999 (32). Il y a eu une transition progressive vers la production de puces utilisant des oligonucléotides. Cette transition a été rendue possible par la quantité croissante d'informations sur les séquences d'ADN accessibles au public.

Cela a permis d'accroître la spécificité de la cible. Les puces à oligonucléotides sont créées soit par synthèse in situ, soit par dépôt d'oligonucléotides présynthétisés dont la taille varie de 25 à 60 mer.

Les oligonucléotides synthétisés directement in situ utilisent des techniques de photolithographie adaptées de l'industrie microélectronique. La plateforme GeneChip d'Affymetrix est le principal exemple de cette méthode. Issue de recherches menées au début des années 1990 (33), cette technologie combine la chimie de synthèse combinatoire de l'ADN en phase solide avec les avantages de la photolithographie. Des masques photolithographiques successifs sont utilisés pour sélectionner des régions de la surface de la puce à exposer à la lumière. L'exposition à la lumière déprotège les groupes photolabiles sur les oligonucléotides en cours de synthèse. La déprotection par la lumière permet ensuite à ces régions spécifiques de se coupler avec des monomères nucléosidiques activés en utilisant la chimie de synthèse standard des phosphoramidites d'ADN. Chaque cycle prolonge ainsi l'oligonucléotide d'une base (34) (cf figure 9).

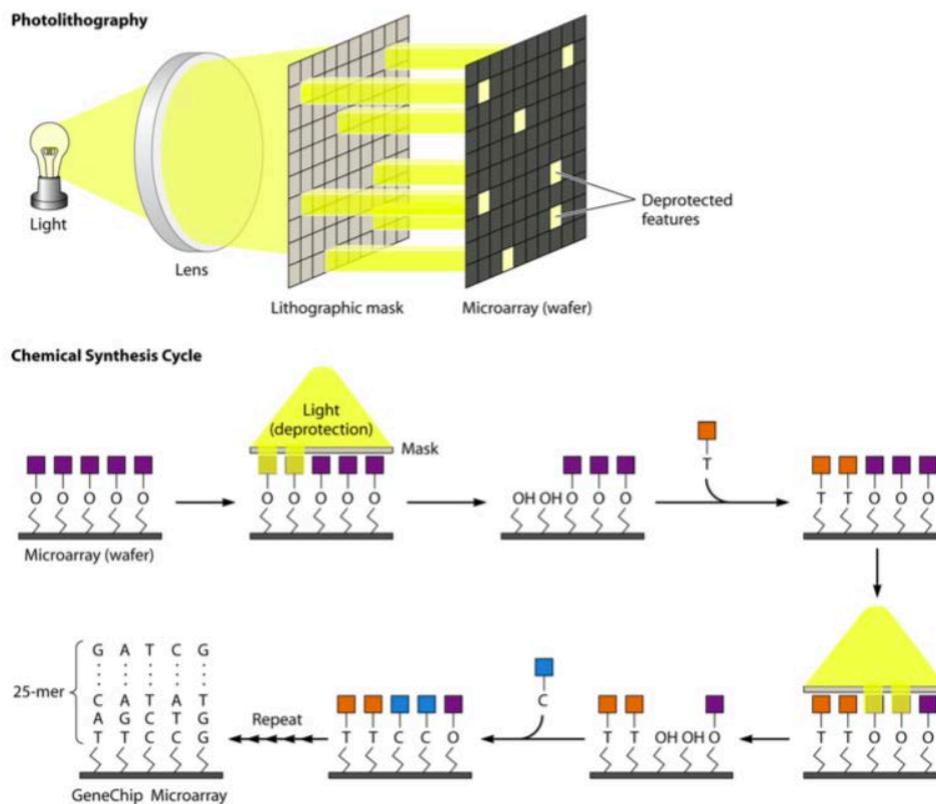


Figure 9: Technologie des puces Affymetrix (35)

La technologie d'impression à jet d'encre permet de créer des puces par dépôt d'oligonucléotides pré-synthétisées (cf figure 10). En 1996, l'équipe de Blanchard propose cette méthode associée à la chimie standard (36). Les monomères nucléotidiques sont imprimés sur la puce et couplés par la chimie des phosphoramidites (cf figure 11).

Pour résumer, les têtes d'impression à jet d'encre sont adaptées pour délivrer aux quatre différents nucléotides des phosphoramidites sur une lame de verre qui a été pré-modélée pour contenir des régions contenant des régions hydrophiles entourées de régions hydrophobes. Les régions hydrophiles offrent une surface à laquelle les phosphoramidites peuvent se coupler, tandis que les régions hydrophobes environnantes contiennent la ou les gouttelettes émises par les jets d'encre vers des régions définies. Agilent a adopté cette technologie pour créer des puces d'oligonucléotides de 60 mer (37). L'approche des matrices à jet d'encre permet l'avantage de disposer d'un petit nombre de réactifs pour produire une matrice. Par conséquent, la technologie des matrices à jet d'encre a été particulièrement utile pour la conception de matrices personnalisées produites en faible volume.

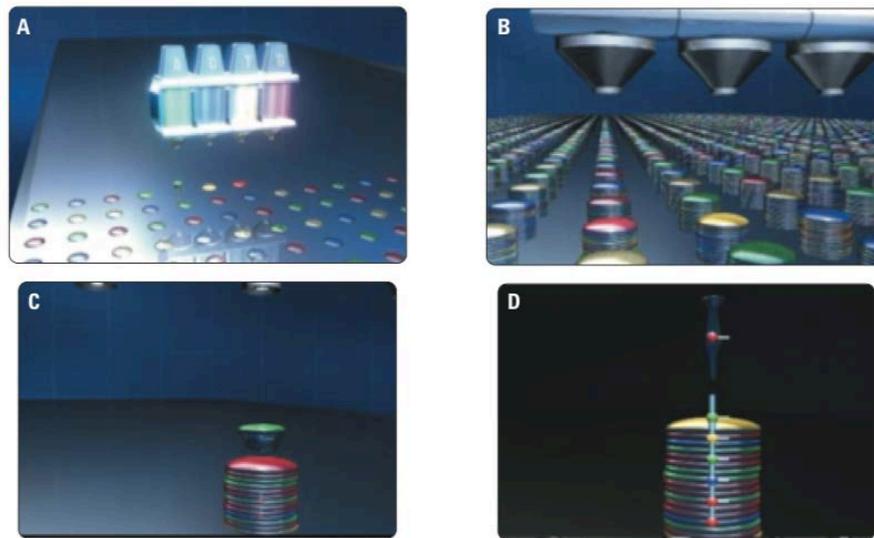


Figure 10: Technologie par impression à jet d'encre d'Agilent (38)

- A** : Première couche de nucléotides déposée sur la surface activée de la puce.
- B** : Croissance des oligonucléotides après que plusieurs couches de nucléotides ont été imprimées avec précision.
- C** : Zoom sur un oligonucléotide lorsqu'une nouvelle base est ajoutée à la chaîne, ce qui est illustré sur la figure **D**

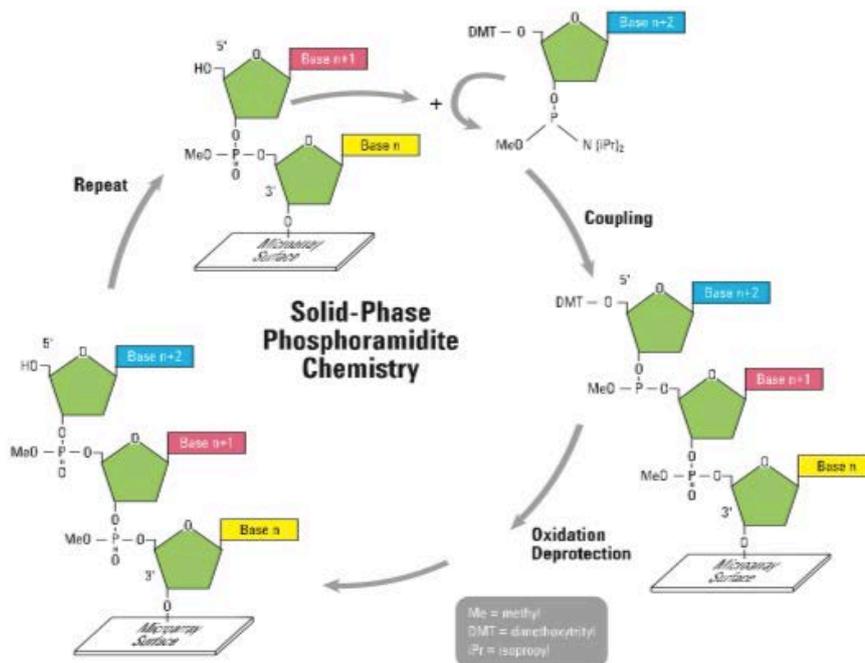


Figure 11: Cycle général de la synthèse d'oligonucléotides via la chimie des phosphoramidites (38)

I.6.5. La CGH array: Applications

Jusqu'à 2005, la majorité des publications liées à la CGH-array concernaient la cytogénétique oncohématologique et la cytogénétique des tumeurs (31). Dans ce domaine, les puces à ADN permettent la détection d'anomalies génomiques quantitatives associées à la progression tumorale et la réponse au traitement (39). Ces anomalies sont souvent secondaires à la pathologie, mais aident à l'orientation diagnostique et pronostique. Par exemple, la SNP array a permis l'identification de nouveaux oncogènes grâce à la détection de déséquilibres chromosomiques récurrents. L'une des découvertes majeure fut la mise en évidence de délétions du gène IKAROS à l'origine de l'acutisation des leucémies myéloïdes chroniques (40).

Agilent dispose actuellement d'un large choix de puces pour l'exploration du génome humain. Les puces diffèrent par le nombre d'analyses pouvant être effectuées, le nombre de sondes oligonucléotidiques se trouvant sur celles-ci et la résolution désirée. Plus la puce contient de spots, plus la résolution est élevée (cf tableau 2).

Tableau 2: Principales caractéristiques des différents formats de puces Sureprint G3 par Agilent (41)

	1M	400K	180K	60K
Nombre de sondes	974,016	420288	180880	62976
Espace médian entre sondes (kb)	2,1	5,3	13	41,4
Nombre de patients par lame	1	2	4	8
Sondes intra-géniques	514,337	218,058	93,675	36,995
Sondes inter-géniques	448,692	192,998	76,659	18,082



1.6.6. Avantages et limites

La CGH array permet une étude globale des gains et pertes de matériel génétique à l'échelle de l'ensemble du génome avec un haut niveau de résolution (détection de microremaniements) (42). Elle dépasse ainsi des limites importantes du caryotype (faible résolution) et de la FISH (étude ciblée du génome). Elle permet de rechercher conjointement un grand nombre d'anomalies diverses incluant les aneuploïdies, microdélétions, amplifications et duplications. La figure ci-après schématise les différentes anomalies détectées. La culture cellulaire n'étant pas nécessaire, elle est donc utilisable lorsque le caryotype est irréalisable par échec de culture, et plus rapide à réaliser que ce dernier. Cette technique est automatisable, dont l'interprétation des résultats n'est pas soumise à l'expertise de l'œil humain contrairement au caryotype. L'automatisation permet également l'étude simultanée d'un plus grand nombre de patients d'où un gain de temps technique.

La principale limite de la CGH array est qu'elle ne détecte pas les remaniements chromosomiques équilibrés sans perte ni gain de matériel chromosomique, telles que les translocations ou les inversions (cf figure 12). Elle ne peut voir que les gains ou les pertes situés au niveau des points de cassure quand le remaniement n'est pas parfaitement équilibré. La CGH array ne détecte pas les anomalies en faible mosaïque (lorsque moins de 10% des cellules sont porteuses de l'anomalie) (42). Cette moindre sensibilité peut résulter soit de la dilution de l'échantillon de la tumeur avec de l'ADN provenant de cellules non tumorales, soit de cellules tumorales présentant une hétérogénéité clonale, avec la présence de petits sous-clones.

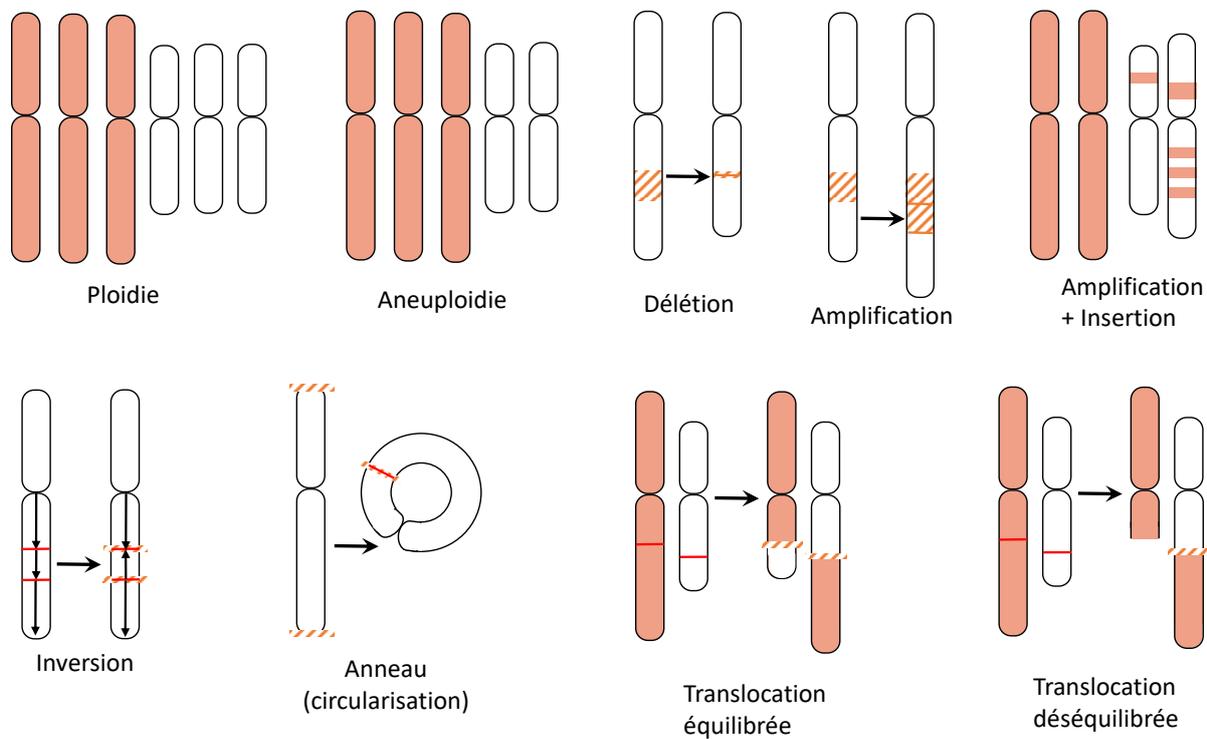


Figure 12: Représentation graphique des anomalies visibles en CGH array (22)

Les inversions, anneaux et translocations a priori « équilibrées » sont visibles à condition qu'il y ait une perte ou un gain de matériel représenté en zone hachurée.

II. Apport de la CGH array dans les hémopathies malignes

II.1. Historique des hémopathies malignes

Le premier cas de leucémie rapporté est attribuable à Peter Cullen. Ce chirurgien anglais publie en 1811 un cas de « splenitis acutus » (hyperplasie aiguë de la rate) chez un patient de 35 ans. Il observe la coloration blanche du sang de son patient, qu'il pense due à la présence de graisses (43).

En 1827, Alfred Velpeau, chirurgien français, fait la même observation chez un patient présentant une splénomégalie et une hépatomégalie massives. Il attribue la coloration laiteuse du sang à la présence de pus circulant.

En 1844, la raison de la coloration blanche du sang est découverte. Alfred Donné, chimiste utilisant la microscopie, décrit pour la première fois l'abondance de « globules muqueux », d'aspect proche mais différent des « globules du pus ». Il est le premier à évoquer un arrêt de différenciation de ces « globules » (appelés aujourd'hui leucocytes). Le médecin pathologiste allemand Rudolf Virchow, l'un des fondateurs de l'anatomopathologie, introduit en 1847 le terme de « leukämie » pour décrire l'association d'un sang laiteux et d'un gonflement de la rate ou des ganglions lymphatiques, terme qui a été conservé jusqu'à aujourd'hui.

Aujourd'hui, la leucémie n'est plus considérée comme une maladie unique mais un groupe de maladies. On différencie des maladies chroniques telles que la leucémie myéloïde chronique et la leucémie lymphoïde chronique, et des maladies aiguës; la leucémie aiguë myéloïde et la leucémie aiguë lymphoblastique (cf figure 13).

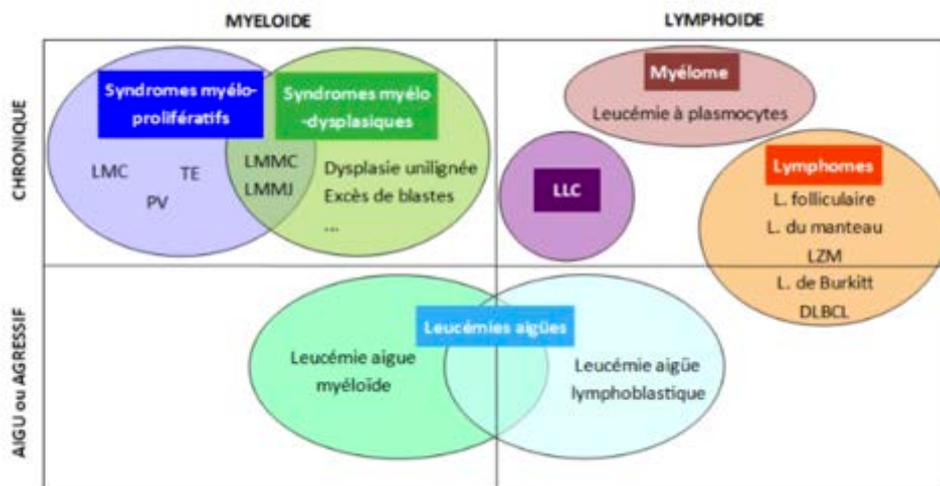


Figure 13: Représentation des maladies hématopoïétiques d'une «leucémie» (44)

LMC : leucémie myéloïde chronique. TE : thrombocythémie essentielle. PV : polyglobulie de Vaquez. LMMC : leucémie myélomonocytaire chronique. LMMJ : leucémie myélomonocytaire juvénile. LZM : lymphome de la zone marginale. DLBCL : lymphome B diffus à grandes cellules

II.2. Hémopathies malignes lymphoïdes

II.2.1. Lymphomes non hodgkiniens

Les classifications des hémopathies malignes se sont succédées pour aboutir à une classification internationale de l'OMS révisée en 2016 (45). La cytogénétique fait partie intégrante de cette classification. Dans les lymphomes non hodgkiniens (LNH), l'analyse cytogénétique a largement participé aux démembrements de groupes hétérogènes en entités distinctes. En effet, certaines anomalies primaires sont spécifiques d'une entité, c'est l'exemple de translocations récurrentes impliquant les gènes des immunoglobulines (Ig) dans les lymphomes B (46).

Le caryotype reste l'examen de choix recommandé dans la plupart des LNH. La FISH constitue également une approche robuste du fait du nombre important de réarrangements récurrents caractéristiques, voire spécifiques, de ces entités (47).

L'apport de la biologie moléculaire dans les lymphomes peut s'avérer utile voire nécessaire au diagnostic d'un lymphome comme par exemple la preuve de la clonalité (réarrangement des gènes d'immunoglobuline); ou bien l'hyperexpression d'un gène, résultant de la dérégulation transcriptionnelle par une translocation récurrente. Cette dernière peut être illustrée par la translocation t(11;14)(q13;q32) dans le lymphome du manteau, aboutissant à l'hyperexpression aberrante de la cycline D1. La recherche de réarrangement récurrent de type «gène de fusion» comme la translocation t(2;5)(p23;q35) des lymphomes ALK+ peut également être mise en évidence. Des mutations somatiques acquises caractéristiques, bien que non spécifiques peuvent être révélées par cette technique (exemple de la mutation de MYD88 dans la maladie de Waldenström ou de BRAF dans la leucémie à tricholeucocytes) (47).

La CGH-array n'est pas recommandée en technique systématique dans la prise en charge des lymphomes. Néanmoins les aberrations des CNV identifiées par CGH-array ont donné des indications importantes pour comprendre le mécanisme de développement des lymphomes. Lorsqu'une variété de lymphomes a été analysée, des altérations génomiques non aléatoires sont devenues évidentes, et il a été constaté que chaque entité pathologique présente des modèles d'altération génomique caractéristiques qui sont différents les uns des autres. Le fait que chaque entité pathologique présente un profil génomique unique indique que ces altérations génomiques jouent un certain rôle dans la formation de chaque type de lymphome. Ainsi, l'exploration des gènes cibles de ces régions génomiques est l'un des domaines de recherche les plus importants pour la compréhension des mécanismes moléculaires du développement des lymphomes (48). Plusieurs équipes se sont intéressées à l'étude du lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL) (49)(50). L'identification de plusieurs sous-groupes en ressort, grâce aux profils génomiques. Cela révèle des voies oncogènes utilisées de manière différenciée par les sous-types de DLBCL, ce qui renforce l'idée qu'elles représentent des maladies pathogéniquement distinctes (51).

L'un des avantages de la CGH array a été l'identification de délétions de petite taille, ce qui a permis de localiser avec précision les emplacements possibles des gènes suppresseurs de tumeurs.

Par exemple, l'analyse des lymphomes des cellules du manteau a permis d'identifier plusieurs régions de délétions homozygotes, dont l'une cible le gène BIM pro-apoptotique (52). Il faut cependant se rappeler que même si l'on peut identifier le gène cible, ce dernier ne suffit pas à lui seul à produire des tumeurs. L'une des orientations futures de ce domaine de recherche est de comprendre l'interaction entre de multiples gènes identifiés.

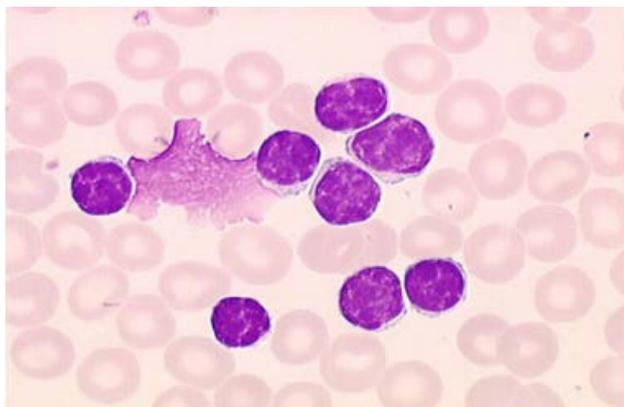
II.2.2. Leucémie lymphoïde chronique

II.2.2.1. Définition et épidémiologie

La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est la plus fréquente des leucémies de l'adulte en Occident. Cette hémopathie est définie par l'accumulation dans le sang, la moelle osseuse et les organes lymphoïdes secondaires (ganglions lymphatiques et rate), de petits lymphocytes B monoclonaux (c'est-à-dire dérivant d'une seule cellule porteuse d'une anomalie génétique initiale acquise), de morphologie mature mais d'immunophénotype caractéristique (cf figure 14). L'immunophénotypage par cytométrie en flux (CMF) permet d'étudier, par immunofluorescence, les antigènes (communément appelés «CD»: Cluster of Differentiation) exprimés par une cellule. La LLC touche principalement les personnes âgées, avec plus de 70% des patients âgés de plus de 65 ans (âge médian au diagnostic de 72 ans) et une prédominance masculine. L'incidence standardisée sur la population mondiale est de 4,4 pour 100 000 personnes-années chez l'homme et de 2,2 pour 100 000 personnes-années chez la femme (53).

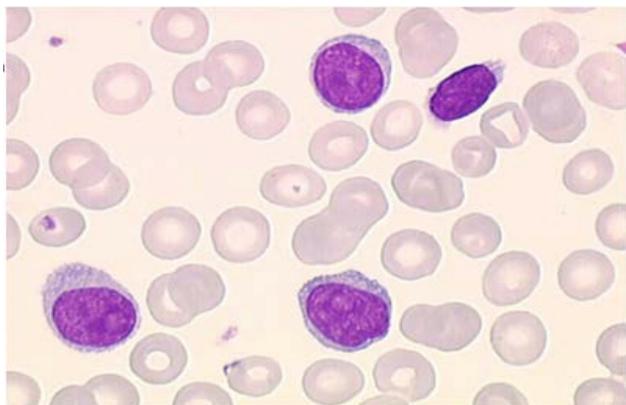
La définition de la LLC a été établie pour la première fois par le Groupe de travail du National Cancer Institute en 1996, puis a été modifiée par le groupe de travail international sur la LLC (iwCLL) en 2008. Le diagnostic de la LLC nécessite la présence d'au moins 5 G/L de lymphocytes B dans le sang et d'une population B clonale détectée par cytométrie en flux. La CMF permet d'établir un score immunologique appelé score de Matutes en fonction de la mise en évidence ou non de certains marqueurs (cf annexe 1). Un score au moins égal à 4 suffit pour poser le diagnostic de LLC.

Figure 14: Frottis sanguin d'une LLC (54)



Les lymphocytes forment une population homogène de cellules de taille réduite avec un noyau à chromatine dense et très peu de cytoplasme (coloration MGG).

Figure 15: Exemple de prolymphocytes (54)



Taille un peu plus grande qu'un lymphocyte, cytoplasme clair plus ou moins abondant, noyau à chromatine mature mais présentant un nucléole net.

II.2.2.2. Clinique de la LLC

La plupart des patients sont asymptomatiques et la LLC est diagnostiquée en raison d'une lymphocytose fortuite lors d'une numération sanguine de routine. Une anémie et/ou une thrombopénie peut être également présente. Dans certains cas, les patients peuvent également présenter une lymphadénopathie palpable et/ou une hépatosplénomégalie, qui, dans de rares cas, peut produire des symptômes secondaires à une compression locale. Les présentations extranodales et/ou extramédullaires de la LLC sont rares, la peau et le système nerveux central étant les sites d'atteinte les plus fréquents. Une minorité de patients se présenteront avec des symptômes constitutionnels, définis comme une fièvre persistante, des sueurs nocturnes et/ou une perte de poids involontaire, tandis que la fatigue est un symptôme courant. Enfin, la LLC peut être diagnostiquée à la suite de signes et de symptômes cliniques secondaires à ses complications plutôt qu'à son implication directe, y compris les maladies auto-immunes, les infections ou les cancers secondaires (53).

II.2.2.3. Indicateurs pronostiques de la LLC

Deux systèmes de stadification clinique largement acceptés coexistent, nommés d'après les premiers auteurs, Rai (utilisé aux Etats-Unis) et Binet (utilisé en Europe). Le système de Binet définit 3 stades selon le nombre d'aires ganglionnaires atteintes et les cytopénies (cf annexe 2). En raison des progrès récents dans le traitement de la LLC, les deux stades cliniques sont devenus insuffisants pour évaluer le pronostic. Des scores de pronostic ont été établis qui combinent les informations cliniques, biologiques et génétiques. Le score de pronostic le plus pertinent actuellement est l'indice international de pronostic de la LLC (CLL-IPI). Il comprend la délétion et/ou mutation de TP53, le statut mutationnel de l'IGHV, le taux sérique de β 2-microglobuline, la clinique et l'âge. Le CLL-IPI sépare ainsi quatre groupes (cf annexe 3)(55).

II.2.2.4. Les indications de l'analyse cytogénétique dans la LLC

Le regain d'intérêt du caryotype dans la LLC date de l'introduction dans les cultures de mitogènes type CD40 ligand ou CpG-oligodéoxynucléotides, plus ou moins des interleukines (IL-2 et IL-4). Ces mitogènes permettent de stimuler les cellules tumorales de la LLC et de mettre en évidence des anomalies cytogénétiques, qui sont retrouvées dans 80 à 90% des cas. Lorsque le diagnostic de LLC est établi, le caryotype seul (sans FISH) ne s'envisage plus car il peut être pris malgré tout en défaut du fait de l'existence d'anomalies cryptiques et de clones minoritaires que la sensibilité du caryotype ne permet pas de retrouver. L'intérêt du caryotype est donc d'apporter des informations supplémentaires à la FISH, plus particulièrement sur l'existence d'un caryotype complexe et la présence de translocations qui ont une valeur pronostique, ou sur l'existence d'autres anomalies cytogénétiques non recherchées par les sondes FISH classiques. Le caryotype est donc recommandé dans la LLC s'il y a une intention de traitement ou lors du suivi de la maladie. Selon les recommandations européennes, l'anomalie obligatoire à rechercher avant tout traitement est la délétion 17p (sonde TP53), ainsi que la mutation du gène TP53. La délétion 11q est également recommandée de rechercher (sonde ATM). Les informations obtenues par l'analyse FISH sont donc limitées aux cibles des sondes sélectionnées.

La PCR multiplex a également été adoptée pour détecter les aberrations génomiques courantes dans la LLC. Cette technique donne de bons résultats lorsqu'il s'agit de cibler les aberrations courantes dans la LLC, mais les altérations génomiques détectées à l'aide de cette technique sont également limitées par les amorces sélectionnées. La PCR ne permet pas d'avoir une perspective globale du génome (56).

II.2.2.5. Apports et limites de la CGH-array dans la LLC

La CGH array est bien adaptée à l'identification des altérations génomiques d'importance pronostique dans la LLC car les aberrations génomiques les plus courantes et les plus importantes sont des pertes et des gains tandis que les translocations sont rares. La FISH a amélioré le taux de détection des altérations génomiques dans la LLC, qui est passé d'environ 50% en utilisant la cytogénétique classique à plus de 80% (57). Bien que la FISH ait une sensibilité technique plus élevée, elle nécessite des hybridations séparées et ciblées pour la détection des altérations sur les loci génomiques d'intérêt. La CGH array a la capacité de fournir une étude pangénomique des CNV en une seule réaction d'hybridation.

La longueur des télomères est corrélée à la nature et à la complexité des anomalies génomiques. Les télomères courts sont associés à la survenue d'anomalies cytogénétiques défavorables [del(17p), del(11q), anomalies multiples], alors que les télomères longs sont associés aux anomalies cytogénétiques favorables [del(13q) isolée ou caryotype normal] (58)(59). Chez les patients avec des télomères très courts, la CGH array a mis en évidence des réarrangements génomiques de grande taille, focalisés dans les régions télomériques. Ces anomalies n'étaient pas retrouvées chez les patients ayant des télomères longs (60). De plus, la CGH array a permis la découverte de nouvelles anomalies récurrentes. Par exemple, le gain du bras court du chromosome 2, fréquente au cours des LLC évoluées, est un marqueur péjoratif de progression de la maladie (61).

D'autres anomalies moins fréquentes ont été découvertes (62)(63), la plupart associées à un pronostic défavorable, comme par exemple le gain de la région 8q24 (64).

Du fait de la limite de la CGH array à détecter difficilement les anomalies en faible mosaïque, les échantillons provenant de patients souffrant d'une LLC récemment diagnostiquée ou d'une maladie évolutive avec un pourcentage élevé de cellules tumorales circulantes peuvent être analysés. Par contre, les échantillons obtenus de patients suivant de près une chimiothérapie ou une greffe de cellules souches peuvent avoir un faible nombre de cellules tumorales circulantes et ne sont pas adaptés à l'analyse par CGH array. De même, la détection des sous-clones peut être limitée lorsque la proportion de cellules tumorales porteuses de l'altération génomique est faible. Dans les cas de LLC où le pourcentage de cellules tumorales est faible, la FISH ou la PCR multiplex sont mieux adaptées à la détection des aberrations génomiques (65).

II.2.3. Myélome multiple

II.2.3.1. Définition et épidémiologie

Le myélome multiple (MM) représente environ 10% des cancers hématologiques et 1% de l'ensemble des cancers et survient principalement dans la population âgée (âge médian au diagnostic de 65 à 70 ans) (66).

Il se caractérise par l'accumulation de plasmocytes tumoraux dans le compartiment de la moelle osseuse et la production d'une immunoglobuline monoclonale dans le sérum et/ou l'urine (66)(67).

II.2.3.2. Critères diagnostiques

Le diagnostic de MM est porté devant au moins 10% de plasmocytes clonaux dans la moelle et la présence d'au moins un des critères CRAB (hypercalcémie, insuffisance rénale, anémie et lésions osseuses) ou de l'un des 3 biomarqueurs de malignité (66)(67). (cf tableau 3)

Tableau 3: Critères diagnostiques du Myélome multiple

Plasmocytes clonaux moelle osseuse $\geq 10\%$ ET un ou plusieurs des événements suivants :	
Critères CRAB	Hypercalcémie
	Insuffisance rénale
	Anémie
	Lésions osseuses (« bones lesions » en anglais)
Ou	
Biomarqueurs de malignité	Plasmocytes clonaux moelle osseuse $\geq 60\%$
	Ratio Chaines légères libres sériques ≥ 100
	> 1 lésion focale à IRM

II.2.3.3. Pronostic et apport de la CGH array

Le MM est caractérisé par une grande hétérogénéité en terme de pronostic. La survie globale médiane peut être de quelques mois à 10 ans (68). Les anomalies cytogénétiques ont un impact considérable sur le pronostic et doivent être systématiquement déterminées lors du diagnostic et de la rechute. L'incidence d'aberrations chromosomiques spécifiques dans le génome des plasmocytes malins est considérée comme l'un des facteurs de pronostic indépendant les plus importants pour les patients atteints de MM. Ces changements sont souvent observés dans les zones chromosomiques où se trouvent les gènes suppresseurs de tumeurs ou les oncogènes. Il est bien établi que la perte de gènes suppresseurs de tumeurs ou les gains de copies d'oncogènes sont des événements essentiels dans le processus de développement des plasmocytes malins (69). Ainsi, leur détection est une étape essentielle dans la détermination de la pathogenèse.

Le caryotype ici est limité en raison de la faible résolution (5-10 Mb) et de la faible prolifération des plasmocytes. Cette limitation peut être surmontée par la FISH. Cependant, cette technique ne détecte qu'un nombre limité de séquences cibles dans le génome. Son taux de détection global atteint plus de 90% des cas (70). L'application systématique de la FISH dans la pratique clinique est principalement axée sur l'identification d'aberrations chromosomiques spécifiques. Cependant, la FISH sur des plasmocytes clonaux isolés est difficile, exigeante en main-d'œuvre, coûteuse et dépendante du nombre d'analyses effectuées. La CGH array donne un outil de cytogénétique moléculaire idéal, permettant la détection d'anomalies chromosomiques spécifiques, y compris les délétions et les duplications, dans une seule expérience. La CGH array a été utilisée pour étudier le MM, et plusieurs zones de récurrence ont été identifiées avec un taux de détection pouvant atteindre 98% (71)(72).

L'avantage de cette technique est qu'elle peut détecter rapidement les régions de gains et de pertes à travers le génome, à un coût inférieur à celui d'un panel FISH élargi, et qu'elle nécessite peu de matériel biologique. Étant donné les avantages et les inconvénients associés à chacune de ces techniques, une approche pour l'identification complète des anomalies chromosomiques dans le myélome consiste à combiner l'analyse FISH, pour la détection des translocations d'Ig, avec la SNP array pour la détection des changements du nombre de copies à l'échelle du génome (73)(74). Dans certains centres, le NGS remplace le SNP array par un panel ciblant les gènes le plus souvent mutés, les CNV et les translocations impliquant IGH (74)(75).

II.2.4. Leucémies aiguës lymphoïdes

Les leucémies aiguës lymphoïdes (LAL) sont des proliférations clonales de cellules immatures engagées dans la différenciation lymphoïde B (LAL-B) ou T (LAL-T) et bloquées à un stade précoce de la différenciation. Cette prolifération a lieu dans la moelle osseuse puis envahit les autres tissus, en particulier le sang périphérique, les organes lymphoïdes (ganglions, rate et, pour les T, thymus) et le système nerveux central. Cette maladie est rare, seulement 40 cas/an/million d'habitants, mais c'est la pathologie maligne la plus fréquente chez l'enfant, trois fois plus fréquente que chez l'adulte. Les LAL de lignée B sont trois à quatre fois plus fréquentes que celles de la lignée T: 85% de LAL-B chez l'enfant et 75% chez l'adulte. Dès les années 1980, l'hétérogénéité des LAL liée à la présence d'anomalies chromosomiques caractéristiques ayant une valeur pronostique indépendante des autres paramètres cliniques et biologiques a été reconnue. La répartition des anomalies cytogénétiques est différente chez l'enfant et chez l'adulte. Cela explique la différence de pronostic entre enfant et adulte avec un taux de guérison chez l'enfant proche de 85 %, soit deux fois plus que chez l'adulte. En effet, une majorité d'anomalies associée à un pronostic favorable est retrouvée chez l'enfant (71). La différenciation des sous-types de LAL sur la base de la classification OMS 2016 repose sur la recherche de certaines anomalies cytogénétiques conditionnant le pronostic et impactant le traitement.

Pour les LAL-B, cette classification distingue neuf sous-types (dont deux entités provisoires) en fonction de la présence ou non d'anomalies cytogénétiques récurrentes. Ces anomalies sont détaillées en annexe 4 (77). Parmi ces anomalies génétiques, la plupart sont des translocations, non détectables par CGH array, mais certaines peuvent l'être, comme les anomalies de ploïdie (hyperdiploïdie: bon pronostic et hypodiploïdie: mauvais pronostic) ou encore la présence péjorative d'anomalies de nombre de copies dans certaines régions du génome telles que l'amplification intrachromosomique du chromosome 21 (iAMP21).

Les délétions d'IKZF1 (Ikaros) ont été identifiées par l'utilisation de la CGH array dans les LAL de l'enfant. IKZF1 code pour un facteur de transcription impliqué dans la différenciation hématopoïétique B. Les délétions de ce gène, totales ou partielles, sont souvent associées à la fusion BCR-ABL1 dans les LAL-B (84% des LAL-B BCR-ABL1+). Elles sont moins retrouvées dans les LAL-B BCR-ABL1 négatives (environ 20%) mais sont fréquentes dans les LAL Ph-like et/ou avec hyperexpression de CRLF2. Une délétion, même partielle, représente un risque élevé de rechute (78).

Les prochains protocoles thérapeutiques utiliseront une combinaison de CNV incluant les délétions d'IKZF1 pour la stratification du risque des patients en se basant sur plusieurs études (79)(80). Il faut savoir que 95% des enfants atteints de LAL sont inclus dans des protocoles thérapeutiques nationaux. La CGH array n'est pas intégrée en routine mais son utilisation est recommandée dans les nouveaux essais cliniques afin d'améliorer la stratification du risque et aider l'orientation de certains patients vers des thérapies ciblées (78).

Les LAL-T constituent un groupe hétérogène de leucémies aiguës allant de formes très immatures n'exprimant pas de marqueurs T jusqu'aux formes composées de lymphoblastes T les plus différenciées exprimant un TCR membranaire. Schématiquement, on peut les définir en 3 grandes catégories en fonction de leur phénotype et de leurs signatures moléculaires: un groupe très immature (ETP pour Early-T precursors), un groupe intermédiaire dit cortical précoce (early cortical) et un groupe mature correspondant au stade cortical tardif (Late cortical) (cf figure 16) (81).

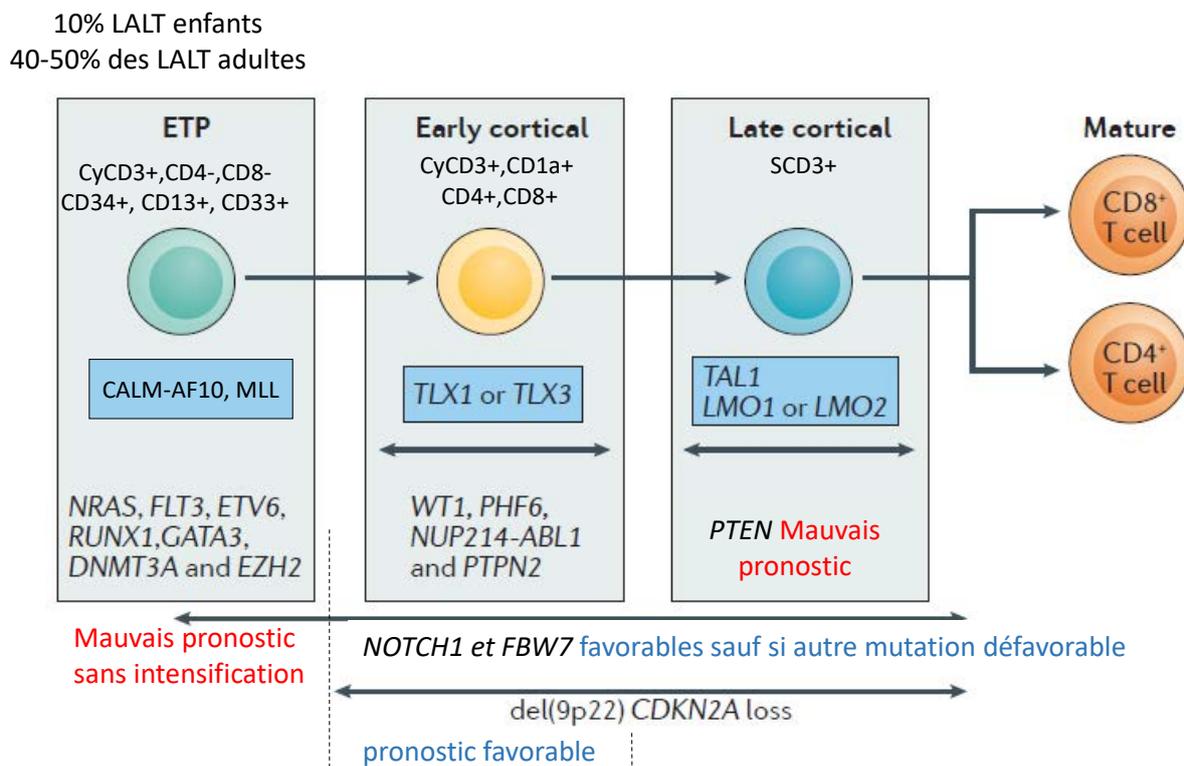


Figure 16: Classification des LAL-T et principales caractéristiques de chaque sous-groupe (81)

Le processus de leucémogène des LAL-T est multi-étapes accumulant des anomalies génétiques. De ce fait, il existe une grande variété d'anomalies décrites dans les LAL-T incluant des translocations, amplifications, délétions, duplications, mutations (cf annexe 5). Certaines anomalies possèdent une valeur pronostique largement décrite. Aussi, actuellement 4 gènes (NOTCH1, FBW7, PTEN et RAS) sont systématiquement étudiés pour leur impact pronostic (78). Cependant, à l'ère du haut débit et de la médecine personnalisée, il est de plus en plus évident que l'association des événements génétiques peut influencer la proposition thérapeutique. Certains gènes peuvent être impliqués dans des translocations avec des partenaires variés ou des délétions (cas de TLX1) voire des mutations (cas de TAL1). L'exploration ne peut se résumer à l'utilisation d'un seul outil et c'est la complémentarité entre le caryotype, la FISH ou la CGH array et le NGS qui permet d'avoir une vue étendue de l'accumulation des altérations génétiques.

II.3. Hémopathies malignes myéloïdes

II.3.1. Leucémies aiguës myéloïdes

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) constituent un groupe hétérogène d'hémopathies malignes caractérisées par la présence dans la moelle, le sang voir d'autres organes, de progéniteurs des cellules sanguines de nature myéloïde qui ont perdu totalement ou partiellement leur capacité à se différencier. L'incidence annuelle des LAM est d'environ 5 nouveaux cas pour 100 000 habitants en France, soit environ 3 000 nouveaux cas par an, avec un âge médian de présentation autour de 65-70 ans (82).

La cytogénétique fait partie intégrante de la classification OMS 2016 des LAM (77). Elle joue un rôle également dans la stratification du risque de rechute/décès des patients (83). Les anomalies concernées sont détaillées en annexe 6. A l'heure actuelle, même si quelques publications se sont intéressées à la mise en évidence d'anomalies cryptiques par CGH array dans les LAM (84)(85), cette technique n'est pas mentionnée dans les techniques recommandées en routine. En effet, la plupart des anomalies sont équilibrées et donc non visibles par cette technique. Toutefois, ces publications montrent l'utilité de la CGH array dans la détection de gènes pouvant avoir un rôle dans la leucémogénèse, la meilleure caractérisation de la taille et de la localisation d'anomalies additionnelles ayant un rôle potentiel dans le pronostic.

II.3.2. Syndromes myélodysplasiques et syndromes myélodysplasiques / myéloprolifératifs

II.3.2.1. Syndromes myélodysplasiques

II.3.2.1.1. Définition et épidémiologie

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont un groupe de troubles hématopoïétiques clonaux divers caractérisés par une hématopoïèse inefficace. Cette dernière se manifeste par une dysplasie morphologique des cellules hématopoïétiques, une insuffisance médullaire conduisant à une ou plusieurs cytopénies périphériques et par un risque d'évolution vers la LAM. Les SMD sont des pathologies du sujet âgé, avec un âge médian au diagnostic de 78 ans chez l'homme et de 80 ans chez la femme. Le taux d'incidence mondial est de 3,4 pour 100 000 personnes-années chez l'homme et de 1,6 chez la femme, soit un rapport hommes/femmes égal à 2,1 .

La classification des SMD de l'OMS a été mise à jour pour la dernière fois en 2016 (86). Les caractéristiques moléculaires récemment identifiées par NGS ont fourni de nouvelles indications pour la compréhension de la physiopathologie des SMD, et ont donné de nouveaux marqueurs liés au diagnostic et au pronostic. Une nouvelle révision des critères de SMD a introduit des améliorations dans la cytopénie et les changements morphologiques, ainsi que la génétique dans la classification des SMD (86).

II.3.2.1.2. Classification pronostique

Un score pronostique international (IPSS, *International Prognostic Scoring System*) proposé en 1997 a été établi en fonction de l'hémogramme, du taux de blastes et des anomalies cytogénétiques (87). Cela permet d'évaluer le risque d'évolution vers une LAM ou le décès, et de donner une approximation de la médiane de survie. Les SMD sont classés en fonction de leur gravité en SMD de bas risque (groupes dits de faible risque et intermédiaire 1) et SMD de haut risque (groupes dits intermédiaire 2 et de haut risque). En 2012 ce score a été révisé (score IPSS-R), permettant de distinguer 5 catégories pronostiques. Environ 25% des patients d'IPSS faible ou intermédiaire 1 deviennent, avec le score IPSS-R, de risque plus élevé (88). Ce score n'est pas validé chez l'enfant et l'allogreffe est systématiquement proposée à cet âge. Le score est détaillé en annexe 7.

II.3.2.1.3. SMD et CGH array

Les études cytogénétiques jouent un rôle essentiel dans l'évaluation des SMD et peuvent établir la clonalité, la classification (par exemple, SMD avec del(5q) isolé), le pronostic et guider les décisions relatives au traitement (88)(89). Les premières études génétiques sur les SMD se sont principalement concentrées sur les anomalies cytogénétiques détectées par le caryotype standard, que l'on retrouve dans environ 50% des cas de SMD (90)(91). Beaucoup de ces lésions se présentent souvent dans le cadre de caryotypes complexes (92)(93).

Environ 50% des cas de SMD donnent des clones qui consistent principalement en des CNV récurrents, dont -Y, del(5q)/-5, del(7q)/-7, +8, del(11q), del(12p), del(13q)/-13, i(17q), +19 et del(20q) (94). Contrairement aux LAM, la majorité des anomalies du SMD sont des changements déséquilibrés, c'est-à-dire des gains ou des pertes de matériel chromosomique, ce qui fait de la CGH array, une technique appropriée pour l'étude des SMD. Plusieurs études publiées comparent le caryotype standard, la FISH et la CGH array chez des patients atteints de SMD. L'application de la CGH array aux échantillons de SMD a permis de détecter de manière fiable les CNV observés au caryotype, d'identifier des CNV cryptiques cliniquement significatifs et de clarifier des caryotypes complexes. Il est à noter que tous les cas de SMD qui n'ont pas produit de cellules en métaphase ont pu être analysés par CGH array. Toutes ces études suggèrent un rôle potentiel pour l'utilisation de la CGH array dans le bilan biologique des patients atteints de SMD.

Les limites abordées dans les études comprenaient l'incapacité à détecter des réarrangements équilibrés, à différencier des clones indépendants ou à détecter de manière fiable un ou plusieurs clones ou des aberrations déséquilibrées en dessous de 20 à 30 % des cellules. Il est important de tenir compte de ces inconvénients, car l'IPSS-R inclut les inv(3)/t(3;3) et les clones indépendants dans les sous-groupes pronostiques (95)(96).

II.3.2.2. Syndromes myélodysplasiques / myéloprolifératifs : exemple de la leucémie myélomonocytaire

II.3.2.2.1. Définition

La leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC) est une maladie clonale des cellules souches hématopoïétiques dont les caractéristiques des syndromes myélodysplasiques et des syndromes myéloprolifératifs se chevauchent, avec un risque de transformation leucémique d'environ 15 à 20 % sur 3 à 5 ans. La présence d'une monocytose chronique (>3 mois) ($\geq 1 \times 10^9/L$ et monocytes $\geq 10\%$ des globules blancs) associée à une dysmyélopôèse signent cette pathologie (77).

II.3.2.2.2. Anomalies cytogénétiques

Des anomalies cytogénétiques clonales sont observées chez environ 20 à 30% des patients atteints de LMMC (97)(98)(99). Les altérations les plus courantes sont la trisomie 8, la perte du chromosome Y, les anomalies du chromosome 7 (monosomie 7 et del7q), la trisomie 21 et les caryotypes complexes.

Trois groupes de risque cytogénétique ont été définis selon l'étude de Such (99) : faible risque (caryotype normal, -Y), haut risque (-7/del(7q)), risque intermédiaire (autres anomalies) ou de Wassie (100): faible risque (caryotype normal, -Y, der(3q)), haut risque (caryotype complexe/monosomique), risque intermédiaire (autres anomalies). L'acquisition d'anomalies non décrites lors du diagnostic ou additionnelles à un clone anormal est observée dans 25 % des cas avec, par ordre de fréquence, un caryotype complexe, +21, -7/del(7q), del(20q), i(17q), -17/del(17p) (101).

Les anomalies retrouvées dans la LMMC sont le plus souvent déséquilibrées d'où l'intérêt d'étudier cette pathologie par CGH array.

II.3.3. Syndrome myéloprolifératif : exemple de la leucémie myéloïde chronique

II.3.3.1. Définition

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est un syndrome myéloprolifératif caractérisé par la prolifération maligne de la lignée granulocytaire sans blocage de maturation. En France, son incidence est estimée à 1,5 cas pour 100.000 habitants. La LMC est toujours associée à une anomalie génétique somatique qui produit un gène de fusion BCR-ABL1. Cela conduit à la formation d'une tyrosine kinase BCR-ABL1 chimérique qui s'auto-associe par l'intermédiaire de sa fraction BCR, entraînant l'activation constitutive de la kinase ABL1 à activité oncogène (102).

II.3.3.2. Cytogénétique

Dans 95% des cas, l'anomalie génétique correspond à une translocation équilibrée entre les chromosomes 9 et 22 (le chromosome dit Philadelphie) juxtaposant la portion 3' du gène ABL1 du chromosome 9 avec la portion 5' du gène BCR sur le chromosome 22.

Dans 5% des cas, ce remaniement existe sous forme de translocation variante t(9;22;v) impliquant plusieurs chromosomes (3 ou plus) ou sous forme d'une insertion (103). Dans ce dernier cas, le remaniement est cryptique, non détectable au caryotype mais la fusion BCR-ABL1 peut être mise en évidence par FISH.

La valeur pronostique des translocations variantes sur la progression est controversée. Dans 10 à 15% des cas, la translocation variante est associée à une délétion au niveau du point de cassure du gène ABL1 ou BCR entraînant un échange de matériel déséquilibré. Ces délétions sont visibles par FISH et par CGH-Array mais elles n'ont pas de valeur pronostique sous inhibiteurs de tyrosine-kinases (ITK), traitement de la LMC ciblant la protéine BCR-ABL1 (104).

La LMC évolue en 3 phases: une phase chronique initiale, une phase accélérée et une crise blastique. Les mécanismes moléculaires responsables de cette évolution ne sont pas totalement compris. En phase chronique, des anomalies cytogénétiques supplémentaires autres que la t(9;22) sont rarement présents (environ 10 à 12% des patients), alors qu'ils sont fréquemment observés en crise blastique (environ 80%) (83). Les anomalies caractéristiques les plus fréquentes sont une trisomie 8, un isochromosome 17, une trisomie 19 et/ou d'une duplication du chromosome Philadelphie (Ph). Ces anomalies cytogénétiques supplémentaires, appelées voies majeures (105), impliquent la présence d'une instabilité génomique et pourraient contribuer à l'évolution de la LMC vers un stade avancé ainsi que la résistance aux ITK. La protéine de fusion BCR-ABL1 génère également une instabilité génétique ayant pour conséquence l'acquisition par la cellule leucémique de mutations et anomalies chromosomiques additionnelles (ACA), responsables de la progression de la maladie (106). La présence d'ACA de la voie majeure au moment du diagnostic est devenue rare (< 5 % des patients) du fait de la découverte de plus en plus tôt de la maladie. Cependant, en raison de leur impact négatif sur la survie sans progression des patients, même les patients sous ITK (107), leur détection est recommandée pour tous les patients au moment du diagnostic (108).

La LMC présente une particularité cytogénétique liée au fait qu'il peut apparaître, sous traitement par ITK, des anomalies cytogénétiques dans les cellules Philadelphie négative (Ph-). Ces anomalies Ph- apparaissent dans 10% des patients en phase chronique, malgré le traitement par ITK. Ce sont essentiellement une perte du chromosome Y, une trisomie du chromosome 8, une délétion 20q, une monosomie 7 ou une délétion 7q. Initialement ces anomalies n'avaient pas d'impact sur la survie ou la progression mais une étude récente en 2017 a montré que la présence d'une anomalie autre que la perte du Y était associée à une diminution de la survie chez les patients traités, quelque soit l'ITK (109). Également les anomalies du chromosome 7 sont associées à la présence de signes de myélodysplasies ou d'évolution en LAM à différencier d'une transformation myéloïde à partir du clone Ph+ (103).

La CGH array pourrait avoir sa place afin de détecter des aberrations chromosomiques cryptiques et de délimiter de façon précise la région concernée. L'identification de ces altérations permettrait de mieux comprendre et d'améliorer les résultats de ces patients. Plusieurs études ont mis en évidence des CNV d'intérêt en utilisant la CGH array (110)(111).

III. Matériel & Méthodes

Afin de voir l'intérêt de la CGH array parmi les outils déjà à disposition dans notre laboratoire de cytogénétique, nous avons sélectionné les dossiers de quelques patients pour une étude de CGH array en rétrospectif (cf tableau 4). Ce travail devait comporter deux parties: une première partie utilisant une puce hautement résolutive à 1M et une deuxième partie utilisant une puce un peu moins résolutive à 400K mais incluant une étude des SNP. En raison de la période de confinement, seule la première partie sera développée dans ce travail.

Tableau 4: Présentation des patients de l'étude

Patients	Pathologies	Objectifs	Nature prélèvement
Patient A	diagnostic de LALB c-MYC positive	Recherche d'anomalies non vues au caryotype	Sang ficollé
Patient B	suivi de LMMC traitée	Aide à l'identification de marqueurs	Moelle ficollée
Patient C	LMC traitée	Recherche des anomalies chromosomiques additionnelles Témoin normal pour interprétation des gènes des immunoglobulines	Sang ficollé
Patient D	LLC avec un remaniement IGH non connu	Recherche d'anomalies non vues au caryotype	Sang ficollé

III.1. Mise en place de la technique de CGH array au laboratoire

La technique développée ici est basée sur le protocole fourni par Agilent (cf figure 17)(112).

L'ADN génomique utilisé doit être compris entre 500 et 1000 ng. Un dosage au nanodrop (quantification spectrophotométrique à microvolume) est effectué avant digestion enzymatique. Le tableau suivant présente les résultats de la quantité d'ADN obtenus au nanodrop. Les quatre patients ont été comparés à l'ADN de référence fourni par Agilent en respectant la correspondance des sexes. Concernant le patient D, une seconde puce a été effectuée en prenant comme ADN de référence le patient C. Les gènes d'immunoglobulines de ce dernier sont non remaniés. De ce fait, le locus IgH a pu être étudié chez notre patient D.

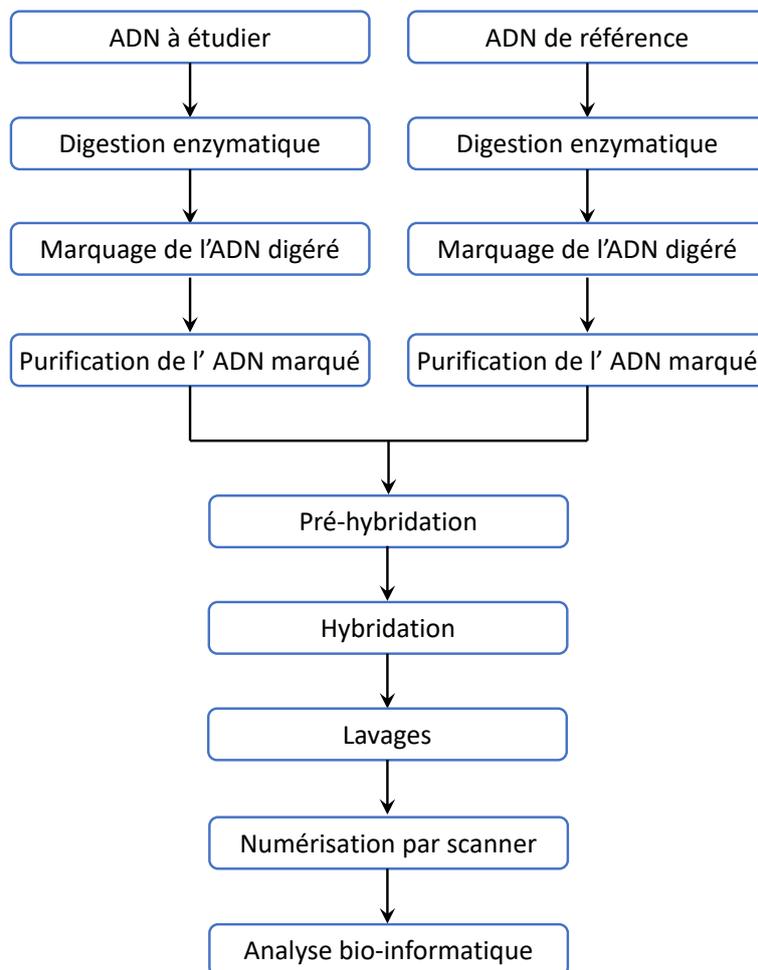


Figure 17: Pipeline de la technique de CGH array

Tableau 5: Quantités ADN avant digestion

Liste ADN à digérer			Quantité utilisée		ADN de réf correspondant			Quantité utilisée	
Nom Id°	Conc ng/μL	Sexe	μL	ng		conc ng/μL	Sexe	μL	ng
Patient A	321	M	3	963	Agilent	190	M	5	950
Patient B	193,79	M	5	968,95	Agilent	190	M	5	950
Patient C	150,46	F	5,5	827,53	Agilent	203	F	4	827,53
Patient D	179,81	F	5	899,05	Agilent	203	F	4,4	893,2
Patient D	179,81	F	5	899,05	Patient C	150,46	F	5,5	827,53

III.1.1. Digestion

La première étape consiste à digérer l'ADN par des endonucléases en fragments de 200 à 500 pb. Cette étape est réalisée pour chaque patient et contrôle correspondant. L'ADN génomique est dilué dans de l'eau « nucléase free » pour une quantité suffisante de 20,2 µl. Toute la manipulation suivante doit se faire sur glace. Le mix de digestion par réaction est listé dans le tableau 6.

Tableau 6: Mix de digestion

Nuclease-Free Water	2	µL
10x Restriction Enzyme Buffer	2,6	µL
BSA	0,2	µL
Alu I	0,5	µL
Rsa I	0,5	µL
Volume final	5,8	µL

L'albumine sérique bovine (BSA) permet de stabiliser les enzymes et augmente leur activité. Deux enzymes de restriction sont utilisées: AluI et RsaI. Une enzyme de restriction est une protéine capable de couper un fragment d'ADN au niveau d'une séquence de nucléotides caractéristique appelée site de restriction. Chaque enzyme de restriction reconnaît ainsi un site spécifique. AluI coupe en AG[^]CT alors que RsaI coupe en GT[^]AC. Après mélange de l'ADN dilué avec le mix de digestion, une incubation est réalisée dans un thermocycleur selon le programme suivant: 37°C pendant 2H puis 64°C pendant 20min. Si le marquage n'est pas fait immédiatement, l'ADN digéré peut être conservé à -20°C jusqu'à un mois.

III.1.2. Marquage

III.1.2.1. Principe

Le marquage de l'ADN est réalisé par la technique de «random-priming» (multi-amorçage au hasard). Cette méthode utilise des «random primers», un mélange de courts oligonucléotides (6 à 9 nucléotides) comportant une combinaison de toutes les séquences possibles. Le marquage fluorescent s'effectue après dénaturation de la séquence d'ADN double brin qui va être utilisée comme matrice (cf figure 18). En premier lieu, l'hybridation des courts oligonucléotides (random primers) s'effectue. Ensuite, l'élongation par polymérisation en 5' des amorces est réalisée par l'ADN polymérase en présence des nucléotides (dCTP, dGTP, dTTP, dATP) non marqués et du dUTP marqué avec un fluorochrome (cyanine 3 ou 5).

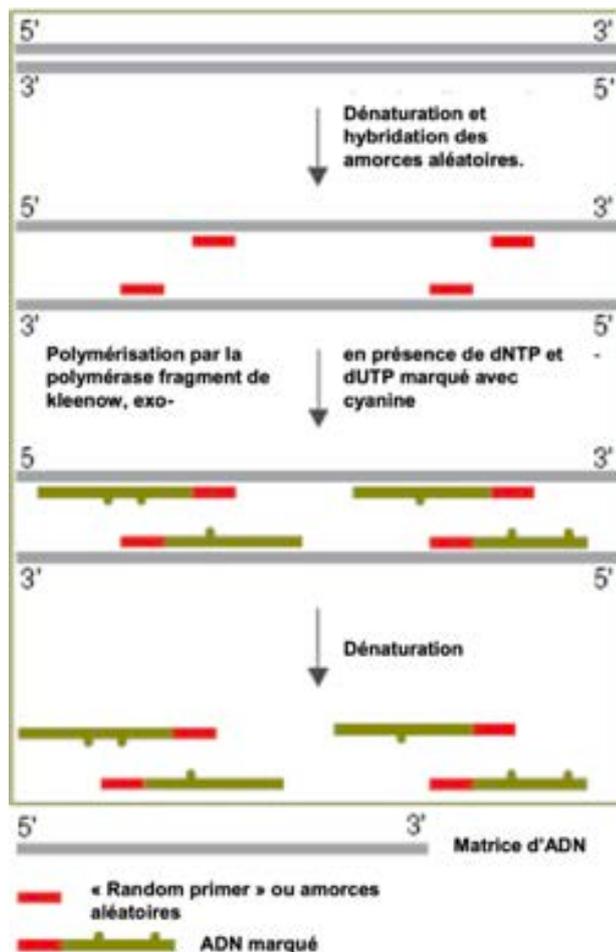


Figure 18: Marquage par « random priming »

III.1.2.2. Dénaturation et hybridation des amorces

Une première étape est l'ajout, à l'ADN digéré, d'amorces dites aléatoires (random primer). (cf le tableau 7)

Tableau 7: Dénaturation et hybridation

Préparation de l'ADN	
Centrifuger le tube digéré pendant 1min à 6000g	
ADN patient ou contrôle (2 µg)	26 µL
Random Primer	5 µL
Volume total	31 µL
Mélanger par pipetage	
98°C pendant 3 min (bain à sec ou thermo) puis glace 5min	
Centrifuger 1min à 6000g	

III.1.2.3. Réaction de marquage

Tableau 8: Mix de marquage

Mix de marquage	Volume			
	1 réaction	CY3	CY5	unité
Faire deux mix : 1 avec la cy3 et 1 avec la cy5	10	10	10	µL
5x reaction buffer	10	10	10	µL
10x dNTP	5	5	5	µL
Cyanine 3-dUTP (référence, rose)	3	3		µL
Cyanine 5-dUTP (Patient, bleu)	3		3	µL
Exo(-) Klenow	1	1	1	µL
Volume final	19	19	19	µL

L'ADN de référence et l'ADN du patient sont marqués par 2 fluorochromes différents: communément par la cyanine3 et cyanine5 respectivement. A partir de cette étape et jusqu'à la fin, toutes les manipulations se font sous une atmosphère « ozone free » grâce à un caisson et à l'abri de la lumière (lumière naturelle et lumière artificielle éteinte). Cela est nécessaire afin d'éviter la dégradation des fluorochromes.

Le fragment de Klenow est un des 2 fragments protéiques formés par l'hydrolyse de l'ADN polymérase I d'Escherichia coli par une protéase. Découvert en 1970, il conserve deux des activités catalytiques de l'ADN polymérase I: la polymérase 5'→3' et l'exonucléase 3'→5', mais a perdu son activité d'exonucléase 5'→3' responsable de la dégradation de l'ADN néosynthétisé. Ainsi il est utilisé ici afin de marquer l'ADN digéré en insérant des nucléotides. Les dUTP sont marqués par un des 2 fluorochromes. Le cyanine3 émet dans le rose alors que le cyanine5 émet dans le bleu.

Le mix de marquage est mélangé avec le mélange ADN/amorces puis une incubation de 2h10 est réalisée (37°C pendant 2H puis 65°C pendant 10min). L'ADN marqué pourra être stocké dans le noir à -20°C jusqu'à un mois en attendant la purification.

Tableau 9: Après marquage

Patient	Conc°	CY5	Vol	Qd tot	Ref°	Conc°	CY3	Qd tot	Mélange
Unité	ng/µL	pmol /µL	µL	ng		ng/µL	pmol /µL	ng	µL à prendre
A	185,7	14,1	27	5013,9	Agilent	322,4	25,40	8704,8	16
B	310,1	17,3	21,4	6636,14	Agilent	244,6	14,10	5234,44	27
C	90,6	4,6	80,5	7293,3	Agilent	84,1	7,20	6770,05	87
D	197,9	12,1	28	5541,2	Agilent	260,5	18,60	7294	21
D	102,7	5,4	40	4108	C	116,5	6,80	4660	35

Le tableau 9 répertorie les concentrations obtenues après marquage. Le rendement théorique idéal après marquage doit être entre 8 et 14 µg, avec une activité spécifique entre 20 et 60. Le tableau de rendement montre que celui-ci n'a pas été optimal même si l'activité spécifique est acceptable. Ceci peut être dû à la mise en place (changement de pièce entre les étapes, utilisation de nouveaux matériels). Deux autres laboratoires sur le même site utilise ce kit de marquage et ont obtenu des résultats similaires. Après changement du kit, ils ont obtenu un meilleur rendement. A l'avenir, nous pourrions améliorer notre technique en changeant notre kit de marquage.

Tableau 10: Rendement et degré de marquage

Patient	% marquage	Activité spé	Rendement μg	Ref°	Rendement μg	Activité spé	% marquage
A	2,6	75,9	5,0139	Agilent	8,70	79	2,7
B	1,9	55,8	6,63614	Agilent	5,23	58	2,0
C	1,7	50,8	7,2933	Agilent	6,77	86	2,9
D	2,1	61,1	5,5412	Agilent	7,29	71	2,4
D	1,8	52,6	4,108	C	4,66	58	2,0

III.1.3. Purification

On utilise un kit agilent afin de purifier l'ADN marqué. Le protocole est détaillé dans le tableau 11.

Tableau 11: Purification

Purification de l'ADN marqué		
Dans un microtube Eppendorf 1,8 mL		
Centrifuger le tube 6 1 min à 6000g	50	μL
1x TE (pH8.0)	430	μL
Placer une colonne de purification dans un tube de 2 mL		
Déposer le mélange dans la colonne		
Centrifuger la colonne 10 min à 14 000g, jeter l'éluat		
1x TE (pH8.0)	480	μL
Centrifuger la colonne 10 min à 14 000g		
Jeter l'éluat, prendre un tube de 2 mL propre		
Déposer la colonne la tête en bas pour récupérer les ADN		
Centrifuger la colonne 1 min à 1 000g		
Le volume récupéré est d'environ 27 μL par échantillon		

On dose la concentration d'ADN au nanodrop pour calculer les volumes à prendre pour le mélange afin d'obtenir une quantité à peu près égale d'ADN entre le patient et la référence. Le volume final après mélange des 2 ADN doit être de 158 μL . On ajuste avec du TE si besoin. Voici les résultats obtenus.

Tableau 12: Résultats après purification

ADN	conc°	CY5	Volume	Quantité totale	ADN référence	conc°	CY3	Quantité totale	Volume ADN référence à prendre
Identité patient	ng/ μL	pmol / μL	μL	ng		ng/ μL	pmol / μL	ng	μL
Patient A	185,7	14,1	27	5013,9	Agilent M	322,4	25,40	8704,8	16
Patient B	310,1	17,3	21,4	6636,14	Agilent M	260,5	18,60	5574,7	25
Patient C	90,6	4,6	80,5	7293,3	Agilent F	84,1	7,2	6770,05	77,5
Patient D	197,9	12,1	28	5541,2	Agilent F	244,6	14,10	6848,8	23
Patient D	102,7	5,4	40	4108	Patient C	116,5	6,8	4077,5	35

III.1.4. Hybridation

Une première étape de pré-hybridation est nécessaire. Elle consiste au mélange de notre mix d'ADN au mix d'hybridation. Le protocole est indiqué dans le tableau 13.

Tableau 13: Protocole de pré-hybridation

Préhybridation	
Cot-1 DNA (1.0 mg/mL)	50µL
10x aCGH Blocking Agent	52µL
2x HI-RPM Hybridation Buffer	260µL
Volume final	362µL
Préhybridation	
Tube de mélange de l'ADN marqué (tube 1)	
ADN patient + ref marqué	158µL
Hybridation master mix (tube 1)	362µL
Volume final	520µL
Mélanger par pipetage, centrifuger	
Incubation programme thermocycleur : 3 minutes à 98°C puis 30 minutes à 37°C	
Centrifuger 1 min à 6000g	
Passer à l'hybridation ou laisser les tubes à 37°C	

L'ajout d'ADN Cot-I (issu de placenta humain) et d'agent bloquant (aCGH Blocking Agent) permettent de bloquer, après dénaturation, les séquences répétées des ADN à tester, source d'hybridation aspécifique et générant du bruit de fond. Après cette étape de pré-hybridation, l'hybridation peut avoir lieu (cf tableau 14).

La chambre d'hybridation est composée de 3 éléments: une base, un couvercle et un pont d'assemblage (cf figure 19). Le mix n'est pas directement déposé sur la puce à ADN (ou lame array) où sont contenues les sondes mais sur une lame de joint appelée « gasket slide » (cf figure 20). La gasket slide est placée sur la base. La totalité du mix final est déposée sans toucher la gasket slide. La lame array est déposée sur la lame de joint en la tenant par les extrémités de telle sorte que la face « Agilent » ou active de la lame soit en contact avec la lame de joint (cf figure 21).



Figure 20: Chambre d'hybridation



Figure 19: Lame de joint

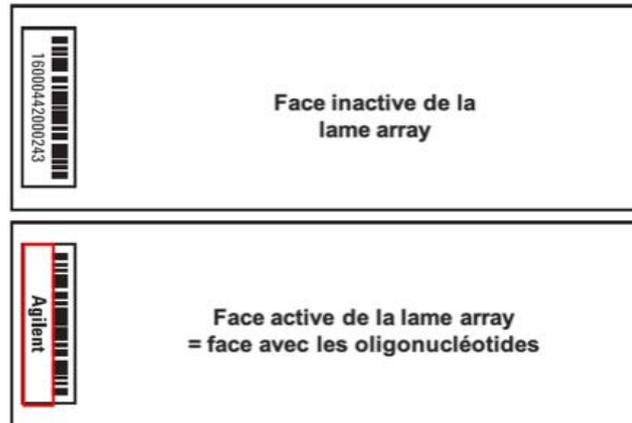


Figure 21: Puce à ADN

Tableau 14: Protocole d'hybridation

Hybridation
Précautions
Nettoyer la paillasse de toute poussière
Manipuler uniquement avec des gants sans poudre
Manipuler les lames uniquement en les tenant sur les cotés
Chargement du mix
Ouvrir délicatement l'emballage de la gasket slide, sans toucher la lame
La disposer dans la chambre d'hybridation, code barre ou Agilent vers le haut
Déposer le mix sur la gasket slide, sans toucher la lame, en se déplaçant le long de la zone
Montage de la lame
Déposer la lame adéquate de CGH sur la gasket slide bien à plat, coté agilent vers le bas
Mettre le tout dans la chambre d'hybridation. Fermer. Tourner le montage pour vérifier qu'aucune bulle est coincée dans les logements
Placer la chambre dans le four et équilibrer les charges (une chambre dans chaque barre de racks)
Hybridation : 40 - 48H
Hybridation à 65°C à 20 rpm pendant 40-48h



Figure 22: Fermeture chambre d'hybridation

Le montage est tourné afin d'éliminer d'éventuelles bulles coincées pour ensuite être placé dans le four à hybridation pendant 40h à 48h à 65°C.



Figure 23: Vérification de l'absence des bulles

III.1.5. Lavage

Préparation des tampons de lavage

Nous utilisons trois bacs de lavage et deux tampons de lavage (1 et 2).

Le bac de lavage n°1 est rempli de tampon de lavage 1 maintenu à température ambiante.

Un barreau magnétique ainsi qu'un porte-lame est placé à l'intérieur du bac de lavage n°2. Un remplissage par le tampon de lavage 1 est effectué et ce bac est maintenu à température ambiante.

Le bac de lavage n°3 a été préparé la veille :

- Un barreau magnétique y a été placé
- Il a été rempli de tampon de lavage 2 et placé dans l'incubateur à 40°C

Le tampon de lavage 2 est maintenu à 40°C jusqu'au lavage.

Désassemblage des lames

Une fois le démontage de la chambre d'hybridation effectué, l'ensemble «lame array et lame de joint» de la chambre d'hybridation est rapidement transféré dans le bac de lavage n°1 contenant le tampon de lavage 1 sans lâcher l'ensemble.

La lame est maintenue inclinée, horizontale et immergée dans le bac de lavage n°1 de telle sorte que la lame array et son code barre numérique soient orientés vers le haut (vers soi) et la lame de joint orientée vers le bas.

Lorsque l'ensemble est bien immergé, l'ouverture est forcée à l'extrémité du code barre en faisant glisser une pince entre les lames puis basculer doucement la pince avec un léger mouvement de rotation pour séparer les lames. La lame de joint est laissée tombé dans le bac de lavage.

La lame array est agitée quelques instants dans le bac de lavage n°1 pour éliminer l'excès de tampon d'hybridation. Elle est ensuite retirée puis transférée au niveau du porte-lame dans le bac de lavage n°2 contenant le tampon de lavage 1.

Lavages post-hybridation

Le bac de lavage n°2 est mis sous agitation sur la plaque magnétique pendant 5 minutes. Le bac de lavage n°3 est sorti au dernier moment du four et est placé sur la plaque chauffante magnétique. Au bout des 5 minutes, le porte-lame est transféré dans le bac de lavage n°3 pour une durée d'une minute. Le porte-lame est ensuite lentement retiré afin de limiter la formation de gouttelettes sur la lame array. La lame est retirée délicatement et ses bords sont légèrement égouttés sur du papier absorbant non pelucheux pour éliminer l'excédent de tampon. Elle est ensuite déposée dans le support de lame pour le scanner, face active « Agilent » orientée vers le haut.

III.1.6. Scan des lames array

Mise en place des lames dans le porte-lame (cf figure 24)

Le support de lame est à l'horizontal sur la paillasse, le couvercle transparent anti-ozone orienté vers le haut et la charnière à gauche. La lame est placée délicatement dans le support de lame sans toucher les deux faces de la lame. Le côté avec les codes-barres est placé vers la charnière, à gauche. La face avec le code barre et « Agilent » est orientée vers le couvercle transparent anti-ozone. Un léger clic permet de savoir que la lame est bien positionnée après fermeture du couvercle.

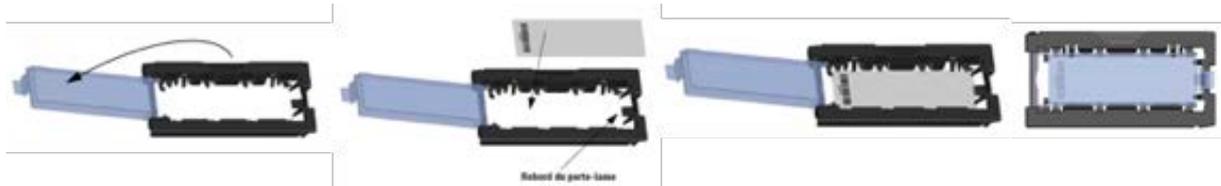


Figure 24: Porte-lame

Mise en route du scanner

Le scanner utilisé est SureScan DX MicroArray (Agilent®), cf figure 25.

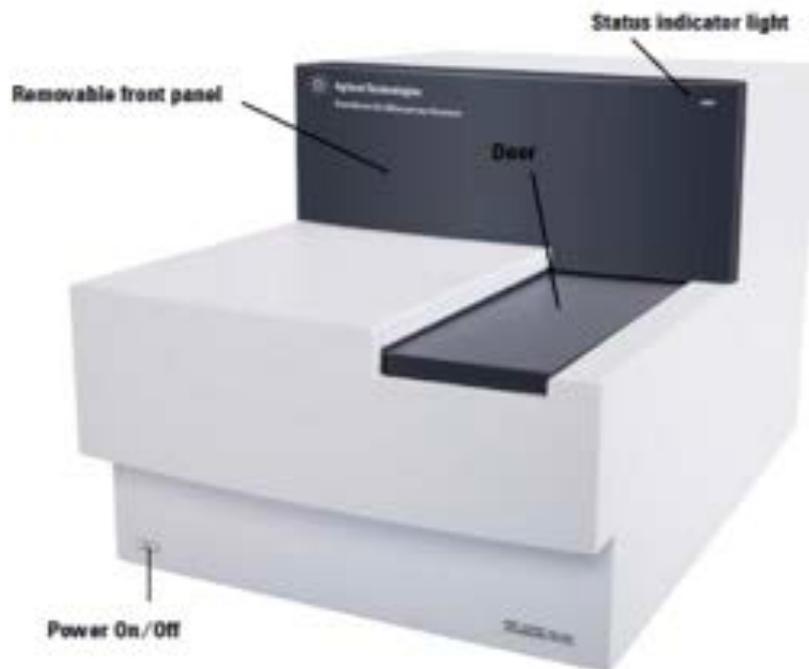


Figure 25: Illustration du scanner

Lors de la mise en route du scanner, une initialisation est déclenchée. Quand la LED du scanner est éteinte, le logiciel «Agilent Microarray Scan Control» peut être ouvert. Le scan filtre l'air avec des filtres «ozone free». Le capot s'ouvre en cliquant sur «open door» dans le logiciel Scan Control. Le support de lame contenant la lame array est placé dans la cassette du scanner, à n'importe quel endroit. L'encoche du support est orientée vers le haut. Le scanner se ferme en cliquant sur «close door» dans le logiciel Scan Control. Le code barre est lu automatiquement. Le scanner analyse les données de la lame array qui apparaissent au niveau du logiciel. Le statut du scanner dans la fenêtre principale doit être en «Scanner Ready». Le scan de la lame est démarré en cliquant sur «Start Scan». Les LED du scan et du logiciel deviennent vertes et s'affiche «scan running». Le scan d'une lame dure environ 15 minutes. Le résultat obtenu est une image en format TIF.

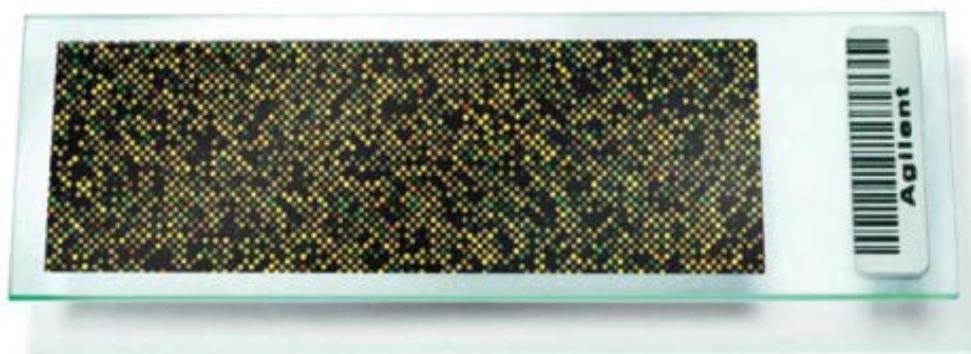


Figure 26: Exemple d'une image en format TIF après scanner

III.1.7. Analyse des données et interprétation

Nous avons utilisés un pipeline d'analyses fourni par Agilent regroupées au sein du logiciel agilent cytogenomics (version 3.0.5.1). Nous interprétons les résultats rendus par le scanner à l'aide du logiciel « agilent cytogenomics ». Un traitement statistique des données est réalisé et les résultats sont donnés sous forme de représentation graphique.

Extraction des données numériques et normalisation

Les images sont analysées à l'aide du logiciel « Feature Extraction » afin d'extraire les données numériques correspondant à chaque spot (113). Le logiciel utilise une grille prédéfinie en fonction du format de la puce pour assigner des coordonnées uniques à chaque spot (adressage de spots ou « gridding »). Il délimite ensuite la surface de chaque spot par rapport au bruit de fond. Il identifie les valeurs aberrantes générées par les erreurs inhérentes à la technique (Flag Outliers) et estime le bruit de fond de la lame hybridée. Il corrige les biais de fluorescence en réalisant des ajustements par régressions locales pour la correction des biais de cyanines, puis pour la correction des biais liés aux contenus en bases GC. Il s'agit d'une hybridation compétitive, l'interprétation des signaux se fait toujours relativement à l'ADN normal utilisé comme contrôle.

Les données numériques générées correspondent à des calculs de ratio relatifs en logarithme (LRR) entre le signal d'une sonde dans l'échantillon testé ($=S_{\text{test}}$) et le signal de cette même sonde dans l'ADN de contrôle ($=S_{\text{contrôle}}$) (soit $\text{LRR} = \text{Log}_2[S_{\text{test}}/S_{\text{contrôle}}]$) (114).

Le logarithme permet de transformer le ratio en fonction linéaire symétrique centrée sur 0. Lorsque le log ratio est à zéro, il y a une quantité égale de signal entre les deux échantillons ce qui correspond à une absence d'anomalie. Lorsque le log ratio est positif, il correspond à une amplification, lorsqu'il est négatif à une délétion (cf figure 27).

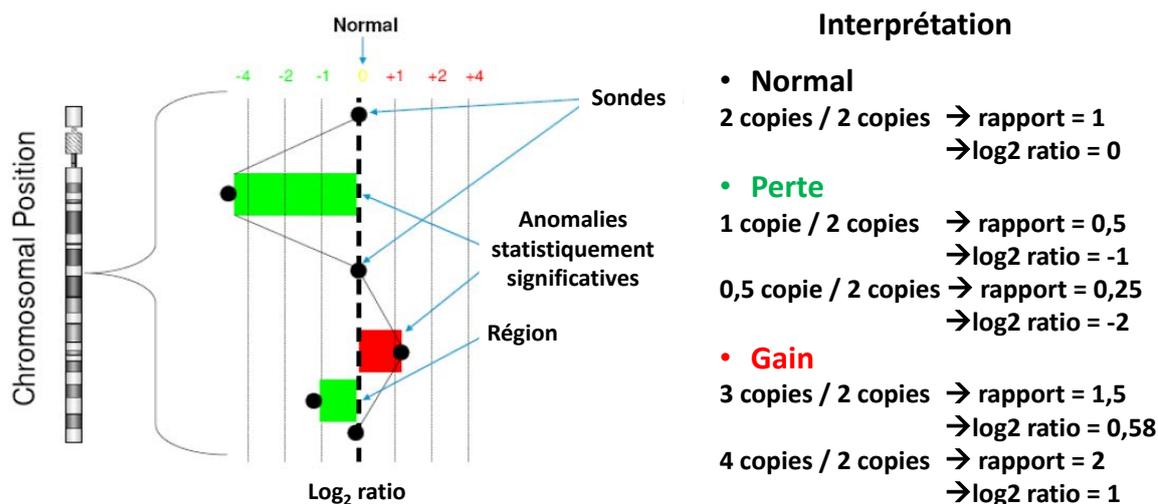


Figure 27: Interprétation en CGH array

Le logiciel effectue une normalisation des signaux afin de corriger les erreurs induites par le marquage des fluorochromes, l'émission ou la détection.

La normalisation consiste à ajuster l'intensité globale de l'image acquise sur chacun des signaux de manière à corriger les biais techniques systématiques qui tendent à déséquilibrer le signal d'un canal par rapport à l'autre. Ces biais peuvent être dus en particulier aux différences de caractéristiques des deux fluorochromes Cy3 et Cy5: différence d'incorporation des marqueurs lors de l'étape de marquage, de lecture au scanner suivant le réglage de la puissance des lasers, ou de performance intrinsèque des fluorochromes (le Cy5 émet un signal plus fort que le Cy3 du fait de coefficients d'extinction molaire différents).

Critères de qualité

Le logiciel fournit des données qualitées afin d'évaluer la performance de l'hybridation (113):

- La qualité d'alignement sur la grille
- La qualité de la distribution des signaux sur la lame
- Le niveau de bruit de fond
- Le niveau d'intensité du signal
- Le derivative LR_Spread (DLRS): c'est un critère qualité important en CGH-array. Il permet de mesurer de façon robuste la qualité des signaux en calculant l'écart-type des rapports d'intensité entre des sondes proches et ce tout le long des chromosomes. Le DLRS correspond à une valeur représentative de la qualité globale des données. Plus l'écart-type est élevé plus la sensibilité de détection est faible. (<0,2 qualité excellent, 0.2 à 0.3 bonne qualité, > 0.3 qualité intermédiaire).

Interprétation des données

Les données calculées sont ensuite exploitées par le logiciel Cytogenomics qui permet de visualiser les signaux en terme de profil génomique.

Pour permettre l'identification des anomalies génomiques, les log ratio sont ordonnés selon leur position génomique puis analysés à l'aide d'un algorithme de segmentation. Le principe de cet algorithme est de segmenter les chromosomes en régions de log ratio comparables. Cet algorithme identifie des points de cassure témoignant de changements de niveau dans les signaux. Ces points de cassure délimitent des segments à l'intérieur desquels le signal peut être résumé par la moyenne des log ratio des sondes qu'ils contiennent (114). L'algorithme que nous avons utilisé est l'ADM-2 (Aberration Detection Method algorithm) (115). Cet algorithme recherche des intervalles dans lesquels un score statistique dépasse un seuil spécifié par l'utilisateur. Le seuil utilisé ici est celui de 6 car recommandé par le fournisseur. Ce score statistique est un calcul basé sur les log ratio mais aussi sur des informations de qualité des sondes qui pondèrent les log ratio. Le score représente l'écart de la moyenne pondérée des rapports logarithmiques par rapport à sa valeur attendue de zéro. L'algorithme ne repose pas sur une taille de fenêtre définie, il échantillonne des sondes adjacentes pour arriver à une estimation robuste de la plage réelle du segment aberrant.

Pour réduire la détection des variants constitutionnelles bénins présentes dans la population, seuls les CNV de plus de 5 Mb doivent être interprétés comme anormaux. Cela permet d'éviter de signaler des anomalies dont la signification clinique n'est pas établie. Les CNV d'une taille inférieure à 5 Mb doivent être considérés comme aberrants que lorsqu'ils concernent des gènes connus comme associés à la pathologie. Les CNV présents dans les gènes des récepteurs des cellules T ou des immunoglobulines doivent être exclus car ces lésions représentent des réarrangements survenant au cours du développement normal des cellules T et B (116). Ceci fera l'objet d'une mise au point dans ce travail pour rendre le locus IGH interprétable.

Ecriture

L'écriture du résultat de la CGH array débute par arr suivi de [hg19] pour signifier que l'on a utilisé une puce avec le génome humain comme référence. Le numéro du chromosome impliqué est ensuite noté suivi des bandes correspondantes avec entre parenthèses les nucléotides précisant le début et la fin de l'anomalie. Le nombre de copies de la région est noté à la suite.

III.2. Présentation clinico-biologique des patients

III.2.1. Patient A

Le patient A est un homme âgé de 73 ans, fumeur, hospitalisé en septembre 2019 pour une altération de l'état général et une perte de 4 kg en quelques mois. Un antécédent de cancer de la prostate il y a plus de 30 ans est signalé. Un syndrome tumoral n'est pas retrouvé à l'auscultation. Le bilan biologique révèle un syndrome de lyse majeur avec 11646 U/L de LDH (normes du laboratoire 135-225U/L) et 756 umol/L d'acide urique (normes du laboratoire 202-417U/L). La numération-formule sanguine montre une myélémie à plus de 10% avec 20% de blastes, une anémie modérée (concentration d'hémoglobine à 10,6 g/dL) et une thrombopénie modérée (100 G/L). La morphologie des blastes oriente dans un premier temps vers un lymphome de Burkitt (forte basophilie et présence de vacuoles cytoplasmiques). (cf images suivante issues du DM : système numérique de morphologie cellulaire)

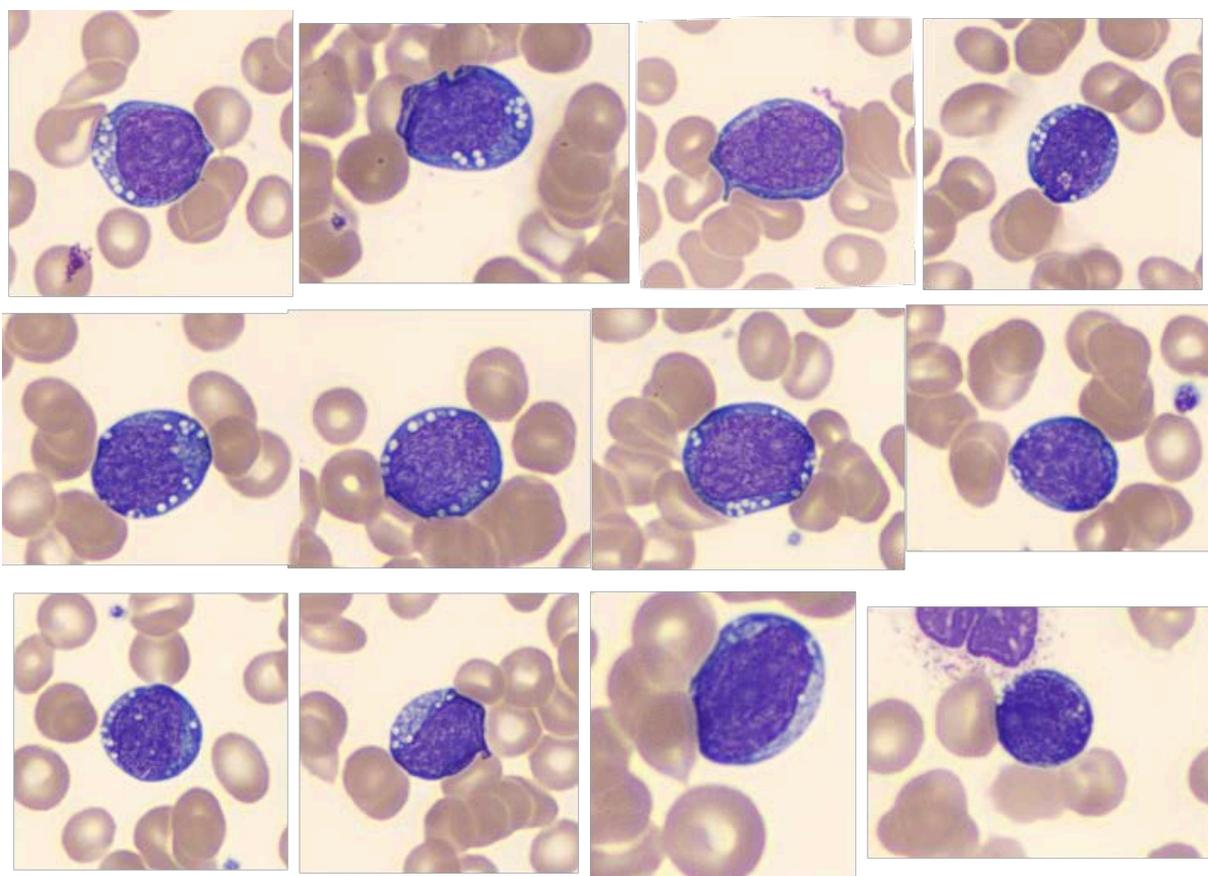


Figure 28: Cellules sanguines vues au DM (Patient A)

Le myélogramme retrouvait 82% de blastes avec la même morphologie que ceux du sang. La cytométrie en flux met en évidence une population anormale exprimant faiblement le CD45, le CD19, le cyCD79a, le CD24, le CD22, le CD10, la Terminal déoxyTransférase (Tdt) et n'exprimant pas de chaîne légère de surface, de CD34, de marqueur de la lignée T et de marqueur de la lignée myéloïde.

La cytogénétique montre un caryotype complexe devant une translocation $t(8;14)(q24;q32)$ impliquant le gène *c-MYC* confirmé par FISH (voir figure correspondante), une translocation $t(14;18)(q32;q21)$ impliquant le gène *BCL2*, un chromosome X surnuméraire, une trisomie 12, une délétion du bras long d'un chromosome 4 et une délétion interstitielle du bras long d'un chromosome 6. (cf figure 29)

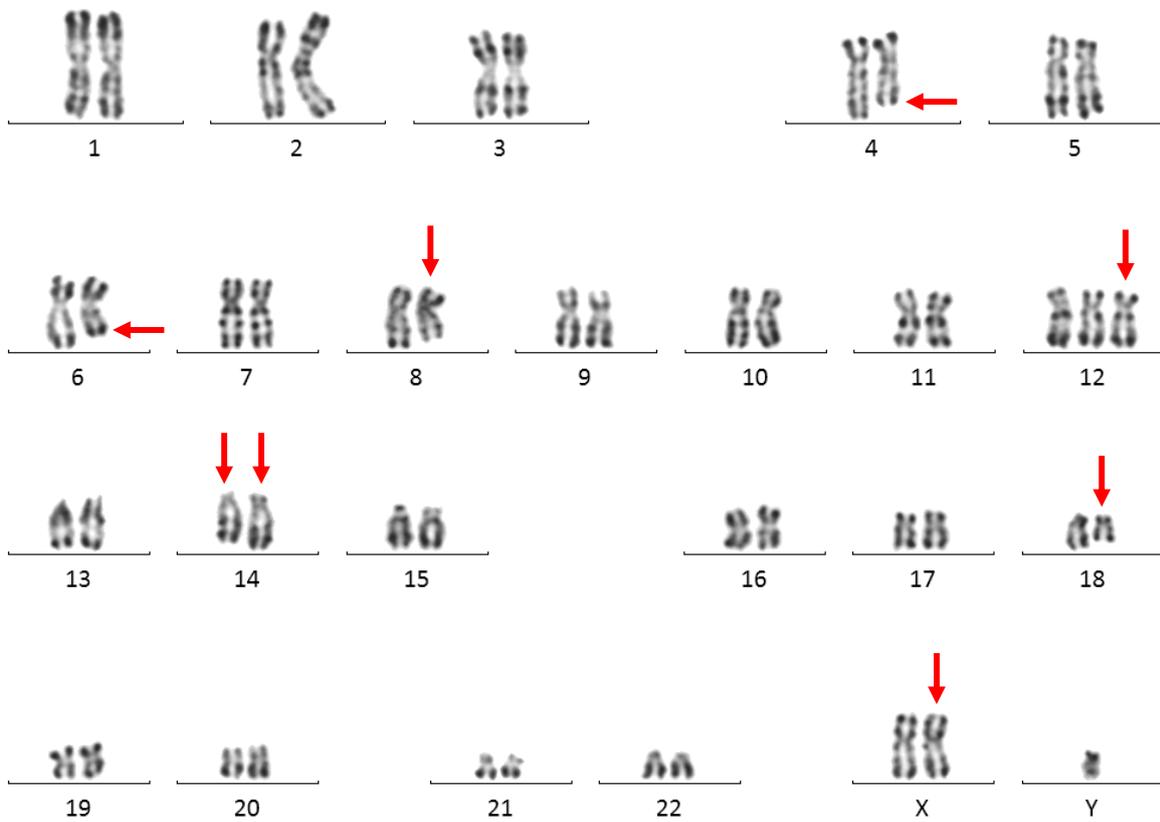


Figure 29: Caryotype
 $48,XY,+X,del(4)(q31),del(6)(q21q24),t(8;14)(q24;q32),+12,t(14;18)(q32;q21)$

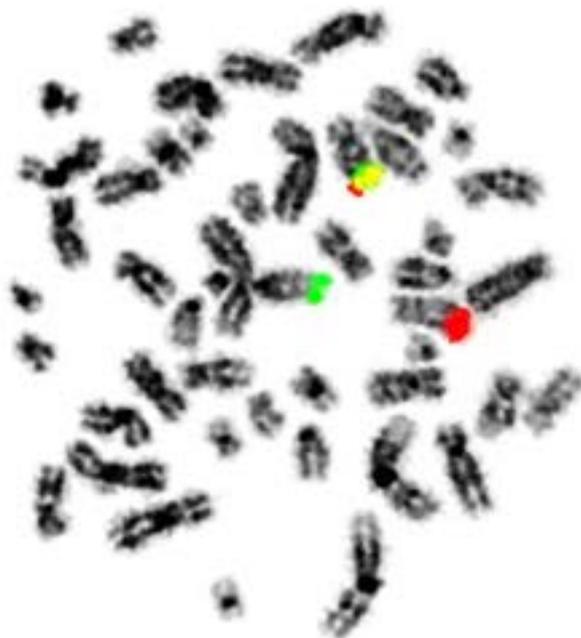


Figure 30: FISH c-MYC break apart

A l'issu de ces examens, le classement OMS est discuté entre cliniciens, cytologistes, cytométristes, cytogénéticiens et biologistes moléculaires. Bien que le caryotype puisse évoquer en première intention un lymphome de haut grade de type « double hit » c- Myc / Bcl 2, on considère que les arguments immunologiques sont suffisants pour prouver le caractère immature de la prolifération. En effet, la faible expression du CD45, l'absence de chaîne légère de surface et surtout l'expression forte de la Tdt sont des arguments forts en faveur de la nature blastique des cellules tumorales. Au final, le diagnostic retenu est celui de leucémie aiguë lymphoblastique B (Leucémie / lymphome lymphoblastique B dans la classification OMS), de type LAL-B II CD10+ dans la classification de l'EGIL, avec une cytogénétique anormale de type « double hit » comportant un remaniement de c-MYC et de BCL2. Une induction de type lymphome de Burkitt est initiée et permet l'obtention de la rémission complète au prix de complications infectieuses lourdes. Le patient fait alors part de son souhait de ne pas poursuivre le traitement de consolidation malgré le haut risque de rechute qui lui est clairement expliqué. Celle-ci survient en janvier, rapidement suivie du décès avec une maladie en progression en février 2020.

Cette catégorie de LAL-B avec remaniement c-MYC est peu connue. L'étude cytogénétique a été poursuivie en CGH-array afin de documenter le dossier de façon plus exhaustive.

III.2.2. Patient B

Homme de 68 ans pour lequel a été diagnostiqué une LMMC débutante en 2008 devant une monocytose et quelques signes de dysgranulopoïèse au myélogramme. Au moment du diagnostic, la cytogénétique est normale. La conduite à tenir a été une simple surveillance. En 2013, un syndrome anémique apparaît en lien avec une carence martiale. En décembre 2015, un nouveau myélogramme est effectué devant une augmentation du taux d'Hb et des plaquettes. L'absence d'excès de blastes ne conclue pas à une évolution de la LMMC. En septembre 2019, une aggravation de la leucocytose à 28,6 G/L et une apparition de cytopénies nous orientent vers une LMMC-2 (14,5% de blastes et 13% de monocytes au myélogramme). Le caryotype montre plusieurs isochromosomes initialement classés en marqueurs mais après FISH correspondant à des isochromosomes 21 (iso(21)). Il existe plusieurs clones qui diffèrent uniquement par le nombre d'iso(21). Parmi les 20 métaphases analysées, le nombre d'iso (21) varie de 1 à 4. Ici, un exemple d'un clone possédant 4 isochromosomes est illustré sur la figure 31.

L'anomalie du chromosome 21 doit faire penser à rechercher un remaniement impliquant RUNX1. Dans le contexte d'une LMMC, il est décrit un remaniement rare impliquant RUNX1 et USP16. En effet, des auteurs ont montré l'existence d'un gène de fusion concernant le gène RUNX1 et le gène USP16 chez des patients atteints de LMMC (117). La FISH et la CGH array peuvent donner des indications sur la construction de l'isochromosome 21 orientant vers la recherche d'un transcrit de fusion ou non.

Une mutation du gène TP53 est retrouvée rendant le pronostic péjoratif. La FISH interphasique montre la délétion du 5q31 dans 4,5% des noyaux (sonde metasystems: 5q31 orange, 5p15 vert).

Un traitement par agent déméthylant (VIDAZA) est proposé, initialement associé à de l'hydroxyurée (HYDREA) pour contenir la prolifération. A la 8^{ème} cure (mai 2020), la réponse reste médiocre avec une persistance d'un excès de blastes au myélogramme.

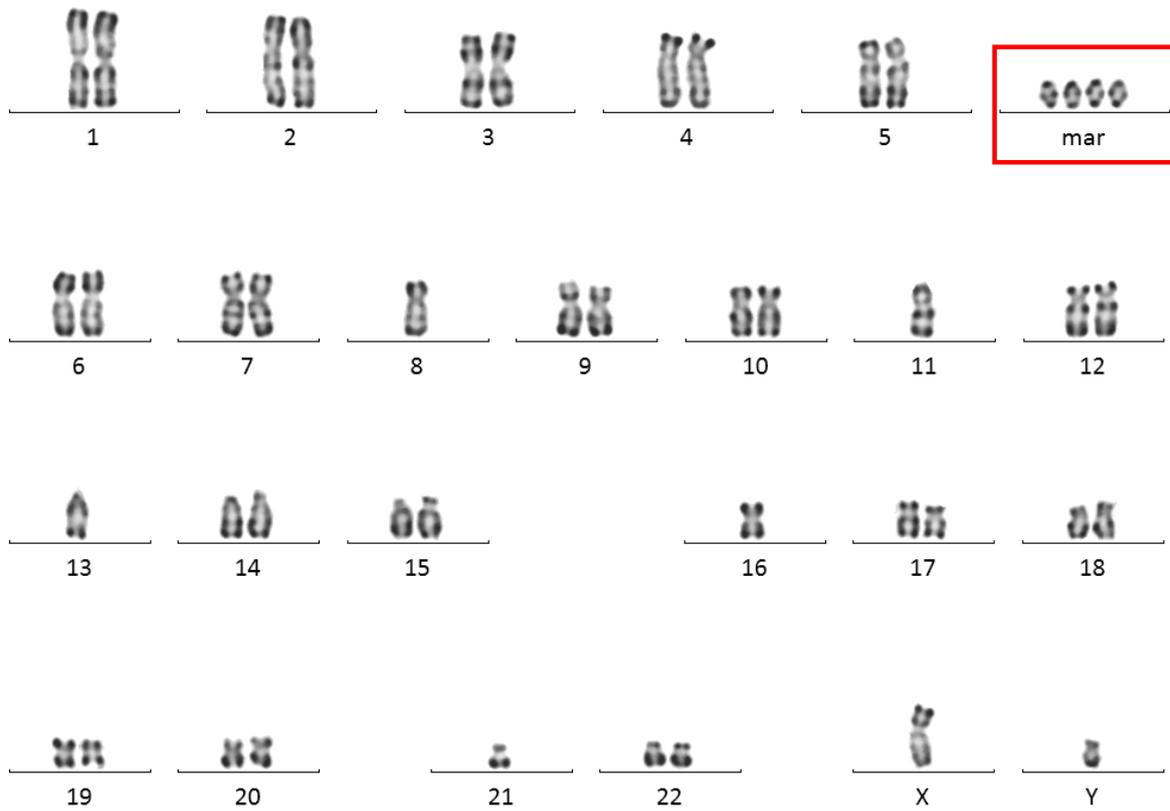


Figure 31: Métaphase représentative du caryotype (Patient B)

III.2.3. Patient C

Le patient C est une dame âgée de 54 ans suivie pour une LMC, sous traitement par Imatinib (GLIVEC) depuis juin 2019. Son caryotype présentait de façon isolé une translocation t(9;22)(q34;q11) impliquant les gènes ABL1 et BCR, compatible avec le diagnostic de LMC (cf figure 32). Une néoplasie mammaire bénigne est notée dans ses antécédents. La patiente présente aussi un syndrome de Liffraumeni (LFS). Le LFS est un syndrome rare de prédisposition au cancer. Le LFS est causé par des mutations du gène suppresseur de tumeur *TP53* chez environ 80% des familles avec un LFS classique. (118) Cette anomalie génétique constitutionnelle est un facteur prédisposant pour les hémopathies et constitue un risque d'événements génétiques secondaires. Dans ce cas, l'analyse en CGH array peut être utile pour rechercher des anomalies non visibles au caryotype.

Dans le cadre de son suivi, après 6 mois de traitement, son caryotype ne détecte pas d'anomalies, sa réponse moléculaire est majeure (transcrit BCR-ABL1 \leq 10%).

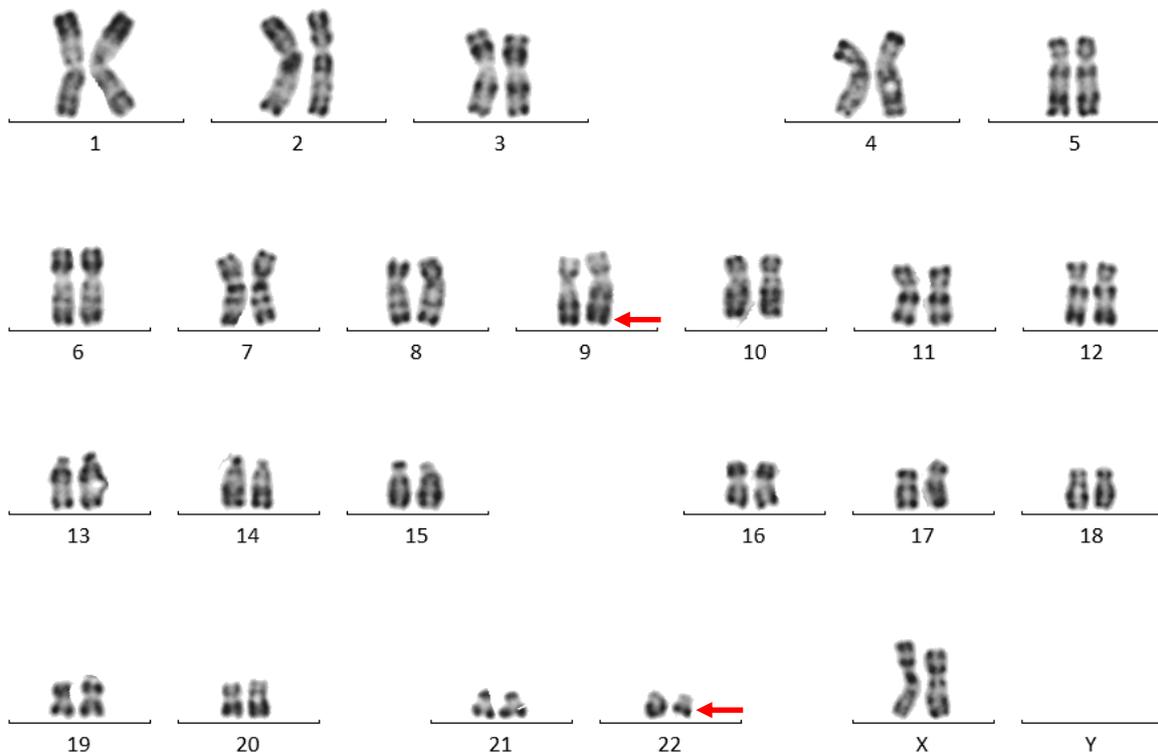


Figure 32: Métaphase du caryotype au diagnostic (46,XX,t(9;22)(q34;q11)[20])

III.2.4. Patient D

Le patient D est une femme chez laquelle a été diagnostiquée une LLC en 2009 à l'âge de 50 ans. En janvier 2013, un traitement par Rituximab-Bendamustine est mis en place devant un stade de Binet B (6 cures) ce qui a conduit à une rémission complète. En fin 2016, le taux de lymphocytes passe de 0,42G/L à 74G/L en moins de 6 mois. Un traitement par Ibrutinib est alors initié. En mai 2017, des immunoglobulines polyvalentes sont nécessaires devant une hypogammaglobulinémie à 1,7g/L (valeurs normales locales de 6 à 11 g/L). Le score de Matutes est à 4, le profil IgH est non muté, la cytologie est classique avec l'apparition de pro-lymphocytes au cours de l'évolution.

La cytogénétique révèle un caryotype complexe avec une translocation t(8,14), une délétion au niveau du chromosome 10 et 11 et une translocation t(15,22) (cf figure 33). En mai 2018, un sous clone apparait avec une délétion du chromosome 14 (cf figure 34). L'ibrutinib est poursuivi.

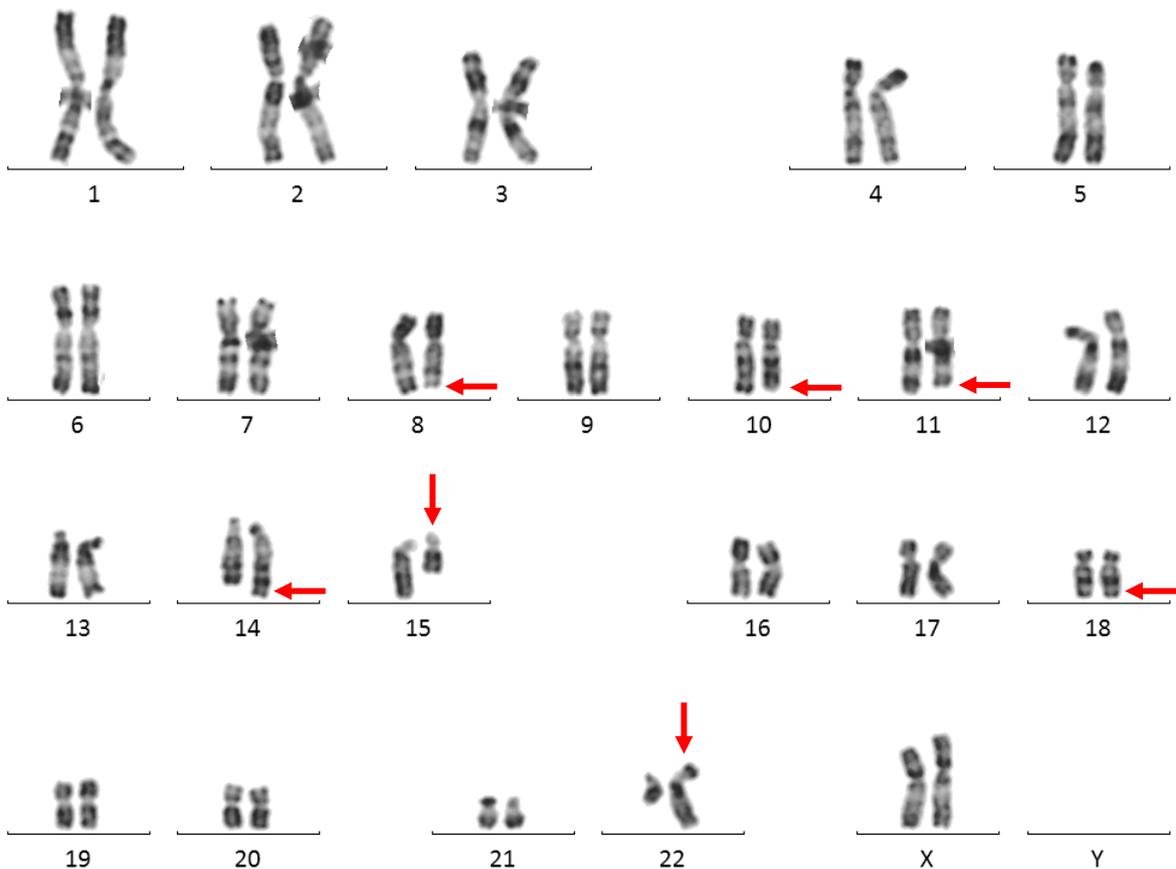


Figure 33: Métaphase illustrant le clone majoritaire du caryotype de la patiente en 2018 : 46,XX,t(8;14)(q24;q32),del(10)q25,del(11)(q21q24),t(15;22)(q13;q12)[16]/46,sl,der(8)t(8;14)(q24;q32),der(14)t(8;14)(q24;q32)del(14)(q11q32)[4]

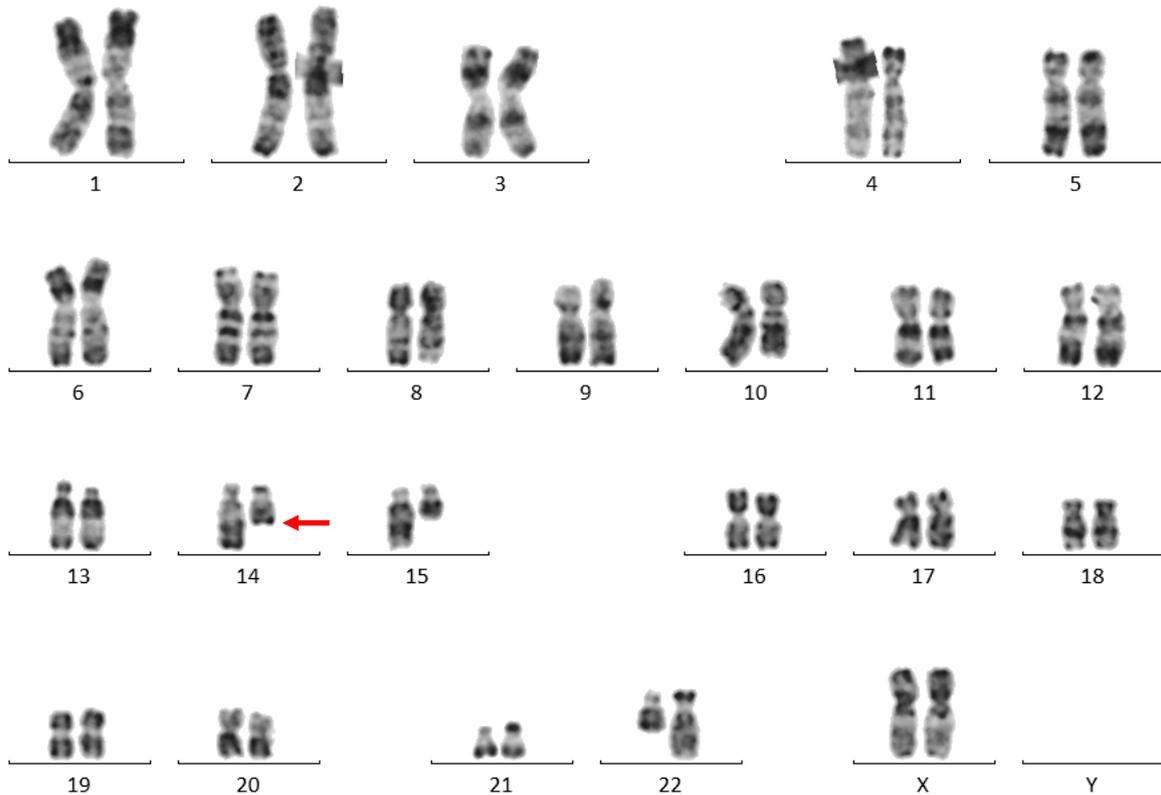


Figure 34: Métaphase illustrant le sous-clone du caryotype de la patiente en 2018: $46,XX,t(8;14)(q24;q32),del(10)q25,del(11)(q21q24),t(15;22)(q13;q12)[16]/46,sl,der(8)t(8;14)(q24;q32),der(14)t(8;14)(q24;q32)del(14)(q11q32)[4]$

Ce dossier est inclus dans un programme de recherche étudiant les nouveaux partenaires d'IGH dans des translocations. Ici le remaniement $t(8;14)$ fait intervenir un partenaire non décrit dans la littérature. L'étude en CGH array s'inscrit dans ce projet de recherche pour compléter les études déjà réalisées.

IV. Résultats et discussion

IV.1. Mise en place de la technique

Grâce au laboratoire d’Histologie, Cytologie, Cytogénétique et Biologie cellulaire, nous avons pu utiliser les appareils spécifiques à cette technique (hottes, four à hybrider) mais aussi les réactifs dédiés à la CGH array pour la méthode de marquage enzymatique décrite ci-dessus. Les règles d’utilisation de ce laboratoire, les températures d’hybridation préconisées ont été réutilisées pour notre activité sans réellement de mise au point car l’activité d’ACPA de ce service est routinière mais aussi accréditée.

Nos résultats sont tous interprétables et les critères qualité acceptables pour chaque puce réalisée (cf tableau 15).

La partie bioinformatique est complètement finalisée puisque le logiciel d’interprétation est disponible sur notre réseau. L’algorithme d’analyse dédié à l’activité d’onco-hématologie nous a été conseillé par le support Agilent. Une analyse en parallèle sur le logiciel Agilent Genomic Workbench V7.0 n’a pas montré de différences dans les résultats et l’algorithme d’analyse utilisant le z-score s’est montré moins performant. Il nous reste à finaliser un compte-rendu dans notre système de gestion de laboratoire.

Tableau 15: Tableau résumant les critères qualité des puces de CGH Array : en vert les indices d’excellent qualité , en orange les indices de bonne qualité

Indices qualité des puces	Patient A	patient B	patient C	Patient D	Patient D/C
DLRSpread	0,24	0,26	0,19	0,2	0,27
alignement grille (IsGoodGrid)	1	1	1	1	1
dispersion du signal	0,01	0,01	0,01	0,03	0,02
bruit de fond vert (g_BGNoise)	2,31	3,57	1,3	2,37	1,13
buit de fond rouge (r-BGNoise)	2,19	1,34	0,88	2,34	1,08
intensité du signal vert (g_signalintensity)	126	137	196	94	69
intensité du signal rouge (R_signalintensity)	83	110	133	105	55

IV.2. Patient A

L'étude de cette LAL-B double-hit est intéressante car il s'agit d'un sous-groupe de néoplasie lymphoblastique B rare peu décrite mais citée dans la classification OMS 2016. Les cytogénétiques décrites dans la littérature n'ont pas de points communs avec celle de notre cas en ce qui concerne les anomalies additionnelles aux translocations (119). Il était donc intéressant de reprendre ce cas en CGH-array pour compléter le caryotype.

Les 2 translocations $t(8;14)(q24;q32)$ et $t(14;18)(q32;q21)$ sont équilibrées au niveau des loci des gènes *c-MYC* et *BCL2*. Le locus *IGH* en 14q32 est ininterprétable. Ces translocations sont donc non visibles en CGH array. En ce qui concerne les 2 délétions, la CGH array a permis de préciser les bandes délétées. En effet, au caryotype, la délétion du chromosome 4 semblait concerner la bande q31. Or, ici (cf figure 35), nous voyons que la délétion intéresse les bandes q32.1 à q35.2 soit 32kb. Aucun gène d'intérêt clinique n'est retrouvé dans cette région. La CGH array a permis de préciser les points de cassure de la délétion en $del(4)(q32.1q35.2)$. La formule cytogénétique en CGH array s'écrit $del(4)(q32q35).arr[hg19]4q32.1q35.2(155,129,920-187,776,992) \times 1$.

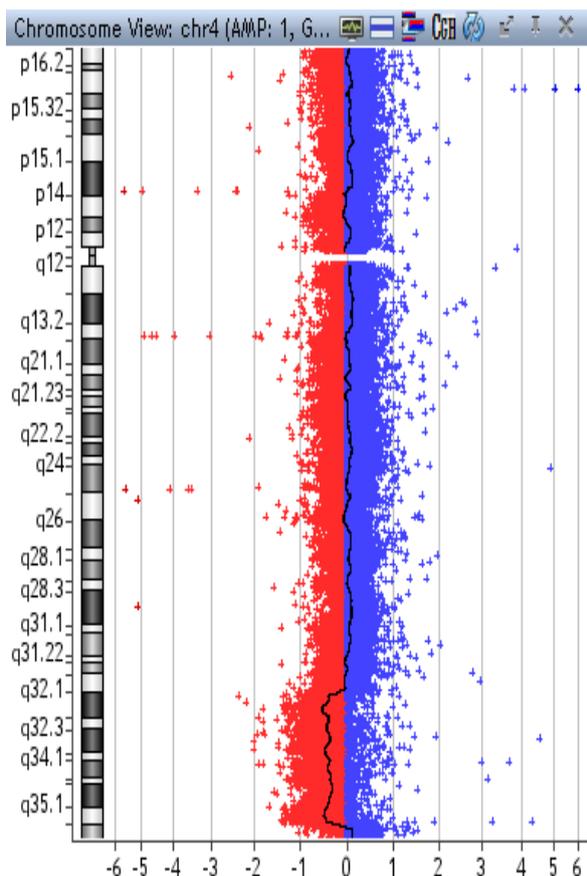


Figure 35: Chromosome 4 (patient A)

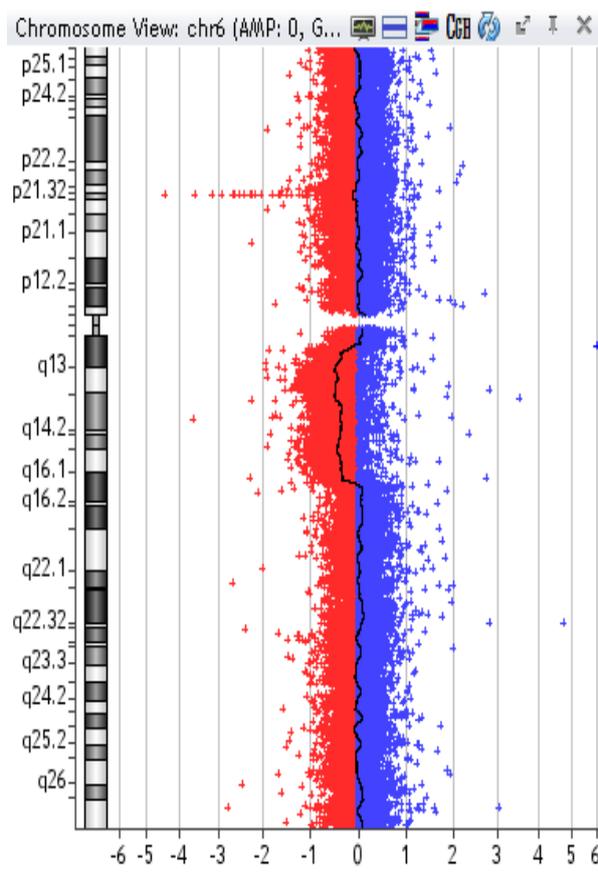


Figure 36: Chromosome 6 (Patient A)

La délétion du chromosome 6 rendue au caryotype comprenait les bandes q21 à q24. Là encore, la CGH array précise les points de cassure q13 au lieu de q21 et q16.1 au lieu de q24, donnant ainsi une $del(6)(q13q24)$ (cf figure 36).

On écrit donc la formule cytogénétique suivante: del(6)(q13q16.1).ar[hg19] 6q13q16.1(66,309,608-95,735,752)x1.

La trisomie du chromosome 12 est visible en CGH array mais elle n'est pas complète (cf figure 37). Nous remarquons qu'il existe une délétion au niveau des bandes q13.11 et q13.13, non visible au caryotype, de taille trop faible (3,4 Mb) pour être pris en compte et n'impliquant pas de gène connu de signification clinique. Dans les LAL-B, les trisomies ne sont pas aléatoires, elles touchent préférentiellement certains chromosomes dont le chromosome X. Mais si la trisomie 12 est fréquente dans les Lymphomes B indolents, elle ne fait pas partie des événements récurrents décrits dans la LAL-B. Le gain du chromosome X est visualisable en CGH array (cf figure 38).

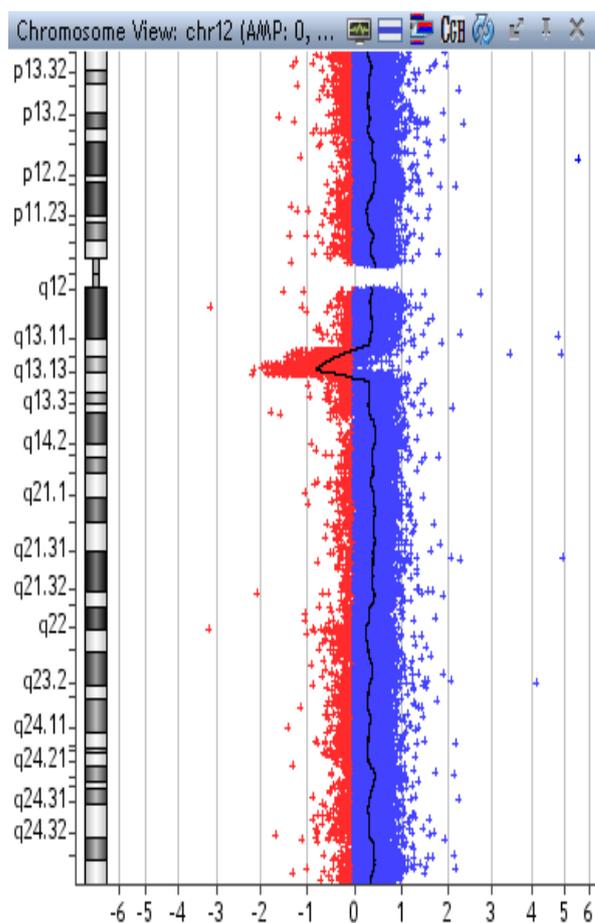


Figure 37: Chromosome 12 (Patient A)

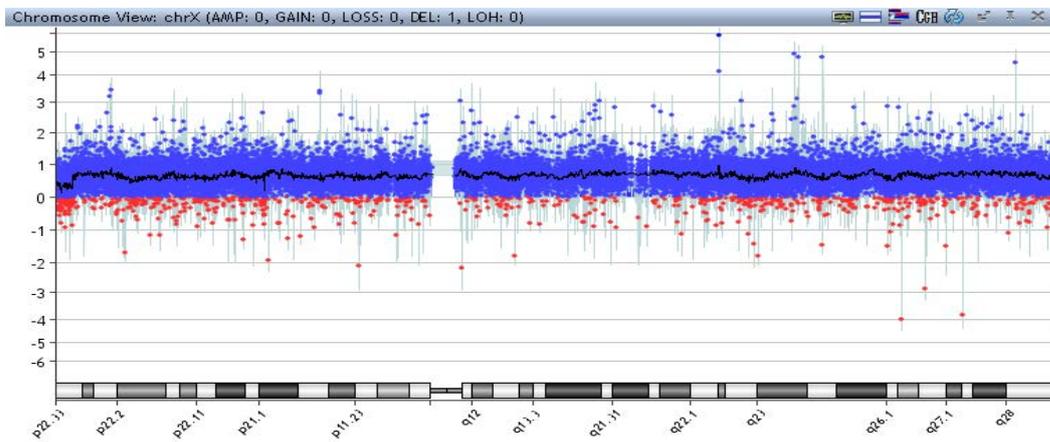


Figure 38: Chromosome X (Patient A)

En ce qui concerne le patient A, le caryotype reste indispensable afin de révéler les 2 translocations équilibrées invisibles en CGH array. Toutefois, cette dernière a permis de préciser les gains et pertes afin de donner des informations précises au protocole centralisant les données biologiques.

IV.3. Patient B

Pour rappel, ce patient présente une mutation de *TP53* ainsi qu'une délétion au niveau du chromosome 5. Au caryotype, des isochromosomes 21 en plusieurs exemplaires sont mis en évidence.

Par CGH array (cf figure 39), la délétion del5q est non visible car en dessous du seuil de sensibilité (4,5% des noyaux en FISH).

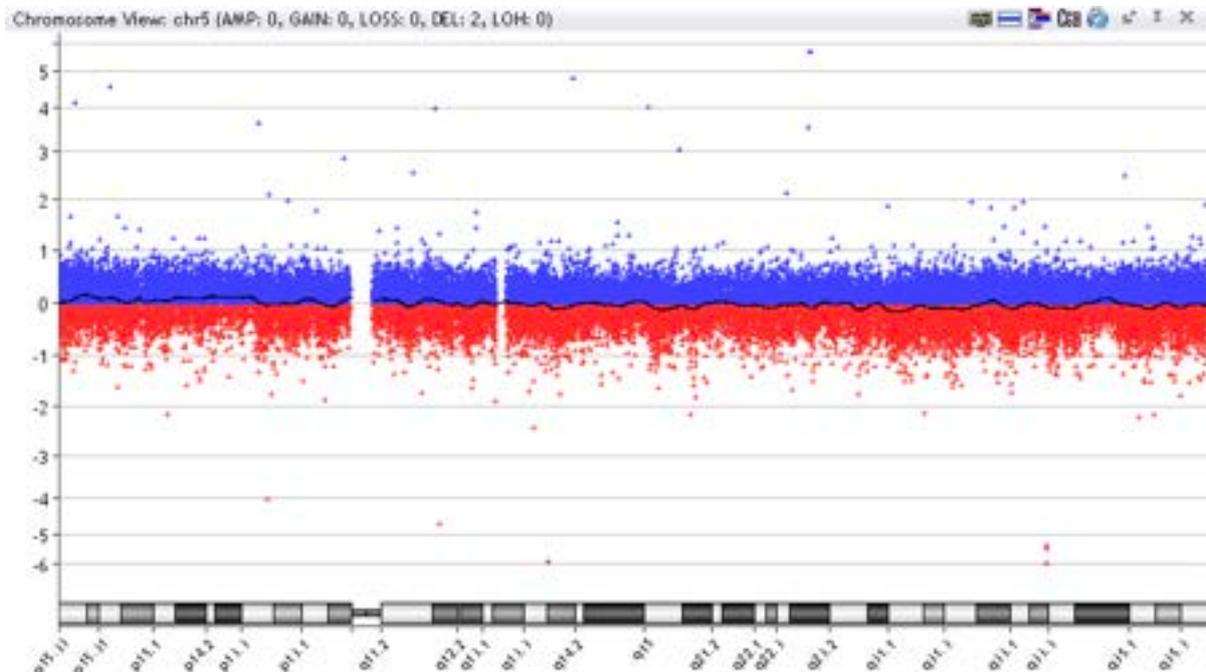


Figure 39: CGH array chromosome 5 patient B

L'utilisation d'une sonde centromérique en FISH montre que les isochromosomes sont bien des chromosomes 21: 2 centromères par isochromosome (cf figure 40).

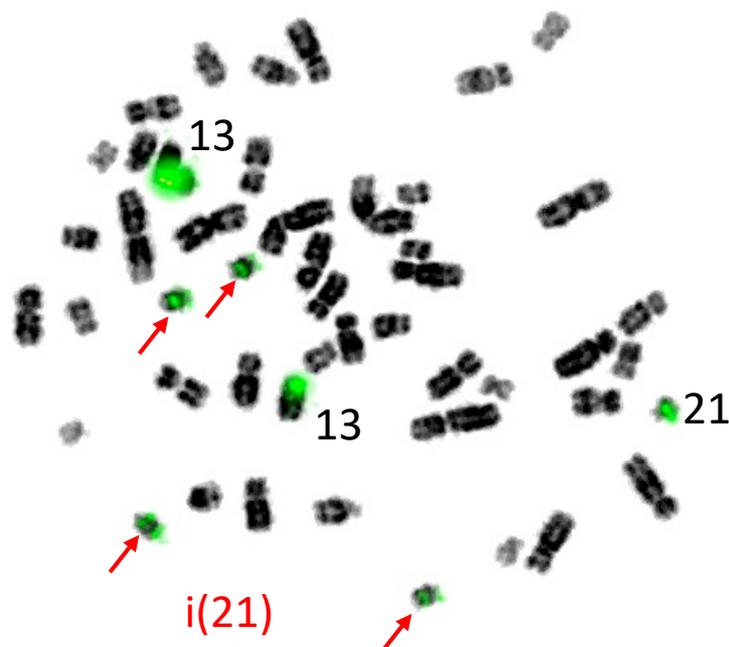


Figure 40: FISH avec sonde centromérique verte des chromosomes 13 et 21: cette métaphase comporte 4 i(21) comportant deux centromères de taille diminuée chacun.

La FISH montre, avec la sonde metasystems RUNX1 breakapart, une copie de la partie 3' de RUNX1 (cf figure 41) et donc une délétion de la partie 5' dans les isochromosomes.



Figure 41: FISH RUNX1 break apart: sonde double couleur rouge en 3' du gène et verte en 5' du gène: sur cette métaphase, il existe une délétion de la sonde verte en 5' du gène sur les 3 isochromosomes 21.

En CGH array, voici le résultat obtenu de l'isochromosome 21 (cf figure 42):

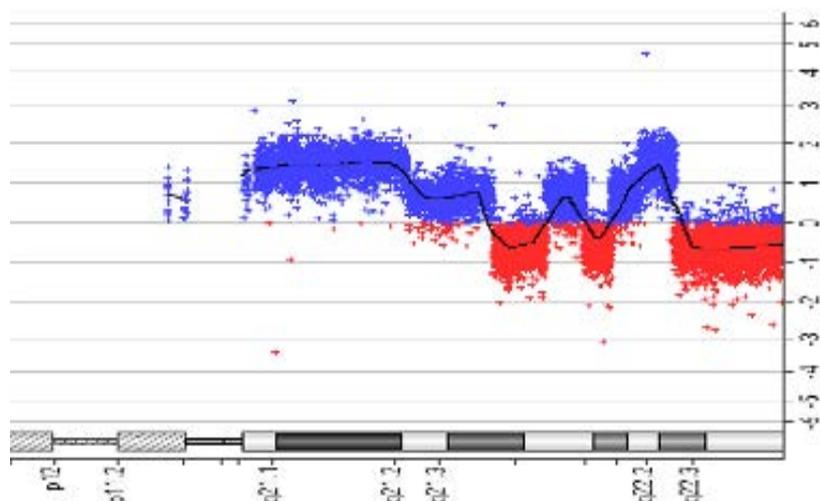


Figure 42: Isochromosome 21 en CGH array

Etant donné la présence des sous-clones ne différant que par le nombre d'iso(21), il est difficile de faire une correspondance directe avec les métaphases. L'ADN représente la somme de ces sous-clones et la visualisation en CGH array est le reflet de l'importance des différents sous-clones. Aussi on ne peut faire qu'une proposition approximative:

Concernant les gains, nous obtenons

- 8 copies de la région q11 à q21.1
- 3 copies de la région q21.2 à q21.3
- 3 copies de la région q22.11
- 3 copies de la région q22.12 à q22.13
- 8 copies de la région q22.13

Concernant les délétions, elles concernent

- 1 copie d'une partie de la région q21.3 incluant le gène *USP16* et une partie de la région q22.11
- 1 copie d'une partie de la région q22.11 à q22.12 impliquant le gène *RUNX1*
- 1 copie d'une partie de la région q22.2 et la région q22.3

Ce profil nous permet tout de même d'appréhender la construction de l'isochromosome 21. Ce dernier est composé de deux bras long de chromosome 21 ainsi qu'une partie terminale du bras court. Et comme certaines métaphases le laissent supposer, il existe un déséquilibre notamment au niveau de la bande blanche du bras long sans pouvoir le documenter au caryotype. La CGH array (cf figure 43) montre que les deux bras ne contiennent pas toutes les mêmes régions. Un bras, un peu plus long au caryotype, comporte probablement les bandes représentées sur le schéma à 1 ou 2 copies tandis que le bras qui semble plus court ne contient que les bandes supposées à 2 copies. Les deux bras semblent avoir des régions délétées communes schématisées à 0 copie.

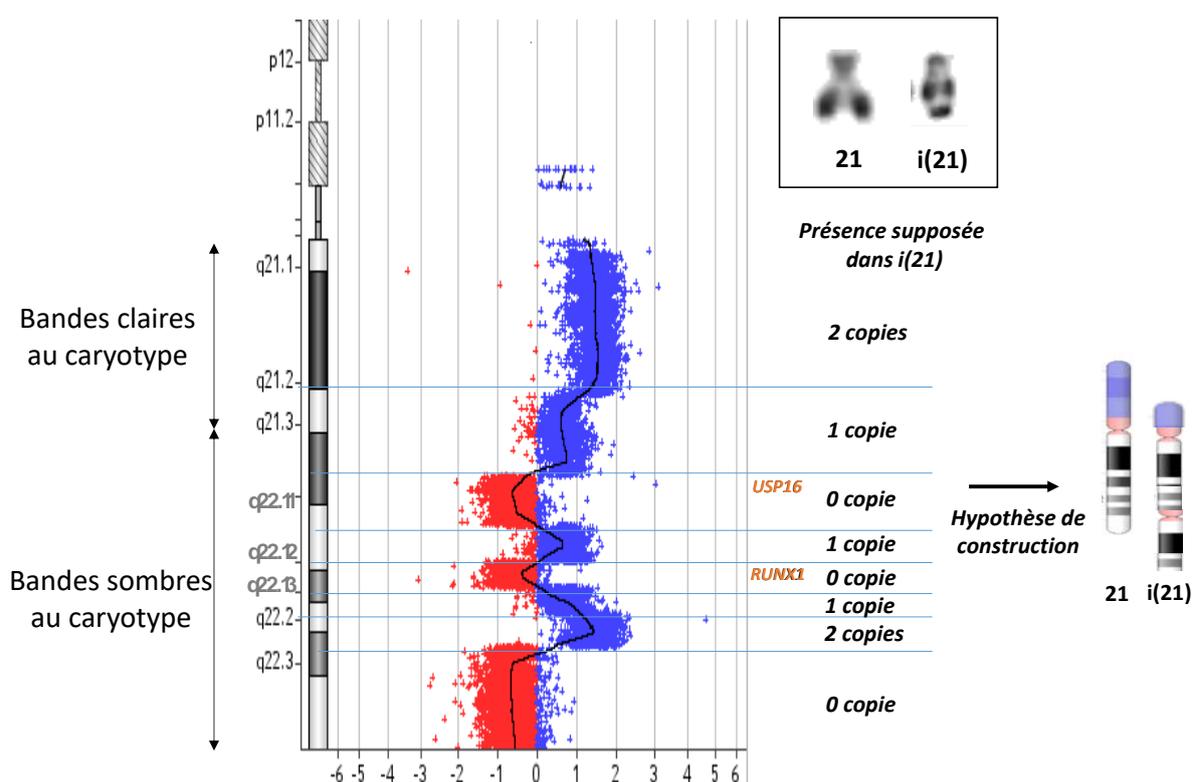


Figure 43: Interprétation des gains et délétions de l'iso(21) en CGH array

Les techniques de caryotype en bandes R, FISH et CGH array permettent de proposer l'écriture du caryotype suivante:

47,XY,i(21)(p10→q22.11::q22.12→q22.12::q22.13→q22.3::p10→q21.2::q22.2→q22.3::q22)x2[6]/48,sl1,+i(21)[8]/49,sl2,+i(21)[2]/46,XY,del(5)(q15q31)[5]

La FISH:

.ish i(21)(3'RUNX1+)(D21Z1x2)[2]

La CGH array:

arr[hg19]21q21.1q21.2(14,347,665-24,391,030)x8,21q21.2q22.11(24,782,330-29,999,664)x4,21q22.11q22.12(30,260,530-33,390,930)x1,21q22.12(33,651,796-35,999,596)x4,21q22.12q22.13(35,999,596-37,434,364)x1,21q22.13q22.2(37,656,448-39,255,444)x4,21q22.2q22.3(38,935,644-41,334,144)x8,21q22.3(42,189,848-48,240,717)x1

Les altérations du gène RUNX1 sont fréquentes dans la LMMC; elles peuvent résulter de mutations ou de réarrangements chromosomiques. Les partenaires impliquant ces réarrangements sont multiples et le gène USP16 en fait partie (117). Si on étudie les régions contenant RUNX1 et USP16, les points de cassure ne se situent pas à l'intérieur de ces gènes (cf figure 44). L'existence d'un remaniement impliquant RUNX1 et USP16 paraît alors improbable. Toutefois, nous avons voulu vérifier la présence de ce gène de fusion. Pour cela, nous avons réalisé une RT-PCR en utilisant les 2 dérivés de la translocation connue. Aucun transcrit n'a été détecté. Le mode opératoire est joint en annexe 8.

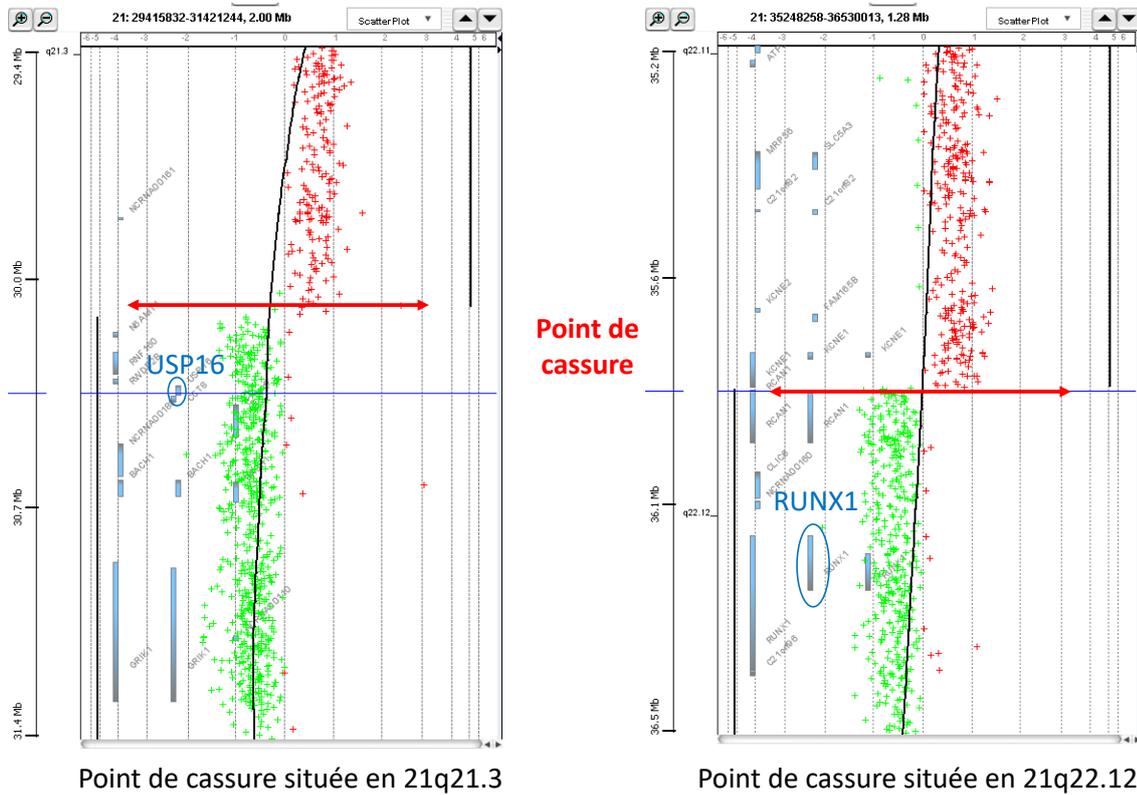


Figure 44: Points de cassure du chromosome 21 (Patient A)

RUNX1 code la sous-unité alpha du facteur de liaison du noyau (CBF pour core binding factor) qui se lie à l'ADN et est considéré comme un gène suppresseur de tumeur dont l'haplo-insuffisance ou les mutations inactivatrices jouent un rôle dans la leucémogénèse (117).

IV.4. Patient C

A la différence du caryotype, la CGH array illustre une anomalie (cf figure 45) : une délétion d'une copie du locus impliquant les gènes TP53 et WRAP53 (de 42,6kb).



Figure 45: Délétion des gènes TP53 et WRAP53

Afin de confirmer cette délétion, une FISH a été effectuée. Elle montre effectivement une délétion de TP53 dans 8% des noyaux interphasiques (23/300 noyaux). Ce faible pourcentage évoque une population Ph+ sous-clonale. Cela nous montre la sensibilité de la CGH array qui est de moins de 10%. Aucune autre anomalie n'a été mise en évidence sur cet ADN.

WRAP53 (WD40-encoding RNA antisense to p53), régulateur de TP53, est un gène surexprimé dans de nombreux cancers, ce qui montre un rôle oncogénique. De plus, le « knockdown » de WRAP53 dans les cellules cancéreuses réduit la taille des tumeurs formées lors de leur greffe chez la souris et déclenche une apoptose dans les cellules cancéreuses.

Grâce à ses rôles complexes dans un certain nombre de processus cellulaires, WRAP53 peut agir comme suppresseur de tumeur dans certaines conditions et comme oncogène dans d'autres (120). Son rôle dans les hémopathies n'a pas été étudié.

Les anomalies de TP53 dans la LMC sont décrites comme associées à une progression de la maladie. In vitro, elles sont responsables d'une résistance à l'imatinib (121).

Ce résultat a été discuté en RCP et il a été décidé qu'une FISH TP53 systématique sera effectuée lors des prochains suivis afin de s'assurer de la persistance de cette délétion. Le médecin en charge de cette patiente surveillera de près tout signe de progression.

Sur le suivi, 6 mois plus tard, le clone comportant la translocation t(9 ;22) a disparu au caryotype et la maladie résiduelle en biologie moléculaire avait déjà atteint une réponse moléculaire majeure à 4log. La FISH TP53 est normale sur ce point de suivi. La patiente est donc sensible au traitement pour le moment.

IV.5. Patient D

Souvenons-nous que le patient D a une translocation impliquant les chromosomes 15 et 22. En CGH array, la région 22q12 est normale et la région p13 du chromosome 15 est non informative en CGH array de part la présence de régions répétées. La translocation n'est pas suspectée en CGH array.

Intéressons-nous maintenant à la translocation $t(8,14)(q24,q32)$. Le locus IgH localisé en 14q32 (à l'extrémité du bras long) est non interprétable en CGH-array du fait du remaniement physiologique dans ce locus (cf figure 46).

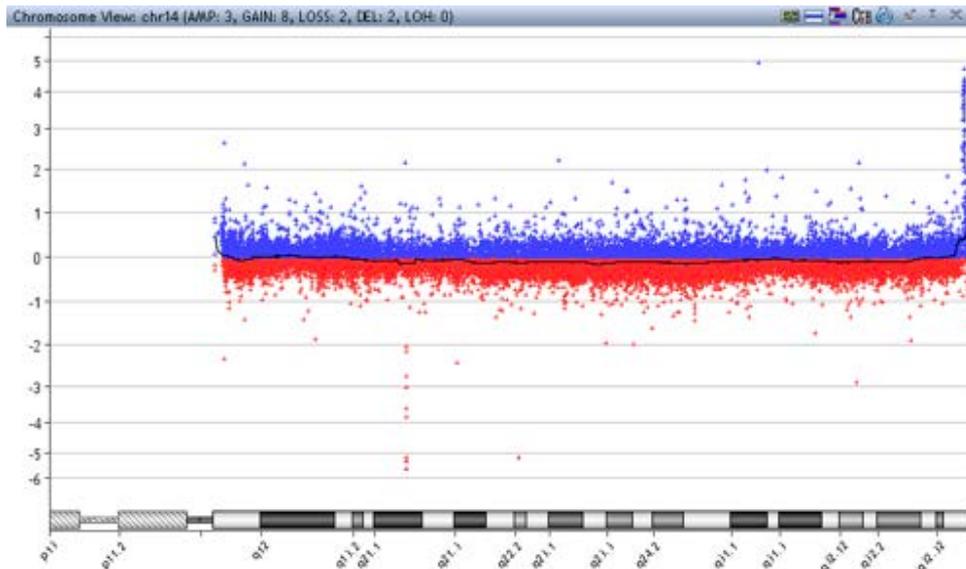


Figure 46: Chromosome 14 (vs Témoin Agilent)

Pour y remédier, nous avons de nouveau effectué la CGH array en utilisant un ADN comportant les gènes des Ig non remaniés. Le cas du patient C est intéressant. En biologie moléculaire, nous avons mis en évidence l'absence de remaniement des gènes des Ig (cf annexe 9 pour le mode opératoire). Nous l'avons donc utilisé comme témoin afin de pouvoir analyser cette région.

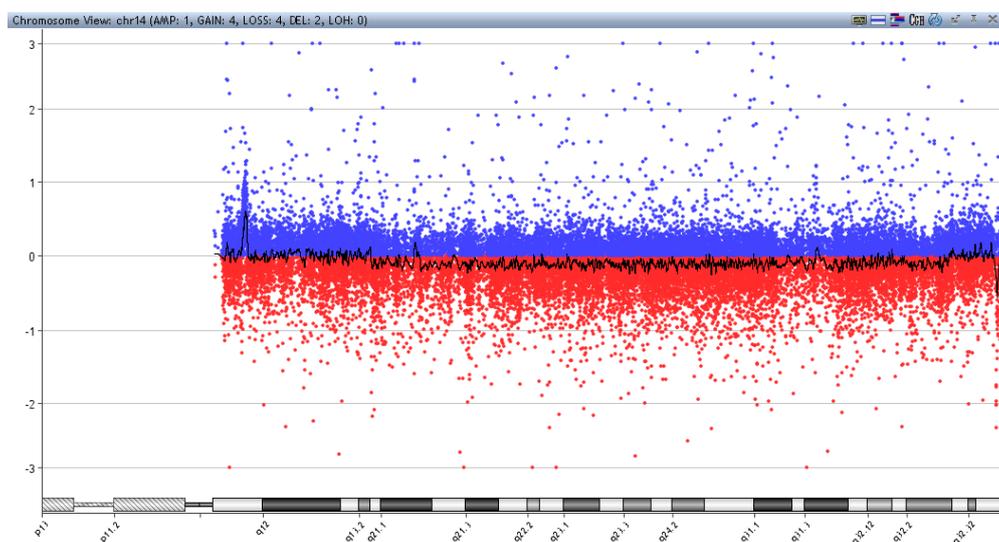


Figure 47: Chromosome 14 (vs Patient C)

La CGH array montre de nombreux remaniements sur le chromosome 8, non vus au caryotype, des gains et des pertes dont certains probablement sous-clonaux (cf figure 49). La perte la plus importante en taille (23,6 Mb) concerne le bras court du chromosome 8. Elle est sous-clonale et difficile à voir au caryotype. Parmi les gains concernant p11.22 et q22.1 à q24.3, un gain concernant la région q24.13 à q24.3 implique le gène *c-MYC*. Seul le gain en q22 pourrait être suspecté au caryotype. Les autres gains ne sont pas vraiment visibles sur les bandes R. Cependant, une FISH interphasique *c-MYC* réalisée sur un suivi antérieur en 2012 a montré que 13,5% présentaient 3 copies *c-MYC* mais aucune métaphase n'avait pu être retrouvée. De même en 2012, il existait sur certaines métaphases un dérivé du chromosome 8 qui comportait une duplication d'une partie du bras long de q21 à q24 sur le bras court de ce dernier.

Une FISH interphasique sur le prélèvement utilisé pour la CGH-array montre plusieurs sous-clones avec 4 et 5 copies de *c-MYC* dans 8 et 12% des noyaux respectivement. Ainsi la CGH array pourrait être le reflet de plusieurs clones comportant différents remaniements sur le chromosome 8. Certains de ces clones ne seraient pas vus au caryotype.

La translocation t(8;14)(q24;q32) impliquant le gène *CASC19* localisé en q24.21 est également concernée par un gain en q24. *CASC19* (Cancer Susceptibility 19) est un gène d'ARN long non codant. Ce gène est notamment associé au cancer colorectal (122). Le point de cassure de la translocation n'est pas visible en CGH array sur le chromosome 8 (cf figure 50).

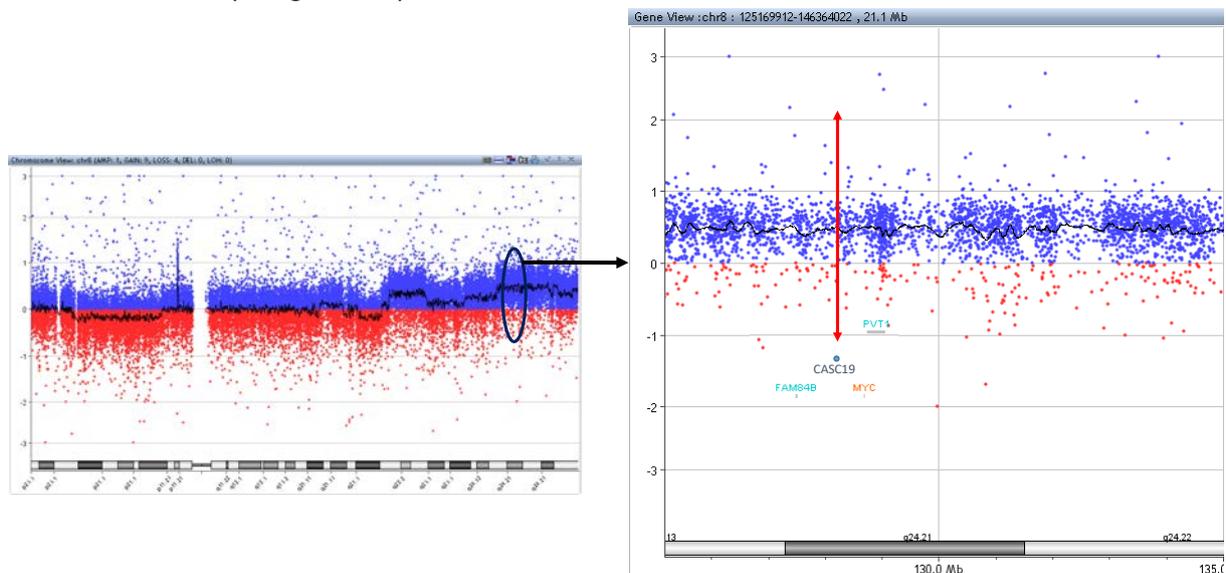


Figure 50: Zoom sur *CASC19*

Intéressons-nous maintenant aux délétions retrouvées au caryotype. Au niveau du chromosome 11, la délétion est bien retrouvée, elle concerne les bandes q21 à q23.3 et s'étend sur 21 Mb (cf figure 51). Elle implique la délétion du gène *ATM* et du gène *BIRC3*. La délétion du bras long du chromosome 11, de taille assez hétérogène, est retrouvée chez 6 à 20% des patients (56). Elle est associée à une lymphadénopathie importante et à des facteurs de mauvais pronostic comme le statut non muté des gènes *IGHV*.

Depuis la mise en place de la tri-thérapie par rituximab-fludarabine-endoxan, les patients avec cette délétion ont une survie sans progression plus courte, mais n'auraient plus une survie globale diminuée. La délétion 11q est le plus souvent sous-clonale.

Le gène *ATM* (ataxia-telangiectasa mutated), code pour une protéine agissant en amont de p53 dans l'identification et la réparation de dommages de l'ADN.

BIRC3 est localisé en 11q22.2. L'inactivation de *BIRC3* serait associée à une résistance accrue aux chimiothérapies.

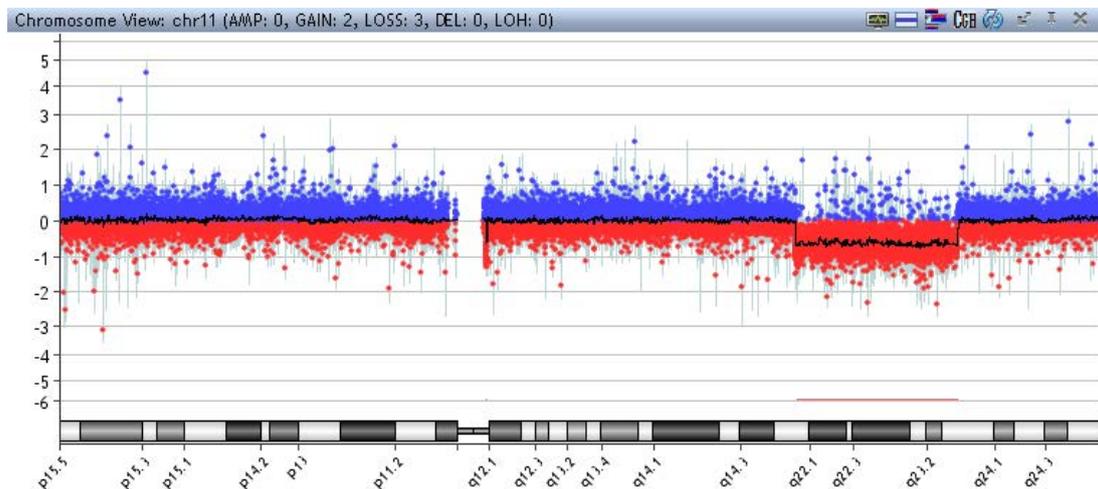


Figure 51: Visualisation en CGH array de la del11q: del(11)(q21q23).arr[hg19] 11q21q23.3(95,569,984-116,560,400)x1 Chromosome 11 (Patient D vs Agilent)

Sur le chromosome 10, une délétion de 150kb en q11.21 est présente en CGH array, elle concerne le gène *TMEM72-AS1* (cf figure 52). Aucune conséquence clinique n'a été rapportée dans la littérature concernant la délétion de ce gène. La délétion annoncée au caryotype au niveau de la bande q25 du chromosome 10 n'est toutefois pas retrouvée en CGH array.

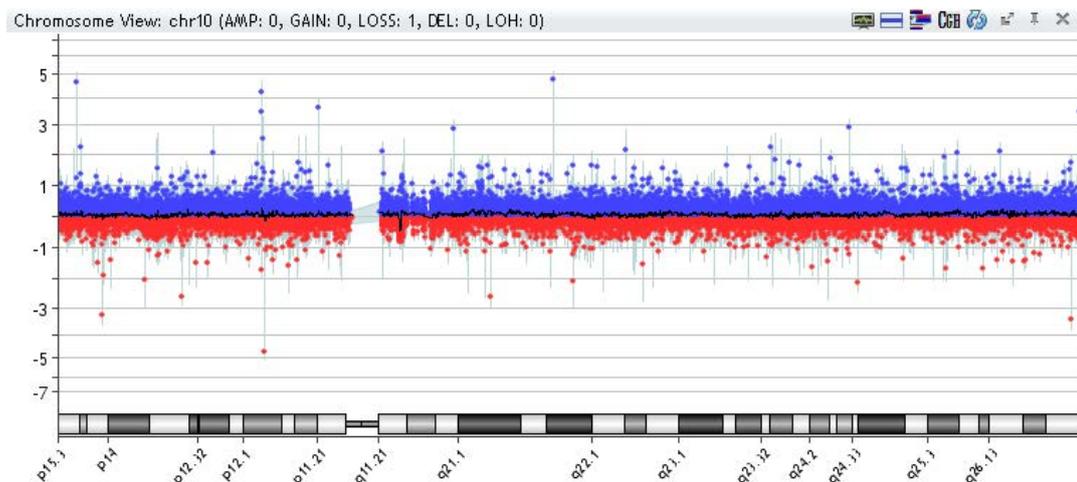


Figure 52: Chromosome 10 (Patient D vs Témoin Agilent)

Cette absence de perte de matériel en q25 nous a permis de revoir le caryotype: la bande 10q26 est probablement localisée sur le bras court du dérivé der(22)t(15;22). Ainsi le dérivé 22 comporte deux translocations: der(22)t(10;22)(q25;p11)t(15;22)(q13;q12).

Au final, l'étude en CGH array a montré qu'il existait probablement plus de sous-clones que ceux visibles au caryotype. Elle a permis de mieux comprendre certains remaniements et d'affiner des points de cassure. En ce qui concerne le projet de recherche centré sur la translocation t(8;14), elle a montré qu'il existait un gain au niveau du bras 8q.

Conclusion

La mise en place de la technique de CGH array au laboratoire nous a montré que cette technique est facile d'installation et d'utilisation. Toutefois, un peu de matériel est nécessaire à la réalisation de la technique. Un caisson est primordial afin de travailler en atmosphère dépourvue d'ozone ainsi qu'un four à l'étape d'hybridation.

La CGH array nous a permis de préciser des gains et pertes difficiles à voir au caryotype (exemple du patient B et D). Cette technique a permis de mieux caractériser les limites des anomalies et la découverte d'anomalies sub-cryptiques (comme la délétion TP53 découvert chez le patient C). Même si la CGH array n'est pas recommandée comme technique systématique en routine, elle pourrait être utile pour certains cas où la cytogénétique a ses limites. Comme le caryotype, la CGH array permet d'avoir une vue d'ensemble des anomalies mais elle doit toujours être associée au caryotype standard puisqu'elle ne permet pas de voir les anomalies équilibrées. La FISH doit être utilisée également afin de confirmer l'anomalie détectée par CGH array et également de souligner l'origine acquise de l'anomalie.

L'utilisation de la CGH array dans les hémopathies malignes peut donner des informations beaucoup plus détaillées sur le génome que le caryotype et/ou la FISH. Il est important que ces informations soient recueillies lors de futurs essais cliniques afin de déterminer leur pertinence clinique et pronostique.

Annexes

Annexe 1: Score de Matutes (123)

Marker	Points	0
	1	
CD5	Positive	Negative
CD23	Positive	Negative
FMC7	Negative	Positive
Smlg	Weak	Moderate/Strong
CD22/CD79b	Weak/Negative	Moderate/Strong

Scores in CLL range from 3 to 5 while in the other B-cell disorders are 0-2.

Annexe 2: Classification de Binet (52)

Stade A	<3 aires ganglionnaires	Hb>10g/dL et Pq>100G/L
Stade B	>3 aires ganglionnaires	Hb>10g/dL et Pq>100G/L
Stade C	Quel que soit le nombre d'aires ganglionnaires	Hb<10g/dL et Pq<100G/L

Annexe 3: CLL-IPI (52)

Catégories	Survie globale à 5 ans	Indications
Faible risque	93,2%	Ne pas traiter
Risque intermédiaire	79,3%	Ne pas traiter sauf si symptômes
Risque élevé	63,3%	Traiter sauf si asymptomatique
Risque très élevé	23,3%	Utilisation de nouveaux agents ou traitements dans le cadre d'essais cliniques

Annexe 4: Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec anomalies cytogénétiques récurrentes (124)

- Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec t(9;22)(q34;q11.2) ; BCR-ABL1
- Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec t(v;11q23) ; MLL (maintenant KMT2A) réarrangé
- Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec t(12;21)(p13;q22) ; TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)
- Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec hyperdiploïdie
- Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec hypodiploïdie
- Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec t(5 ;14)(q31 ;q32) ; IL3-IGH
- Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec t(1 ;19)(q23 ;p13.3) ; TCF3 - PBX1
- Entité provisoire : Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B, BCR-ABL1 - like
- Entité provisoire : Leucémie aiguë / lymphome lymphoblastique B avec iAMP21

Annexe 5: Liste des anomalies répertoriées au laboratoire d'hématologie de Limoges et conduite à tenir dans les LAL-T (en bleu les anomalies détectables en CGH array) (78)

Anomalies	t(10;14)(q24;q11)	t(7;10)(q34;q24)	del(10)(q24q26)	t(7;9)(q34;q34.3)	t(v;14q11) en dehors de 10q24 (TLX1) et 8q24 (MYC)	t(7q34;v) en dehors de 10q24 (TLX1) et 8q24 (MYC)	t(5;14)(q35;q32)
Gènes	TCR A/D (14q11) et TLX1 (HOX11, 10q24)	TCRB (7q34) et TLX1 (HOX11, 10q24)	TLX1 (HOX11, 10q24)	NOTCH1 (9q34.3) et TCRB (7q34)	TCR A/D (14q11) avec un autre gène	TCRB (7q34) avec un autre gène	TLX3 (HOX11L2, 5q35) et BCL11B(14q32)
Détection	Caryotype ou FISH FISH recommandée si caryotype non informatif		Anomalie spécifique détectée au caryotype, FISH ou CGH, FISH recommandée si caryotype non informatif	Caryotype, expression d'une forme tronquée de Notch1 avec activation constitutive FISH recommandée si caryo non informatif	Caryotype, anomalies spécifiques mais certaines difficiles à voir au caryotype (11p13, 11p15)	Caryotype, anomalies spécifiques mais certaines difficile à voir au caryotype (19p13)	Anomalie cryptique détectée par FISH ou PCR FISH recommandée
Caractéristiques clinico-biologiques	Enfant (5-10%), early cortical LALT, association ampABL1. Fréquence élevée d'ACA (de nombre notamment). Possible amplification NUP214-ABL1 (cryptique), caractéristique	Adulte (30 %), plutôt présent early cortical LALT, association ampABL1. Possible amplification NUP214-ABL1 (cryptique), caractéristique	Adulte, rare, plutôt présent early cortical LALT, association ampABL1	< 1%	Enfant (13 %), adulte (15 %)		Enfant (24 %), adulte (5 %), plutôt présent early cortical LALT, association ampABL1
Pronostic	Favorable			Intermédiaire			

Anomalies	t(5;14)(q35;q32) avec ampABL1	del(1)(p32p32)	t(1;14)(p32;q11)	t(1;7)(p32;q34)	Mutations de TAL1	Amp ABL1	t(11;19)(q23;p13.3)
Gènes	TLX3 (HOX11L2,5q35) et BCL11B(14q32) avec NUP214(CAN)- ABL1(9q34)	STIL (SIL) et TAL1 (oncogène facteur de transcription en 1p32)	TAL1 (1p32) et TCR A/D (14q11)	TAL1 (1p32) et TCRB (7q34)	Mutations en 5' du gène	NUP214(CAN)- ABL1(9q34) -> transcrit de fusion	KMT2A (MLL,11q23)- MLLT1 (ENL,19p13) -> transcrit de fusion
Détection	Anomalie cryptique détectée par FISH ou PCR FISH recommandée	non identifiable au caryotype, Diagnostic par FISH, PCR, RT- MLPA ou CGH array	Caryotype informatif, anomalie spécifique		NGS	Détectée en FISH (obligatoire), RT- MLPA et parfois en CGH array	Caryotype informatif, anomalie spécifique, anomalie primaire détectée par RT- MLPA, FISH recommandée
Caractéristiques clinico- biologiques	Enfant (5 %), adulte (3 %)	Enfant (30 %) adulte (10 %), fréquence diminuée avec l'âge	3%, LAL-T matures (late cortical)	< 1%	5%	Enfant (8 %), adulte (8 %) Anomalie secondaire à TLX1 ou TLX3; sensibilité aux ITK, early cortical LAL-T	Enfant (10 %), adulte (3 %)
Pronostic	Défavorable chez adulte	Intermédiaire	Intermédiaire		Valeur pronostique non établie	Intermédiaire Défavorable si ⇔ TLX3	Intermédiaire

Anomalies	t(6;11)(q27;q23)	Caryotype complexe ≥5 anomalies chromosomiques non caractérisées	t(10;11)(p12;q14)	Délétion 17p	t(v;8q24)	t(9;22)(q34;q11)	del(9p21)
Gènes	KMT2A (MLL,11q23)-MLLT4 (AF6,6q27) -> transcrit de fusion	Caryotype informatif mais anomalies non spécifiques: - anomalies type II ^{ère} : 6q-, 9p-, 12p-, 17p- - hypodiploïdie 41-45 ; hyperploïdie 47-50... - remaniements de structure non spécifiques - points de cassure évocateurs d'une translocation variante	PICALM(CALM,11q14)-MLLT10 (AF10, 10p12) -> transcrit de fusion	TP53 (17p13)	Réarrangement MYC (8q24): t(8;14)(q24;q11)avec TCR A/D (14q11)	BCR-ABL1	CDKN2A/B
Détection	Caryotype informatif, anomalie spécifique, anomalie primaire détectée par RT-MLPA, FISH recommandée		Caryotype informatif, anomalie spécifique, détecté par PCR ou RT-MLPA, FISH recommandée	Anomalie II ^{ère}	Réarrangement du locus type I ^{ère} ex : t(8;14)(q24;q11) ou II ^{ère} pas de diagnostic PCR, détecté au caryotype et FISH recommandée	Caryotype informatif, anomalie spécifique, FISH obligatoire	Anomalie de type secondaire très fréquente, souvent à l'état cryptique
Caractéristiques clinico-biologiques	Enfant (10 %), adulte (3 %)	Adulte (7 %)	Enfant (6 %), adulte (10 %) LAL-T immatures (aussi retrouvée dans LAM, également défavorable)	Adulte (3 %)	Enfant (6 %), adulte (6 %) Retrouvée dans sous-clone trisomies 6 ou 7 ⇔ pertes gènes suppresseurs de tumeurs	Exceptionnelle Sensibilité à l'Imatinib	>70%, ⇔ mutations activatrices de NOTCH1, fréquent dans les early cortical LALT et LALT Matures
Pronostic	Valeur pronostique non établie	Défavorable chez l'adulte	Défavorable surtout si LALT immature	Défavorable chez l'adulte	Défavorable, risque de rechute élevée	Pas de valeur pronostique avérée	

Anomalies	t(9;14)(q34;q32)	t(9;12)(q34;p13)	t(9;12)(p24;p13)	del(10)(q23)	del(9q34) et t(9;9)(q34;q34)	del(13)(14.2)	inv(14)(q11.2q13)
Gènes	EML1-ABL1 -> transcrit de fusion	ETV6-ABL1 -> transcrit de fusion	ETV6-JAK2 -> transcrit de fusion	PTEN	SET-NUP214 -> transcrit de fusion	RB1	LM02 (11p13)
Détection	Caryotype informatif, détectée par FISH ABL, ou RT-MLPA			CGH array	RT-MLPA ou CGH array	CGH array	
Caractéristiques clinico-biologiques	< 1%			10 à 15%, LAL-T matures (late cortical)	3%, ⇔ cortico et chimio résistance, sans impact sur la survie	Enfant (12 %)	5%
Pronostic	Valeur pronostique non établie			Défavorable	Valeur pronostique non établie		

Anomalies	inv(14)(q11.2q13)	NOTCH1 (9q34.3)	FBW7 (4q31.3)	WT1 (11p13)	DNMT3A (2p23.3)	IDH1 (2q34)	IDH2 (15q26.1)
Gènes	NKX2-1	NOTCH1 dérégulation voie Notch1, mutations activatrices	FBW7 mutations inactivatrices, dérégulation voie Notch1	WT1 mutations inactivatrices ou délétion du gène suppresseur de tumeur	Mutations identiques à celles des LAM		
Détection	CGH array	NGS Panel myéloïde					
Caractéristiques clinico-biologiques	Enfant (5 %)	> 60% des LAL-T, fréquent dans les early cortical LALT et LALT Matures	8 à 30% des LAL-T	10%, plutôt présent dans les early cortical LALT	ETP LALT		
Pronostic	Valeur pronostique non établie	Favorable sauf si ⇔ mutation défavorable		Valeur pronostique non établie	Défavorable		

Anomalies	LEF1 (4q25)	ETV6 12p13.2	BCL11B (14q32.2)	RUNX1 (21q22.12)	GATA3 (10p14)	PTEN (10q23.31)	NRAS (1p13.2)	KRAS (12p12.1)	PTPN11 (12q24.13)	PTPN2 (18p11.21)
Gènes	Mutations ou délétion du gène suppresseur de tumeur (facteur de transcription)					Mutations inactivatrices	Mutations activatrices		Mutations (dérégulation de transduction de signal)	Mutations inactivatrices
Détection	NGS									
Caractéristiques clinico- biologiques	10-15%	13%, 25% des ETP LALT	10%	10-20%, présent plutôt dans les ETP LALT	5%, présent plutôt dans les ETP LALT	10-15%, LAL- T matures	5%, présent plutôt dans les ETP LALT	2%	3%	6%
Pronostic	Valeur pronostique non établie					Défavorable			Valeur pronostique non établie	

Anomalies	NF1 (17q11.2)	JAK1 (1p31.3)	JAK3 (19p13.11)	FLT3 (13q12.2)	IL7R (5p13.2)	DNM2 (19p13.2)	EZH2 (7q36.1)	SUZ12 (17q11.2)
Gènes	Mutations inactivatrices ou délétions (dérégulation de transduction de signal)	Mutations activatrices (dérégulation de transduction de signal)				Mutations inactivatrices (dérégulation de transduction de signal)	Mutations inactivatrices ou délétions (dérégulation du remodelage de la chromatine)	
Détection	NGS panel myéloïde			PCR pour ITD NGS panel myéloïde			NGS panel myéloïde	
Caractéristiques clinico-biologiques	3%	4-18%	7%	5-10%, ETP LALT	10%	15%	10-15%, ETP LALT	10%
Pronostic	Valeur pronostique non établie							

Anomalies	EED (11q14.2)	PHF6 (Xq26.2)	KDM6A (Xp11.3)	RPL10 (Xq28)	RPL11 (1p36.11)	RPL5 (1p22.1)	CNOT3 (19q13.42)
Gènes	Mutations inactivatrices ou délétions (dérégulation du remodelage de la chromatine)			Mutations (dérégulation des protéines ribosomales et translation)	Mutations inactivatrices (dérégulation des protéines ribosomales et translation)		
Détection	NGS, panel myéloïde limoges			NGS			
Caractéristiques clinico-biologiques	10%	20-40%, plutôt présent dans les early cortical LALT	5-15%	Enfant (6 %)	1%	2%	Adulte (10 %)
Pronostic	Valeur pronostique non établie						

Annexe 6: LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes (124)

- LAM avec t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1*
- LAM avec inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13;q22); *CBFB-MYH11*
- LAM avec *PML-RARA*
- LAM avec t(9;11)(p22;q23); *KMT2A (MLL)-MLLT3*
- LAM avec t(6;9)(p23;q34); *DEK-NUP214*
- LAM avec inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); *GATA2, MECOM (MLL)* LAM mégacaryoblastique t(1;22)(p13;q13); *RBM15-MKL1*
- LAM avec BCR-ABL1 : entité provisoire
- **Biologie moléculaire:**
- LAM avec mutation de *NPM1*
- LAM avec mutation de *CEBPA*
- LAM avec mutation de *RUNX1* : entité provisoire

Annexe 7: IPPS-R (84)

A) Classification cytogénétique de l'IPSS-R				
	Proportion de patients (%)	Caryotype	Survie médiane (années)	Délai jusqu'à 25 % de LAM (années)
Très favorable	4 %	-Y, del(11q)	5,4	NA
Favorable	72 %	Normal, del(5q), del(12p), del(20q), double avec del(5q)	4,8	9,7
Intermédiaire	13 %	Del(7q), +8, +19, i(17q), autre anomalie simple ou double	2,7	2,5
Défavorable	4 %	-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), double avec-7/del(7q) ; complexe avec 3 anomalies	1,5	1,7
Très défavorable	7 %	Complexe > 3 anomalies	0,7	0,7

B) IPSS -R							
Variable pronostique	0	0.5	1	1.5	2	3	4
Cytogénétique	Très favorable		Favorable		Intermédiaire	Défavorable	Très défavorable
Blastes médullaires	≤ 2 %		3-4 %	5-10 %	5-10 %	> 10 %	
Hémoglobine (g/dL)	≥ 10		8- < 10	< 8			
Plaquettes (G/L)	≥ 100	50- < 100	< 50				
Neutrophiles (G/L)	≥ 0,8	< 0,8					

C) Score global IPSS - R	
Groupe	Score
Très faible	≤ 1,5
Faible	> 1,5-3
Intermédiaire	> 3-4,5
Élevé	> 4,5-6
Très élevé	> 6

NA : non atteint

Annexe 8: Protocole PCR multiplex gènes d'immunoglobulines (125)

Nous avons réalisé des PCR multiplex ciblant le gène FR1 de la chaîne lourde d'Ig. Le protocole est résumé ci-après. Un témoin négatif (constitué d'eau) et un témoin positif sont également analysés afin de contrôler la technique.

➤ PCR multiplex FR1 IgH

Tableau 16: Mix PCR IgH FR1

Réactifs	Volume (µl) pour un tube
VH1-FR1 (10 pmol)	1
VH2-FR1 (10 pmol)	1
VH3-FR1 (10 pmol)	1
VH4-FR1 (10 pmol)	1
VH5-FR1 (10 pmol)	1
VH6-FR1 (10 pmol)	1
JH cons FAM (10 pmol)	1
dNTP (10 mM)	1
Buffer Tp II 10x Applied	5
MgCl ₂ (25 mM) Applied	3
Eau	30
Taq Gold Applied	1
ADN (100 ng)	2

➤ Programme du Thermocycleur

- 95°C → 5min

Puis 35 cycles :

- 95°C → 30sec
- 60°C → 1min
- 72°C → 1min30sec

Fin de la manipulation

- 72°C → 10min puis 12°C → ∞

➤ Analyse de fragments

Dans la pièce Post-PCR:

Tableau 17: Réactifs Genemapper

REACTIFS	Volume/tube (µl)
Formamide desionisée	20
Rox 500 Size standard	0.5

Déposer 20.5µl de mix dans chaque puit.

Ajouter 1µl de produit PCR comme indiqué sur votre plan de plaque.

Recouvrir la plaque d'un film adhésif, bien sceller.

Centrifuger la plaque.

Dans la pièce des Thermocycleurs:

Dénaturer les échantillons dans un thermocycleur (à 95°C pendant 5 minutes)

Mettre dans la glace

Enlever le film adhésif et déposer un couvercle souple gris pour le séquenceur.

Déposer au séquenceur.

Impression des résultats d'analyse de fragments au Genemapper via le logiciel d'analyse Genemapper Software 6. Le résultat est sous forme d'électrophorégramme (exemple cf figure 53) avec en abscisse la taille des fragments. Nous comparons la taille des fragments obtenus avec la taille attendue (voir publication pour plus de détails).

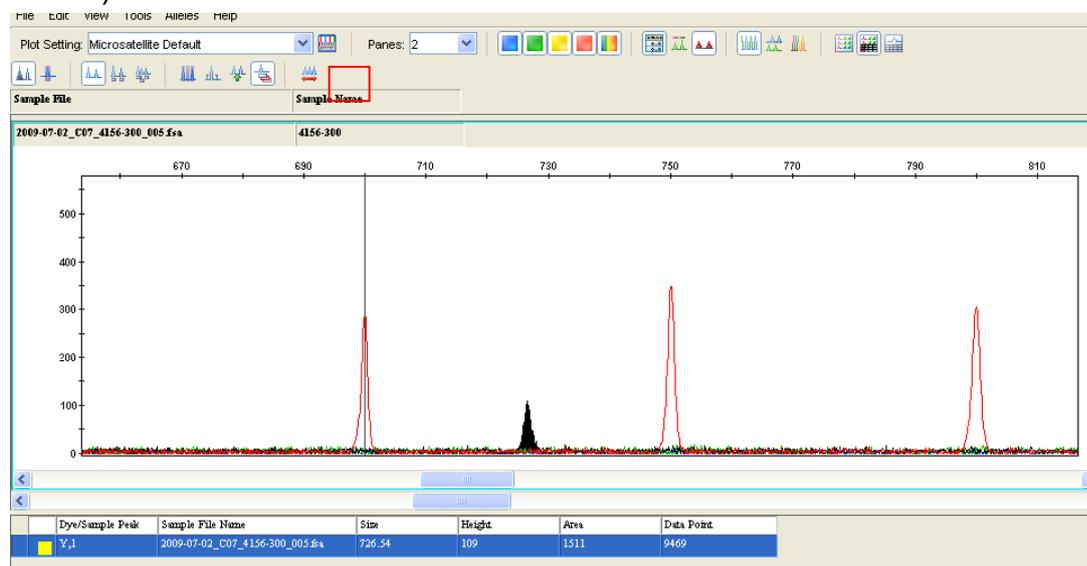


Figure 53: Exemple d'électrophorégramme

Annexe 9: PCR RUNX1-USP16 (117)

- Premières PCRs RUNX1/USP16 et USP16/RUNX1 avec Taq'Ozyme HS

Réalisation de PCRs avec différents couples d'amorces (erreur dans le choix de la PCR N°4 qui sera donc un échec)

- 1- RUNX1_591F / USP16_712R
- 2- RUNX1_738F / USP16_712R
- 3- USP16_54F / RUNX1_1498R
- 4- USP16_89F / RUNX1_1422R
- 5- USP16_89F / RUNX1_1498R
- 6- Tem ABL sur cDNA 19-1547 (ABL1/ABL2) 316 pb (=Témoin positif)

Programme Thermocycleur :

95°C – 1 min

95°C – 15s

60°C – 15s } 35 cycles

72°C- 45s }

72°C- 5 min

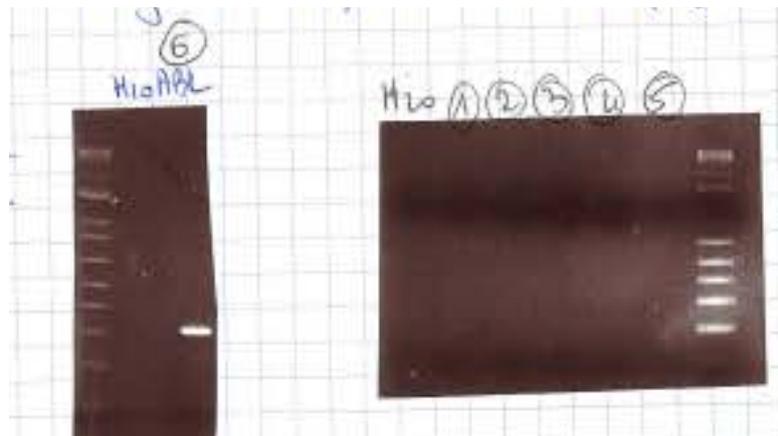


Figure 54: Migration sur gel d'agarose

Sur gel d'agarose, aucune bande n'est amplifiée mis à part le contrôle positif (cf figure 54). On réalise alors des PCR nichées à partir des premiers produits de PCR pour vérifier qu'il n'y ait aucune amplification.

- PCRs nichée RUNX1/USP16 et USP16/RUNX1 avec Taq'Ozyme HS
- a) Sur la PCR 3 : utilisation des amorces USP16_89F / RUNX1_1498R
- b) Sur la PCR 1 : utilisation des amorces RUNX1_738F / USP16_712R
- c) Sur la PCR 2 : utilisation des amorces RUNX1_738F / USP16_712R

Après migration, aucune bande n'est retrouvée. Les conditions de PCR sont alors modifiées : changement de polymérase, de température d'élongation (66°C) et ajout de DMSO (1 µL/réaction). Avec ces nouvelles conditions, une nouvelle PCR est effectuée sur les produits de PCR 3 (1) et 1 (2).

1- Amorces USP16_89F / RUNX1_1498R

2- Amorces RUNX1_738F / USP16_712R



Figure 55: Migration sur gel d'agarose (bis)

Il semble y avoir une bande en gel mais en forme de ménisque (cf figure 55). Pour plus de précision, la migration est alors effectuée sur MultiNA (électrophorèse automatisée) : aucune bande n'est retrouvée (cf figure 56).

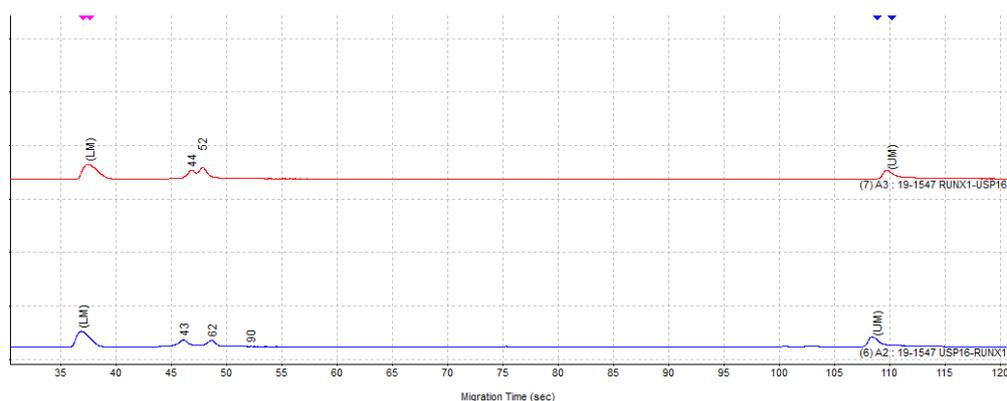


Figure 56: Résultats migration sur MultiNA

Aucune amplification n'est visible donc il semblerait que ce patient ne possède pas ce transcrit de fusion.

Bibliographie

1. Avery A. Sandberg. Chromosome abnormalities in human cancer and leukemia. *Mutation Research*. 1991;247:231-40.
2. Schiffer CA, Stone RM. Morphologic Classification and Clinical and Laboratory Correlates. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al. editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker; 2003.
3. NL Harris, ES Jaffe, H Stein, PM Banks, JK Chan, ML Cleary, G Delsol, C De Wolf-Peeters, B Falini, KC Gatter. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. :1994; 84 (5): 1361–1392.
4. Mario Cazzola. Introduction to a review series: the 2016 revision of the WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. *Blood*. 2016;127(20).
5. H Avet-Loiseau. Cytogénétique des hémopathies malignes. *Encycl Méd Chir. Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS*. 2000;2-3.
6. Mélanie Fortin. La cytogénétique en oncologie. *La revue des technologistes médicaux du Québec*. 2012;2(3):7.
7. B. Arcangioli. Le cycle cellulaire [Internet]. [cité 25 août 2020]. Disponible sur: http://virologie.free.fr/documents/virologie/11-Cycle_cellulaire/Cycle_cellulaire.htm
8. Jean-Michel Dupont. Ultrastructure du chromosome [Internet]. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. [cité 25 août 2020]. Disponible sur: <http://atlasgeneticsoncology.org/Educ/StrucChromID30063FS.html>
9. Joe Hin Tjio and Albert Levan. The chromosome number of man. *Estacion experimental de aula dei, Zaradoza, Spain, and cancer chromosome laboratory, Institute of genetics, Lund, Sweden*; 1956.
10. Peter C. Nowell, David A. Hungerford. Chromosome Studies on Normal and Leukemic Human Leukocytes. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1960;25(1):85–109.
11. Rowley JD. A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining. *Nature*. 1973;243(5405):290-3.
12. Netgen. Cytogénétique des hémopathies malignes. *Revue Médicale Suisse*. 2002;2.
13. Jean-Loup Huret, Claude Leonard, John RK Savage. Chromosomes, Anomalies Chromosomiques. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology*. 2000.
14. Hervé Kempf. Réalisation et analyse d'un caryotype humain [Internet]. [cité 14 sept 2020]. Disponible sur: <https://www.svt-lycee-elorn.ovh/caryotype.php>
15. Romana S, Malan V. Cytogénétique moléculaire. 2010;5-10.
16. Kimberley Gilbride. Chapter Eight - Molecular Methods for the Detection of Waterborne Pathogens. In: *Waterborne Pathogens*. Elsevier. 2014. p. 231-90.
17. Langer PR, Waldrop AA, Ward DC. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(11):6633-6637.
18. Read AP, Donnai D. Génétique médicale : De la biologie à la pratique clinique. De Boeck. Bruxelles; 2009. 460 p.
19. Ronald Hoffman et al. Hematologic Malignancies. In: *Hematology: Basic principles and practice*. Elsevier. 2017. p. 778.
20. Kallioniemi A, Kallioniemi O, Sudar D, Rutovitz D, Gray J, Waldman F, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992;258(5083):818-21.
21. Mantripragada K. K., Buckley P. G., Diaz de Ståhl T., & Dumanski J. P. Genomic microarrays in the spotlight. *Trends in Genetics*. 2004;20(2):87–94.
22. Speicher, M. R., & Carter, N. P. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nature Reviews Genetics*. 2005;(6(10)):782–792.

23. Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosomes Cancer*. 1997;20(4):399-407.
24. Pinkel D., Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet*. 1998;20(2):207-11.
25. Francois Bertucci. Puces à ADN : technologie et applications. 2001;88(3).
26. Fiorentino, Molecular Genetics Laboratory Molecular Genetics Laboratory. An introduction to array CGH. Rome -Italy.
27. Nigel P Carter. Methods and strategies for analyzing copy number variation using DNA microarrays. *Nature genetics*. 2007;39.
28. Schena M. et al. Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. *Trends Biotechnol.* :1998;16(7):301-6.
29. Southern E. et al. Molecular interactions on microarrays. *Nat genet*. 1999;21:5-7.
30. Vivian G. Cheung, Michael Morley, Francisco Aguilar et al. Making and reading microarrays. *Nature genetics*. 1999;21:15-9.
31. Andrieux J. Puces à ADN (CGH-array) : application pour le diagnostic de déséquilibres cytogénétiques cryptiques. *Pathologie Biologie*. 2008;56(6):368-74.
32. Jonathan R. Pollack et al. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nature genetics*. 1999;23:41-6.
33. Stephen P. A. Fodor, et al. Light-Directed, Spatially Addressable Parallel Chemical Synthesis. *Science*. 1991;767-773.
34. Andrew J.Yee et Sridhar Ramaswamy. DNA Microarrays in Biological Discovery and Patient Care. In: *Essentials of Genomic and Personalized Medicine*. 2010. p. 76-83. (Elsevier Inc).
35. Melissa B. Miller et al. Basic Concepts of Microarrays and Potential Applications in Clinical Microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*. 2009;22(4):611-633.
36. A.P. Blanchard et al. High-density oligonucleotide arrays. *Biosensors and Bioelectronics*. 1996;11(6-7):687-90.
37. Timothy R. Hughes et al. Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *nature biotechnology*. 2001;19:342-7.
38. Agilent. Agilent SurePrint Technology [Internet]. [cité 25 août 2020]. Disponible sur: <http://www.koreabiomics.com/avi/sureprint%20technology.pdf>
39. Kallioniemi A. CGH microarrays and cancer. *Curr Opin Biotechnol*. 2008;19(1):36-40.
40. Mullighan CG, Su X, Zhang J, Radtke I, Phillips LAA, Miller CB, et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2009;360(5):470-80.
41. Agilent. Agilent SurePrint G3 Human Catalog CGH Microarrays.
42. Giraud C. Evaluation de l'analyse chromosomique sur puce à ADN (ACPA) en cancérologie. Haute autorité de Santé; 2019 p. 13-4.
43. Kampen, K. R. The discovery and early understanding of leukemia. *Leuk. Res*. 2012;6- 13.
44. Lucie COSTER. Utilisation de la CGH/SNP array dans les leucémies aiguës lymphoblastiques pédiatriques : perspectives et limites. UNIVERSITÉ TOULOUSE III – Paul SABATIER; 2018.
45. Steven H. Swerdlow, Elias Campo, Stefano A. Pileri, Nancy Lee Harris, Harald Stein, Reiner Siebert, Ranjana Advani, Michele Ghilmini, Gilles A. Salles, Andrew D. Zelenetz, and Elaine S. Jaffe. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-90.
46. Kupperts R., Dalla-Favera R. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene*. 2001;20:5580-94.
47. Christine Lefebvre, Evelyne Callet-Bauchu, Elise Chapiro,, Nathalie Nadal, Dominique Penther, Hélène Antoine-Poirel. Place de la cytogénétique dans la prise en charge

des lymphomes et des syndromes lymphoprolifératifs (SLP) de l'adulte et de l'enfant : actualisation par le Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH). *Ann Biol Clin.* 2016;568-87.

48. Cinta Mestre-Escorihuela et al. Homozygous deletions localize novel tumor suppressor genes in B-cell lymphomas. *Blood.* 2007;109(1):271-80.
49. Agawa H. et al. Comparison of genome profiles for identification of distinct subgroups of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 2005;106:1770-1777.
50. Chen W. et al. Array comparative genomic hybridization reveals genomic copy number changes associated with outcome in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood.* 2006;107:2477-2485.
51. Tirado C.A., Chen W., Garcia R. et al. Genomic profiling using array comparative genomic hybridization define distinct subtypes of diffuse large b-cell lymphoma: a review of the literature. *J Hematol Oncol.* 2012;5(54).
52. Tagawa H, Karnan S, Suzuki R, Matsuo K, Zhang X, Ota A, Morishima Y, Nakamura S, Seto M. Genome-wide array-based CGH for mantle cell lymphoma: identification of homozygous deletions of the proapoptotic gene BIM. *Oncogene.* 2005;24:1348-1358.
53. Haute autorité de Santé. Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique Leucémie lymphoïde chronique. 2011.
54. Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) [Internet]. Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers. 2016 [cité 13 avr 2020]. Disponible sur: <http://www.hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/62-enseignement-de-lhematologie-cellulaire-les-principales-maladies-hematologiques/pathologie-lymphoide/121-leucemie-lymphoide-chronique-llc>
55. Michael Hallek. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol.* 2019;94:1266–1287.
56. Florence Nguyen-Khac. Place de la cytogénétique dans la prise en charge de la leucémie lymphoïde chronique : actualisation du Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH). *Ann Biol Clin.* 2016;74(5).
57. Hartmut Dohner et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine.* 2000;343(26):1910-6.
58. Roos G, Kröber A, Grabowski P et al. Short telomeres are associated with genetic complexity, high-risk genomic aberrations, and short survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* :2008; 111: 2246-52.
59. Rampazzo E, Bonaldi L, Trentin L et al. Telomere length and telomerase levels delineate subgroups of B-cell chronic lymphocytic leukemia with different biological characteristics and clinical outcomes. *Haematologica.* :2012; 97: 56-63.
60. Thet Thet Lin. Telomere dysfunction and fusion during the progression of chronic lymphocytic leukemia: evidence for a telomere crisis. *Blood.* 2010;116(11):1899-907.
61. Chapiro E. et al. Gain of the short arm of chromosome 2 (2p) is a frequent recurring chromosome aberration in untreated Chronic Lymphocytic Leukemia at advanced stages. *Leuk Res.* 2010;34(1):63-8.
62. Schwaenen C, Nessling M, Wessendorf S et al. Automated array-based genomic profiling in chronic lymphocytic leukemia: development of a clinical tool and discovery of recurrent genomic alterations. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101: 1039–1044.
63. Rodríguez AE, Robledo C, García JL et al. Identification of a novel recurrent gain on 20q13 in chronic lymphocytic leukemia by array CGH and gene expression profiling. *Ann Oncol.* 2012;23: 2138-46.
64. Brown JR, Hanna M, Tesar B et al. Integrative Genomic Analysis Implicates Gain of PIK3CA at 3q26 and MYC at 8q24 in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res.* 2012;18:3791-802.
65. Russell A. Higgins, Shelly R. Gunn, Ryan S. Robetorye. Clinical Application of Array-Based Comparative Genomic Hybridization for the Identification of Prognostically Important Genetic Alterations in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Mol Diag Ther.*

2008;12(5):271-80.

66. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, et al. International Myeloma Working Group Updated Criteria for the Diagnosis of Multiple Myeloma. *Lancet Oncol.* :2014;15:e538-48.
67. Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia* 2009; 23:3–9.
68. Aurore Perrot et al. Development and Validation of a Cytogenetic Prognostic Index Predicting Survival in Multiple Myeloma. *J Clin Oncol.* 2019;37:1657-65.
69. Hervé Avet-Loiseau. Molecular heterogeneity of multiple myeloma: pathogenesis, prognosis, and therapeutic implications. *Journal Of Clinical Oncology.* 2011;29(14):1893-7.
70. Zandecki M, Lai JL, Facon T. Multiple myeloma: almost all patients are cytogenetically abnormal. *Br J Haematol.* 1996;(94):217–27.
71. Avet-Loiseau H, Li C, Magrangeas F, et al. Prognostic significance of copy-number alterations in multiple myeloma. *J Clin Oncol.* :2009;27:4585–90.
72. Stevens-Kroef M, Olde Weghuis D, Croockewit S, et al. High detection rate of clinically relevant genomic abnormalities in plasma cells enriched from patients with multiple myeloma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2012;51:997–1006.
73. Corre & Avet-Loiseau. Classification, diagnosis and response assessment of myeloma. In: *ESMO Leukaemia & Myeloma Essentials.* p. 31-6.
74. Venkata Yellapantula et al. Comprehensive detection of recurring genomic abnormalities: a targeted sequencing approach for multiple myeloma. *Blood Cancer Journal.* 2019;9(101).
75. Bolli N. A DNA target-enrichment approach to detect mutations, copy number changes and immunoglobulin translocations in multiple myeloma. *Blood Cancer Journal.* 2016;6, e467.
76. Laurence Baranger. Place de la cytogénétique dans la prise en charge des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) de l'enfant et de l'adulte : actualisation par le Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH). *Ann Biol Clin* ; 74 (5) : 547-60 2016;
77. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* :2016;127(20):2391-405.
78. Laurence Baranger et al. Place de la cytogénétique dans la prise en charge des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) de l'enfant et de l'adulte : actualisation par le Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH). *Ann Biol Clin.* 2016;74 (5):547-60.
79. Moorman AV, Enshaei A, Schwab C, et al. A novel integrated cytogenetic and genomic classification refines risk stratification in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2014;124(9):1434-1444.
80. Stanulla M, Dagdan E, Zaliouva M, et al. TRANSCALL Consortium; International BFM Study Group. IKZF1(plus) defines a New Minimal Residual Disease-Dependent Very-Poor Prognostic Profile in Pediatric B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Clin Oncol.* 2018;20;36(12):1240-1249.
81. Laura Belver & Adolfo Ferrando. The genetics and mechanisms of T cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nature Reviews | Cancer.* 2016;16:494-507.
82. Pierre BORIES. Épidémiologie des leucémies aiguës myéloblastiques. *Horizons Héματο.* 2018;08(04):177-9.
83. S. Raynaud, M.-J. Mozziconacci. Apport de la cytogénétique au pronostic et aux décisions thérapeutiques dans les hémopathies malignes myéloïdes. *EMC - Hématologie.* :2015;10(2):1-9.
84. Paulsson K, Heidenblad M, Strombeck B, Staaf J, Jonsson G, Borg A et al. High-resolution genome-wide array-based comparative genome hybridization reveals cryptic chromosome changes in AML and MDS cases with trisomy 8 as the sole cytogenetic aberration. *Leukemia.* 2006;20: 840–846.

85. Dolan M, Peterson B, Hirsch B. Array-based comparative genomic hybridization characterizes a deletion associated with a t(15;17) in acute promyelocytic leukemia. *Am J Clin Pathol.* 2008;130(5):818-823.
86. Ming Hong, Guangsheng He. The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myelodysplastic Syndromes. *J Transl Int Med.* 2017;
87. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes [published correction appears in *Blood* 1998 Feb 1;91(3):1100]. *Blood.* 1997;89(6):2079-2088.
88. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Sole F, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood* 2012;120(12):2454-65.
89. Gangat N, Patnaik MM, Tefferi A. Myelodysplastic syndromes: Contemporary review and how we treat. *Am J Hematol.* 2016;91(1):76-89.
90. Haase, Detlef et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood.* 2007;110(13):4385-95.
91. Haase D. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol.* 2008;87, 515–526.
92. Jädersten M, Saft L, Smith A, et al. TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. *J Clin Oncol.* 2011;29(15):1971-1979.
93. Tetsuichi Yoshizato et al. Genetic abnormalities in myelodysplasia and secondary acute myeloid leukemia: impact on outcome of stem cell transplantation. *Blood.* 2017;129(17):2347–2358.
94. Virginie Eclache et al. Place de la cytogénétique dans la prise en charge des syndromes myélodysplasiques : mise à jour du Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH). :*Ann Biol Clin* 2016; 74 (5) : 525-34.
95. Kolquist KA, Schultz RA, Furrow A, et al. Microarray-based comparative genomic hybridization of cancer targets reveals novel, recurrent genetic aberrations in the myelodysplastic syndromes. *Cancer Genet.* 2011;204:603-628.
96. Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2012;120:2454-2465.
97. Patnaik MM, Lasho TL, Finke CM, et al. Spliceosome mutations involving SRSF2, SF3B1, and U2AF35 in chronic myelomonocytic leukemia: prevalence, clinical correlates, and prognostic relevance. *Am J Hematol.* 2013; 88:201–206.
98. Onida F, Kantarjian HM, Smith TL, et al. Prognostic factors and scoring systems in chronic myelomonocytic leukemia: a retrospective analysis of 213 patients. *Blood.* 2002; 99:840–849.
99. Such E, Cervera J, Costa D, et al. Cytogenetic risk stratification in chronic myelomonocytic leukemia. *Haematologica.* 2011; 96:375–383.
100. Wassie EA, Itzykson R, Lasho TL, et al. Molecular and prognostic correlates of cytogenetic abnormalities in chronic myelomonocytic leukemia: a Mayo Clinic-French Consortium Study. *Am J Hematol.* 2014; 89:1111–1111.
101. Tang G, Zhang L, Fu B, Hu J, Lu X, Hu S, et al. Cytogenetic risk stratification of 417 patients with chronic myelomonocytic leukemia from a single institution. *Am J Hematol* 2014; 89:813-8.
102. Rowley JD. Letter: a new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature.* :1973;243:290–3.
103. Catherine Roche-Lestienne, Elise Boudry-Labis. Place de la cytogénétique dans la prise en charge de la leucémie myéloïde chronique : actualisation par le Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH). *Ann Biol Clin.* 2016;74(5):511-5.
104. Steven Richebourg. Mechanisms of genesis of variant translocation in chronic myeloid leukemia are not correlated with ABL1 or BCR deletion status or response to imatinib

- therapy. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2008;182:95-102.
105. Mitelman F, Levan G, Nilsson PG, Brandt L. Non-random karyotypic evolution in chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer*. 1976;18(1):24-30.
 106. Melo JV, Barnes DJ. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(6):441-453.
 107. Fabarius A, Leitner A, Hochhaus A, et al. Impact of additional cytogenetic aberrations at diagnosis on prognosis of CML: long-term observation of 1151 patients from the randomized CML Study IV. *Blood*. 2011;118(26):6760-6768.
 108. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2013;122(6):872-84.
 109. Ghayas C, Issa et al. Clonal chromosomal abnormalities appearing in Philadelphia chromosome-negative metaphases during CML treatment. *Blood*. 2017;130(19).
 110. Veera S, Nadarajan et al. Identification of copy number alterations by array comparative genomic hybridization in patients with late chronic or accelerated phase chronic myeloid leukemia treated with imatinib mesylate. *Int J Hematol*. 2011;93:465–473.
 111. D. Brazma, C. Grace, J. Howard. Genomic Profile of Chronic Myelogenous Leukemia: Imbalances Associated with Disease Progression. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 2007;46:1039–1050.
 112. Agilent Technologies. Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis. 2016.
 113. Agilent Technologies. Agilent Feature Extraction Software (v10.7) [Internet]. [cité 29 août 2020]. Disponible sur: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G4460-90026_FE_Reference.pdf
 114. Frederic Commo. Analyse génomique en médecine de précision: optimisations & outils de visualisation. [Gustave Roussy]: Université Paris-Saclay; 2015.
 115. Agilent Technologies. Agilent Genomic Workbench 7.0 CGH Interactive Analysis [Internet]. 2015 [cité 29 août 2020]. Disponible sur: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G3800-90042_CGH_Interactive.pdf
 116. Jacqueline Schoumans, Dominique Muehlematter et al. Guidelines for Genomic Array Analysis in Acquired Haematological Neoplastic Disorders. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 2016;55:480–491.
 117. Véronique Gelsi-Boyer et al. Genome profiling of chronic myelomonocytic leukemia: frequent alterations of RAS and RUNX1 genes. *BMC Cancer*. 2008;
 118. Orphanet: Syndrome de Li Fraumeni [Internet]. 2014 [cité 13 avr 2020]. Disponible sur: https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=524
 119. Rabea Wagener. IG-MYC+ neoplasms with precursor B-cell phenotype are molecularly distinct from Burkitt lymphomas. *Blood*. 132(21).
 120. Henriksson S, Farnebo M. On the road with WRAP53β: guardian of Cajal bodies and genome integrity. *Front Genet*. 2015;
 121. Simona Soverini et al. Mutations in the BCR-ABL1 Kinase Domain and Elsewhere in Chronic Myeloid Leukemia. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*. 2015;15(S1):S120-8.
 122. Wang, J. J. et al. Expression and Function of Long Non-coding RNA CASC19 in Colorectal Cancer. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*. 2017;39, 756–761.
 123. Estella Matutes et al. Diagnostic issues in chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2010;23:3-20.
 124. Arber DA et al. The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;
 125. JJM van Dongen et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003;(17):2257–2317.

Serment De Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples:

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement;*
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement;*
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Interest of the CGH array in hematological malignancies

Introduction: Cytogenetics is an indispensable part of the management of hematological malignancies. It can be of diagnostic, prognostic or therapeutic interest. Karyotype remains the test of choice for most pathologies insofar as metaphases can be obtained. On the other hand, its resolution is not able to detect small abnormalities. FISH allows to partly fill this gap by detecting targeted abnormalities with a resolution of a few thousand kb compared to 10 million kb for karyotype. The CGH array has been a major breakthrough by allowing to combine a high resolution (of the order of kb) and a genome-wide view. In the field of molecular biology, this technique is not routinely recommended.

Materials et Methods: In order to show the interest of the CGH array in hematological malignancies, we used this technique on 4 patients of interest with 4 different pathologies: a double hit LAL-B with complex karyotype (patient A), chronic myelomonocytic leukemia (patient B), chronic myeloid leukemia (patient C) and chronic lymphocytic leukemia with complex karyotype (patient D). SURE Print G3 human chips in 1x1M (Agilent) format were used.

Results: For patient A, the karyotype remains essential in order to visualize the balanced translocations. However, the CGH array made it possible to specify the gains and losses of abnormalities visualized by the karyotype. In patient B, several isochromosomes 21 were found at the karyotype. The CGH array allowed us to understand the construction of the isochromosomes. The CGH array revealed a deletion of the TP53 gene in patient C. This deletion was invisible in the karyotype because it was too small. The CGH array study in patient D showed that there were probably more subclones than those visible in the karyotype. It allowed a better understanding of certain reworkings and refinement of break points.

Conclusion: The use of CGH array in hematological malignancies can provide much more detailed information about the genome than karyotype and/or FISH. This technique can be complementary to karyotype and FISH to visualize small rearrangements or to understand complex rearrangements. Its use in future clinical trials may determine their clinical and prognostic relevance.

Administrative discipline: MEDICAL BIOLOGY

Keywords: CGH array, DNA microarray, molecular cytogenetics, onco-hematology

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Paul Sabatier University, Toulouse III
35 chemin des maraîchers, 31062, Toulouse.

Thesis Supervisor: Dr Nathalie GACHARD

Intérêt de la CGH array dans les hémopathies malignes

05 octobre 2020

Introduction: La cytogénétique est un maillon indispensable dans la prise en charge des hémopathies malignes. Elle peut avoir un intérêt diagnostique, pronostique ou encore thérapeutique. Le caryotype reste l'examen de choix pour la plupart des pathologies dans la mesure où des métaphases peuvent être obtenues. Par contre, sa résolution n'est pas en mesure de détecter des anomalies de petite taille. La FISH permet de combler en partie ce défaut en détectant des anomalies ciblées avec une résolution de l'ordre de quelques milliers de kb contre 10 millions de kb pour le caryotype. La CGH array a été une avancée majeure en permettant de combiner une haute résolution (de l'ordre du kb) et une vue pangénomique. A l'aire de la biologie moléculaire, cette technique n'est pas recommandée en routine.

Matériels et Méthodes: Afin de montrer l'intérêt de la CGH array dans les hémopathies malignes, nous avons utilisé cette technique sur 4 patients d'intérêt ayant 4 pathologies différentes: une LAL-B double hit à caryotype complexe (patient A), une leucémie myélo-monocytaire chronique (patient B), une leucémie myéloïde chronique (patient C) et une leucémie lymphoïde chronique à caryotype complexe (patient D). Pour cela, des puces humaines SURE Print G3 au format de 1x1M (Agilent) ont été utilisées.

Résultats: Pour le patient A, le caryotype reste indispensable afin de visualiser les translocations équilibrées. Toutefois, la CGH array a permis de préciser les gains et pertes des anomalies visualisées au caryotype. Chez le patient B, plusieurs isochromosomes 21 ont été retrouvés au caryotype. La CGH array a permis de comprendre la construction des isochromosomes. La CGH array a mis en évidence une délétion du gène TP53 chez le patient C. Cette délétion était invisible au caryotype car de trop petite taille. L'étude en CGH array chez le patient D a montré qu'il existait probablement plus de sous-clones que ceux visibles au caryotype. Elle a permis de mieux comprendre certains remaniements et d'affiner des points de cassure.

Conclusion: Recourir à la CGH array dans les hémopathies malignes peut donner des informations beaucoup plus détaillées sur le génome que le caryotype et/ou la FISH. Cette technique peut être complémentaire au caryotype et à la FISH pour visualiser de petits remaniements ou comprendre des remaniements complexes. Son utilisation dans de futurs essais cliniques pourrait déterminer leur pertinence clinique et pronostique.

Discipline administrative : BIOLOGIE MEDICALE

Mots-clés: CGH array, puce à ADN, cytogénétique moléculaire, onco-hématologie

Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Université Paul Sabatier, Toulouse III
35 chemin des maraîchers, 31062, Toulouse.

Directrice de Thèse : Dr Nathalie GACHARD