

Etude de translocations atypiques dans les lymphomes B

1- Patient 1

a- Résultats préliminaires : Caryotype et FISH de routine

Le premier patient étudié a bénéficié d'un caryotype avec stimulation par IL2/DSP30 à partir d'une biopsie ganglionnaire. Celui-ci met en évidence un caryotype complexe comprenant des trisomies 12 et 19 ainsi qu'une translocation entre les bras longs des chromosomes 13 et 14 (Figure 40).

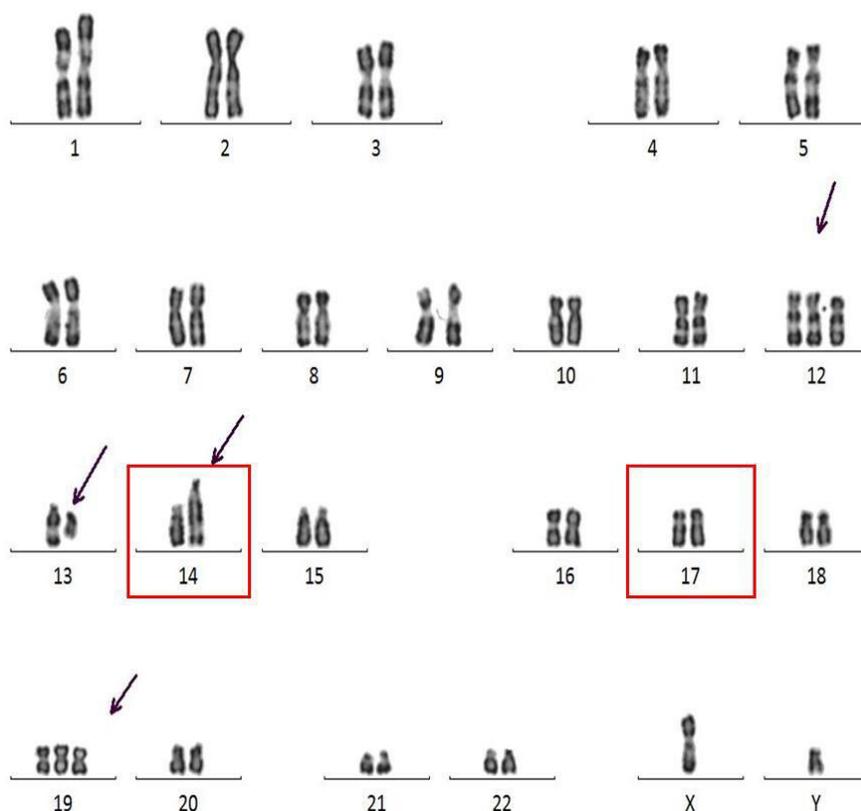


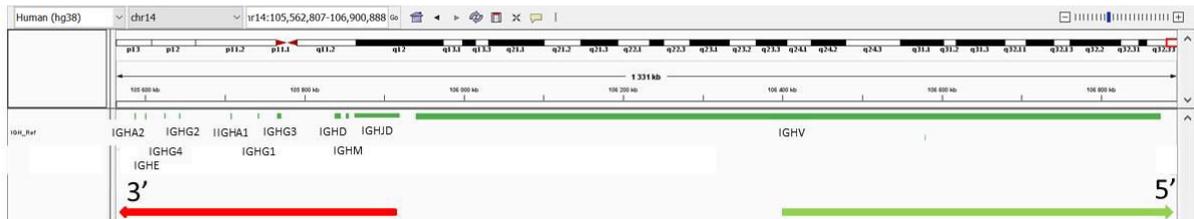
Figure 40 : Caryotype du patient n°1.

Il met en évidence une translocation entre les bras longs des chromosomes 13 et 14, ainsi que des trisomies des chromosomes 12 et 19. Le deuxième chromosome 14 (non impliqué dans la t(13;14)) et les deux chromosomes 17 paraissent normaux au caryotype.



Devant la présence d'une translocation impliquant le locus 14q32, avec potentiellement un remaniement d'*IGH*, une analyse en FISH a été réalisée ciblant *IGH* (Figure 41). La sonde utilisée est celle fournie par Kreatech (Figure 32, page 144).

A



B

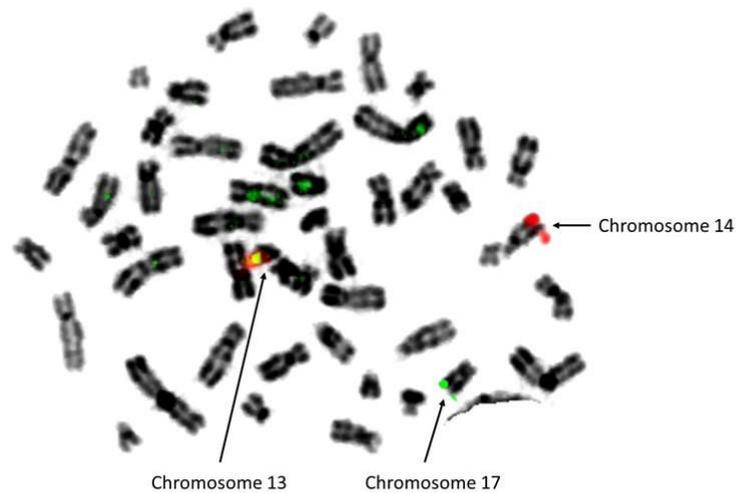


Figure 41 : Image de FISH IGH (sonde Kreatech), concernant le patient n°1.

A- Représentation schématique à partir d'IGV de la sonde Kreatech ciblant *IGH*. La sonde utilisée cible en rouge la région 3' du gène *IGH* (côté centromère, régions constantes jusqu'aux gènes de diversité) et en vert la partie télomérique de la région variable du gène *IGH*.

B- Image de FISH métaphasique avec la sonde Kreatech ciblant *IGH* concernant le patient n°1. Un signal vert est retrouvé sur un chromosome 17, un signal rouge est observé sur le chromosome 14 (non impliqué dans la t(13;14)) et une fusion est visualisée sur le dérivé 13 issu de la translocation entre les chromosomes 13 et 14.



Le résultat montre que la translocation entre les chromosomes 13 et 14 entraîne une délocalisation de l'ensemble du locus *IGH* sur le dérivé 13 (signal de fusion observé sur celui-ci), sans remaniement d'*IGH* (Figure 41). Elle met également en évidence un remaniement concernant l'autre chromosome 14, non vu au caryotype, avec délocalisation d'un signal vert sur un chromosome 17.

La formule chromosomique rendue sur ce prélèvement était alors :

48,XY,+12,+19[17]/48,sl,t(13;14)(q13;q32)[3]

.ish+12(TEL+)[2],t(13;14)(IGH+;IGH-)[5];t(14;17)(3'IGH+;5'IGH+)[5]

.nuc ish(TELx3,AML1x2)[65/110],(IGHx2)(5'IGHsep3'IGHx1)[30/50]

Au final, le patient présente donc un remaniement d'*IGH* cryptique avec implication d'un locus en 17q24. De plus la t(14;17) est présente dans le clone initial (proportion identique à la trisomie 12 sur FISH interphasique) tandis que la t(13;14) est sous-clonale. La translocation impliquant *IGH* est donc un événement précoce dans la lymphomagénèse de ce cas.

L'étude de la littérature retrouve un cas de lymphome B diffus des séreuses dans lequel une translocation t(14;17)(q32;q23), également cryptique, avait été identifiée⁶⁰⁷. Le gène partenaire n'avait pas été mis en évidence. Une étude concernant l'impact pronostique des translocations impliquant les gènes des immunoglobulines dans la LLC rapporte un cas impliquant un partenaire en 17q non identifié³⁴⁴. Les auteurs retrouvent un impact pronostique péjoratif des translocations impliquant les gènes des immunoglobulines, à l'exception de la t(14;18). Nous avons également repris les gènes situés au niveau des locus 17q23 à 17q25 sans identifier de gène connu comme impliqué dans les lymphomes B. Enfin, l'atlas de cytogénétique répertorie 43 partenaires différents identifiés dans des translocations impliquant *IGH* mais le locus 17q24 n'y figure pas (dernière mise à jour en Février 2010)⁶⁰⁸. Il en est de même pour les partenaires de translocation impliquant *IGL* et *IGK*. Une translocation *IGH/IGF2BP1* en 17q21 a été rapportée en 2014 dans un cas de leucémie aiguë lymphoblastique B⁶⁰⁹, mais le point de cassure semble plus télomérique dans notre cas.



b- Résultats par LM-PCR et cytogénétique

Nous avons vu précédemment que les translocations impliquant *IGH* entraînent, dans la majorité des cas, des cassures au niveau des régions de jonction ou autour de l'enhancer E μ . Ces points de cassure sont compatibles avec les résultats obtenus en FISH avec la sonde IGH Kreatech. Les régions d'intérêt étant ciblées, nous avons opté pour la technique de LM-PCR. Nous avons mis au point des amorces permettant de cibler ces régions d'intérêt. Cependant, au cours de cette approche, le remaniement impliquant *IGH* n'a pu être identifié. La technique semble valide car elle a permis de retrouver le réarrangement VDJ supposé fonctionnel mis en évidence par clonalité B.

Puisque les translocations impliquant *IGH* peuvent également impliquer les régions switch des différentes parties constantes, nous avons ensuite dessiné des amorces permettant de cibler par LM-PCR les régions switch des parties constantes IGHG1, IGHA1 et IGHE qui sont les plus fréquemment impliquées dans le lymphome de Burkitt⁶¹⁰. Néanmoins, la FISH avec la sonde *IGH* Kreatech, ciblant en rouge les régions constantes, de jonction et de diversité, devrait entraîner une délocalisation du signal rouge sur le chromosome 17 en cas de cassure dans les parties constantes les plus en 3', ce qui n'est pas le cas. Les résultats obtenus en LM-PCR n'ont pas permis de mettre en évidence de remaniement pour ces régions.

c- Résultats de l'étude en FISH à façon

i- Confirmation des résultats négatifs de LM-PCR sur les régions constantes d'IGH

L'absence de remaniement impliquant les régions constantes d'*IGH* selon la technique de LM-PCR a également été vérifiée par FISH avec des fosmides ciblant les régions constantes les plus en 5', et en aval d'*IGHM* (G248P85777C9, G248P8983A5 et G248P82502G1). Les 3 fosmides restent sur le chromosome 14 (Figure 42).



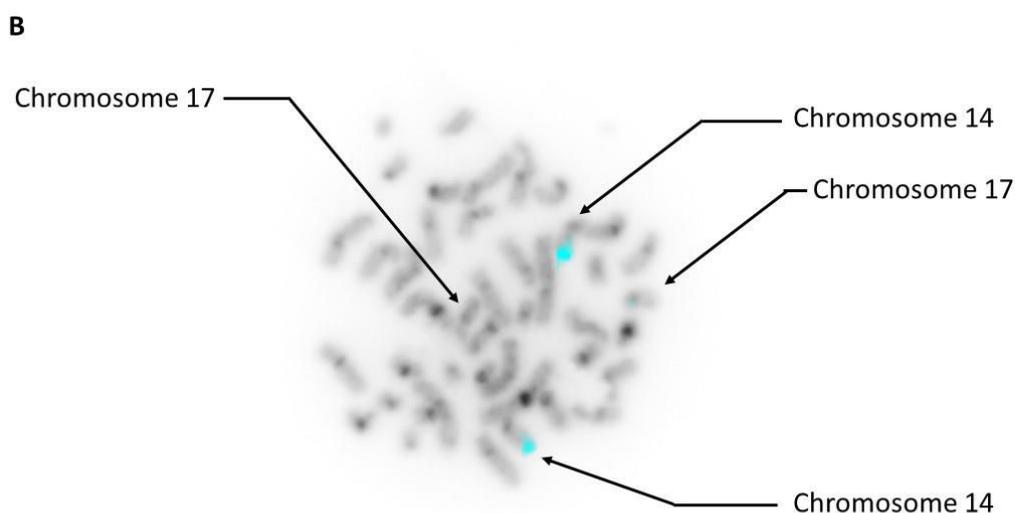
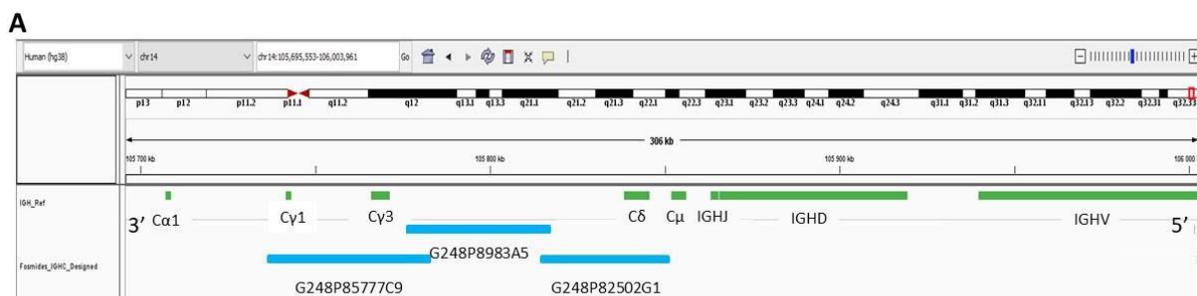


Figure 42 : A- Représentation schématique à partir du logiciel IGV du locus IGH (en vert) et des fosmides ciblant les régions constantes d'IGH (en bleu). B- Image de FISH métaphasique avec ces fosmides marqués en Aqua.

On observe l'absence de délocalisation des signaux bleus. La clonalité de cette mitose a été mise en évidence avec un BAC ciblant les régions IGHV (RP11-47P23), et les chromosomes 17 ont été marqués avec les sondes centromérique et télomérique pour repérage.

ii- Etude du dérivé 17

En parallèle, nous avons déployé une analyse en FISH ciblant le chromosome 17 afin de localiser le point de cassure sur ce chromosome. Nous avons sélectionné des BACs ciblant les régions 17q22, 17q23, 17q24 et 17q25. Aucune de ces sondes n'était délocalisée sur le chromosome 14. Nous avons ensuite utilisé une sonde télomérique du bras long du chromosome 17, montrant elle aussi l'absence de délocalisation du signal. Nous avons vérifié que ces résultats concernaient des mitoses clonales (48 chromosomes, c'est-à-dire porteuses des trisomies 12 et 19). De plus, une sonde centromérique du chromosome du 17 a été réalisée afin de confirmer la concordance télomère-centromère. Enfin, une sonde IGH a



également confirmé la présence du remaniement entre les chromosomes 14 et 17, avec le maintien de la région télomérique 17q sur le chromosome 17.

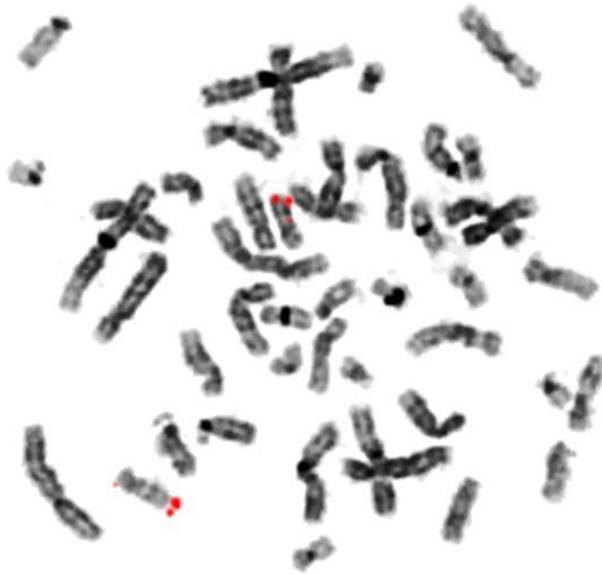


Figure 43 : Image de FISH métaphasique avec une sonde télomérique du bras long du chromosome 17.

On observe l'absence de remaniement (deux signaux rouges sur deux chromosomes 17).

En conclusion, l'étude en FISH montre que remaniement n'est pas une translocation mais d'une insertion cryptique d'*IGH* au niveau du chromosome 17.

D'après la littérature, une insertion d'*IGH* est possible et pourrait impliquer le fragment d'excision issu du remaniement VDJ ou du switch des parties constantes^{48,63,611}. Dans cette hypothèse, selon la première analyse en FISH avec la sonde *IGH* fournie par Kreatech, un remaniement du fragment issu du switch entraînerait une séparation du signal rouge couvrant l'ensemble des régions constantes ainsi que les gènes de jonction et diversité. Etant donné que le signal observé sur le chromosome 17 est un signal vert, cela implique la délocalisation d'un fragment d'*IGHV*. Dans l'hypothèse d'une insertion issue de la recombinaison VDJ, nous savons que nous avons un réarrangement VDJ clonal de type *IGHV5-51, IGHD6-6* unique. La clonalité n'a pas mis en évidence d'autre remaniement VDJ. Dans ce cas, une grande partie de la partie variable des immunoglobulines est tronquée et sa délocalisation pourrait être visualisée. D'après le schéma de la sonde de FISH Kreatech, un tel remaniement entraînerait une cassure située à peu près au milieu de la sonde verte, avec un signal couvrant le fragment d'excision et un signal résiduel sur le chromosome 14 (Figure 32 et Figure 44). Malgré l'absence de signal résiduel vert visible sur le chromosome 14, cette hypothèse ne peut être



totalemment exclue étant donnée l'incertitude de la localisation exacte des bordures de la sonde verte. Il se peut également qu'un autre réarrangement VDJ non productif ait été initié avec un segment VH proche du télomère, entraînant un signal résiduel faible sur le chromosome 14, et donc invisible en FISH.

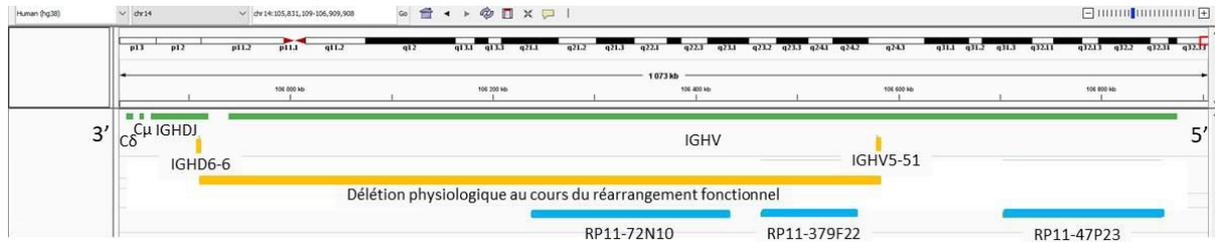


Figure 44 : Représentation schématique à partir du logiciel IGV du locus *IGH* (en vert) et du fragment d'excision selon le remaniement VDJ mis en évidence (en orange), ainsi que les 3 BACs utilisés pour vérifier la délocalisation du fragment d'excision (en bleu).

Dans l'hypothèse d'une insertion du fragment d'excision se produisant au cours du réarrangement VDJ, nous avons utilisé des BACs situés en amont et au niveau du fragment d'excision (Figure 44). Les résultats montrent que tous les BACs sont délocalisés sur le chromosome 17, ce qui infirme cette hypothèse (Figure 45). De plus, on observe une disparition du signal ciblant le fragment d'excision issu du réarrangement VDJ soit au niveau d'un chromosome 14 normal (en l'absence de translocation entre les chromosomes 13 et 14), soit au niveau du dérivé 13 issu de la t(13;14). Ceci indique que le réarrangement VDJ productif mis en évidence a lieu sur le chromosome 14 non impliqué dans le remaniement avec le chromosome 17.

Nous avons continué les explorations avec la réalisation de FISH au niveau de la région de cassure supposée. Pour cela, nous avons utilisé les BAC RP11-645E6, RP11-965B13 et RP11-14117. Cependant, les résultats obtenus étaient ininterprétables (réalisation sur lames déjà hybridées plusieurs fois avec déshybridation incomplète et dégradation du matériel génétique).

L'ensemble de ces résultats indique une région de cassure théorique située entre IGHDJ et IGHV3-21 ou IGHV3-22.

La zone de cassure restante est alors d'environ 470 kb.



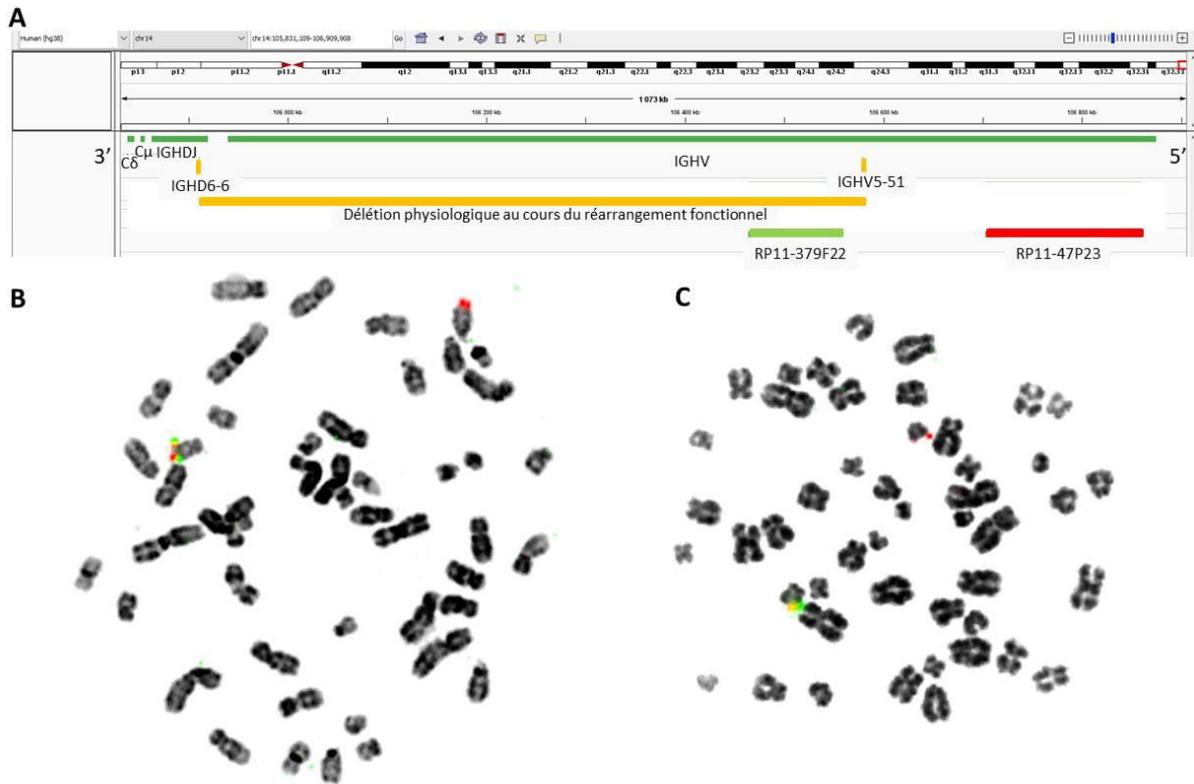


Figure 45 : Image de FISH métaphasique avec les BACs RP11379F22 et RP11-47P23 marqués respectivement en vert et rouge.

A- Représentation schématique à partir du logiciel IGV du locus IGH (en vert) et des BACs RP11-379F22 (vert) et RP11-47P23 (rouge).

B- Images de FISH métaphasique du clone sans t(13;14). On observe un signal rouge sur un chromosome 14 non remanié et une fusion sur le dérivé 17. Il manque un signal vert, ce qui peut être expliqué par la perte lors du réarrangement physiologique IGHV. C : Image métaphasique du clone présentant la t(13 ;14). On observe un signal rouge sur le dérivé 13 issu de la t(13;14) et une fusion sur le dérivé 17. Il manque un signal vert pouvant être expliqué par la perte lors du réarrangement physiologique IGHV avec délocalisation d'IGH sur le chromosome 13.

d- Etude en Multi-FISH

Nous avons également réalisé une analyse en multi-FISH pour ce patient qui ne permet pas de mettre en évidence le remaniement entre les chromosomes 14 et 17 (Figure 46 et Figure 47). En effet, l'idéogramme du dérivé 14 correspondant ne permet pas de déceler la présence de matériel issu du chromosome 17. Concernant le dérivé 17, on note un décrochage des couleurs en 17q sur une mitose, mais non reproductible sur d'autres mitoses et probablement artéfactuel. La translocation entre les chromosomes 13 et 14 est visible avec une partie du chromosome 13 clairement délocalisée sur le 14. A l'inverse, la portion de chromosome 14



délocalisée sur le chromosome 13 n'est pas visible, probablement à cause de la taille du fragment et du marquage faible des extrémités chromosomiques. La résolution de cette technique est donc insuffisante pour mettre en évidence le remaniement d'intérêt.

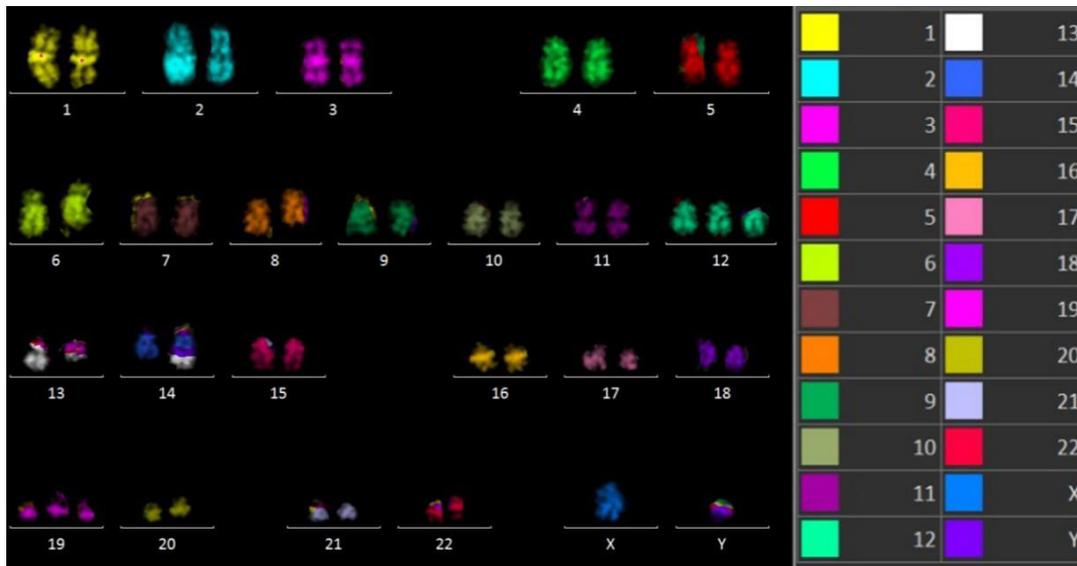


Figure 46 : Image de M-FISH réalisée chez le patient n°1. On visualise la translocation entre les bras longs des chromosomes 13 et 14. En revanche, le remaniement entre les chromosomes 14 et 17 est invisible. La mitose observée est porteuse des trisomies 12 et 19.

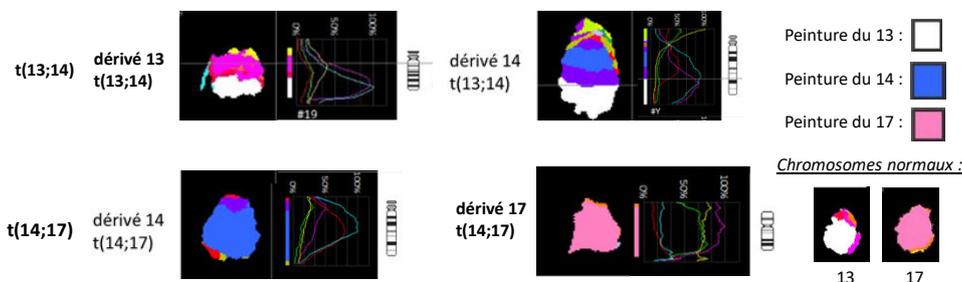


Figure 47 : Idéogrammes des chromosomes 13, 14 et 17 (multiFISH). Le dérivé 13 issu de la t(13;14) est identifiable du fait de sa taille réduite, mais la portion de chromosome 14 délocalisée n'est pas visible car sa taille 14 est trop petite. En revanche, le dérivé 14 issu de la t(13 ;14) est bien visualisé. La t(14;17) n'est pas visible. On note un décrochage en 17q terminal des couleurs bleu et rouge (associées au chromosome 14) et une chute des couleurs jaune, vert et violet (associées au chromosome 17) sur le deuxième chromosome 17. Ces signaux restent trop faibles pour être interprétés et ne sont pas répétés sur les autres mitoses clonales analysées.



e- Etude en CGH-array

Enfin, une approche en CGH-array a été réalisée. En effet, certaines translocations apparemment équilibrées au caryotype entraînent néanmoins une perte de matériel visible en CGH-array⁶¹².

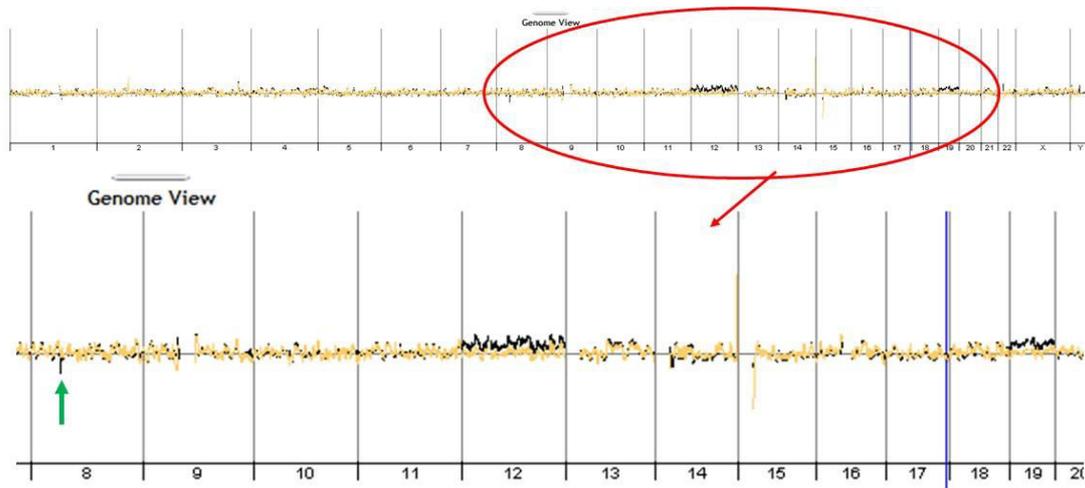


Figure 48 : Profil en CGH-array du patient n°1.

Le remaniement entre les chromosomes 14 et 17 n'est pas visible. On visualise faiblement en noir les trisomies 12 et 19. La flèche verte pointe la délétion 8p11.

Le résultat de la CGH-array permet de visualiser faiblement les trisomies 12 et 19 (Figure 48). Le fait qu'elles soient faiblement visibles est expliqué par la faible infiltration du prélèvement utilisé (ADN issu du sang). De plus, il s'agit d'une anomalie sous-clonale. Elles demeurent néanmoins visibles. En revanche la translocation entre les chromosomes 14 et 17 n'est pas visualisable alors qu'elle est autant représentée que les trisomies 12 et 19. En particulier, cette technique n'a pas permis de mettre en évidence de perte de matériel au niveau du chromosome 17. Le locus au niveau du chromosome 14 n'est pas interprétable en CGH en raison de l'utilisation d'un témoin ADN présentant un réarrangement VDJ physiologique de taille importante. La translocation entre les chromosomes 13 et 14 n'est pas visualisée non plus. Soit elle est sous clonale, soit elle est équilibrée et donc non visualisable. L'analyse d'un échantillon plus infiltré tel que le ganglion serait souhaitable. En revanche, on détecte une délétion 8p11.



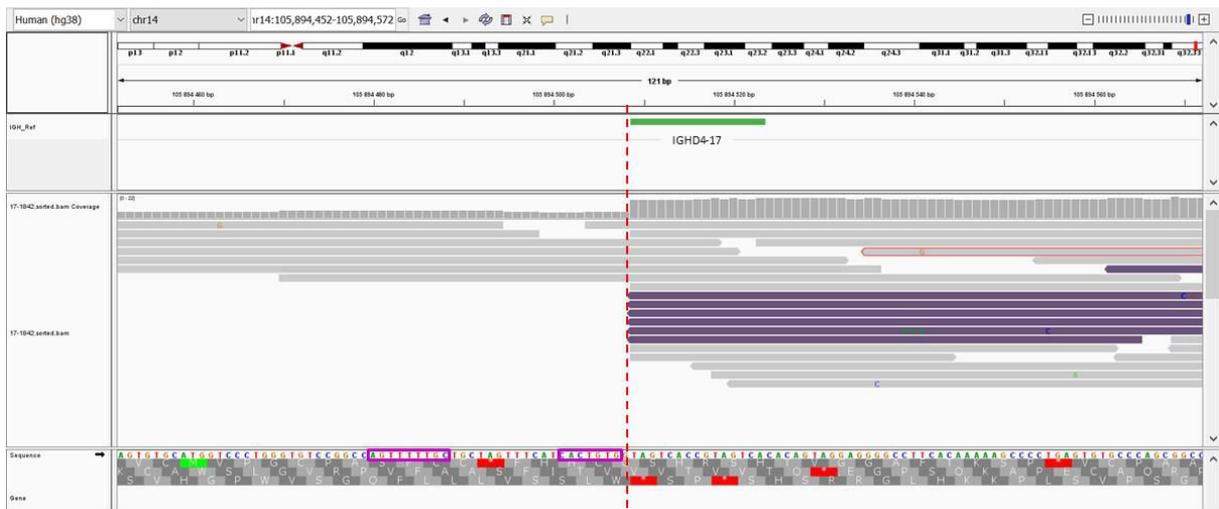


Figure 50 : Visualisation à partir du logiciel IGV des séquences obtenues par séquençage du génome entier au niveau du chromosome 14, position 105894509.

Les alignements colorés en gris correspondent aux séquences germinales. Ceux en violet représentent les séquences dont le début est aligné sur le chromosome 14 et la fin est localisée sur le chromosome 17. Le locus IGHD4-17 est représenté en vert. Le deuxième point de cassure au niveau d'*IGH* est indiqué avec un trait pointillé rouge et est situé au niveau d'IGHD4-17. Les deux cadres violets au niveau de la séquence indiquent l'heptamère (CACTGTG) et le nonamère (AGTTTTGC) du RSS jouxtant IGHD4-17 et le réarrangement (voir Courte discussion et conclusion, page 173).

Au niveau du chromosome 17, les deux points de cassures sont distants de seulement 6 pb. Ils sont visualisables également sur le logiciel IGV à partir des fichiers bam (Figure 51). Le point de cassure est situé dans un intron du gène *B3GNTL1* (pour UDP-GlcNAc:betaGal bêta-1,3-N-acétylglucosaminyltransférase like 1). Il est situé en 17q25.3.



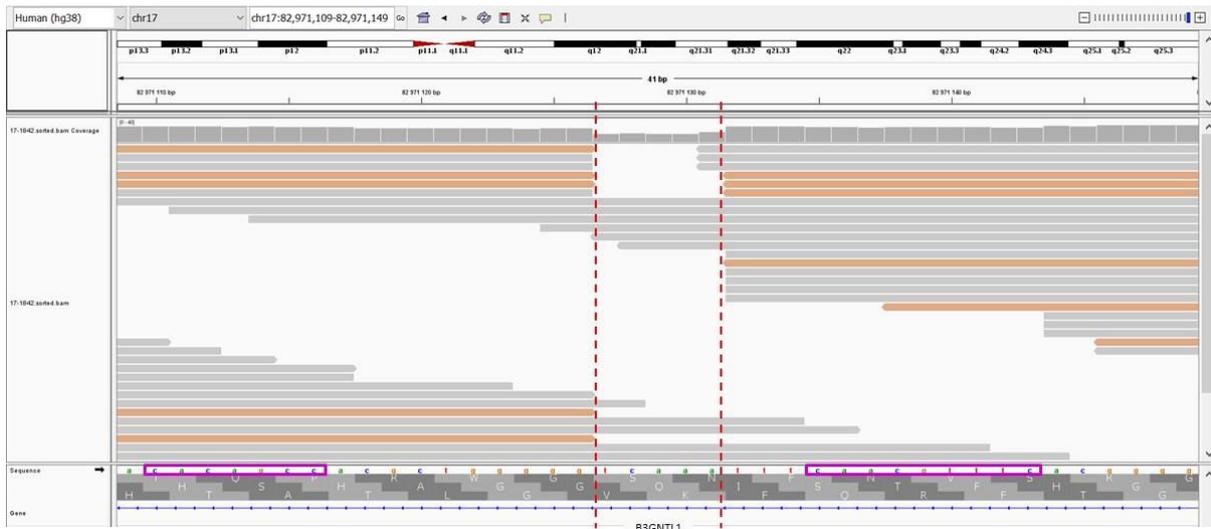


Figure 51 : Visualisation à partir du logiciel IGV des séquences obtenues par séquençage du génome entier au niveau du chromosome 17, centrée sur les positions 82971126 à 82971132. Les alignements colorés en gris correspondent aux séquences germinales. Ceux en orange représentent les séquences dont le début est aligné sur le chromosome 17 et la fin est localisée sur le chromosome 14. Les deux points de cassure au niveau du chromosome 17 sont indiqués par les traits pointillés rouges. Ils sont espacés de 6 pb et touchent le gène *B3GNTL1*. Les deux cadres violets au niveau de la séquence indiquent les séquences mimant un heptamère (CACAGCC) et un nonamère (CAACGTT) d'un RSS cryptique détecté par le site RSS database^{613,614} (voir Courte discussion et conclusion, page 173).

A partir de ces résultats, nous avons récupéré les séquences concernées. Ainsi, la séquence issue du premier point de cassure identifié, impliquant IGJH4 et la position 82971132 sur le chromosome 17 est :

ATGCAGCAAACCCTTCAGAGTTAAAGCAGGAGAGAGGTTGTGAGGACTCACCTGAGGAGACGGTG
 ACCAGGGTTCCTGGCCCCAGTAGTCAAAGTTTACGATCTTCAACGTTTCACGGGGACAAACCACA
 TCCAAACCACGGCAATTATATCCAGGCCGGTCTGTGCTCACGGGACGTTTCTATCGGACAG

Avec en rouge la portion issue du chromosome 14, en noir l'insertion de 9 nucléotides et en bleu la portion issue du chromosome 17.

La séquence au niveau du deuxième point de cassure identifié impliquant IGHD4-17 et la position 82971126 sur le chromosome 17 est :

CTGCGAGGGCTCACTCAGCGCTGTGGGAGGCATTATCTGTGCACAAGGGGTCCCCTCGAGACCCCA
 GCACCTCCCACACAGCCACGCTGGGGGCCCCCTCGGGGTAGTACCGTAGTCACACAGTAGGAG
 GGGCCTTCAAAAAAGCCCCTGAGTGTGCCAGCGCGCTTCCACGCGGGCCCTGGTCCAGG

Avec en bleu la portion issue du chromosome 17, en noir l'insertion de 13 nucléotides et en rouge la portion issue du chromosome 14.



A partir de ces résultats, nous avons mis au point des amorces pour vérifier ces points de cassure par PCR standard suivie d'un séquençage de type Sanger. Ceux-ci ont été validés (Figure 52 et Figure 53).

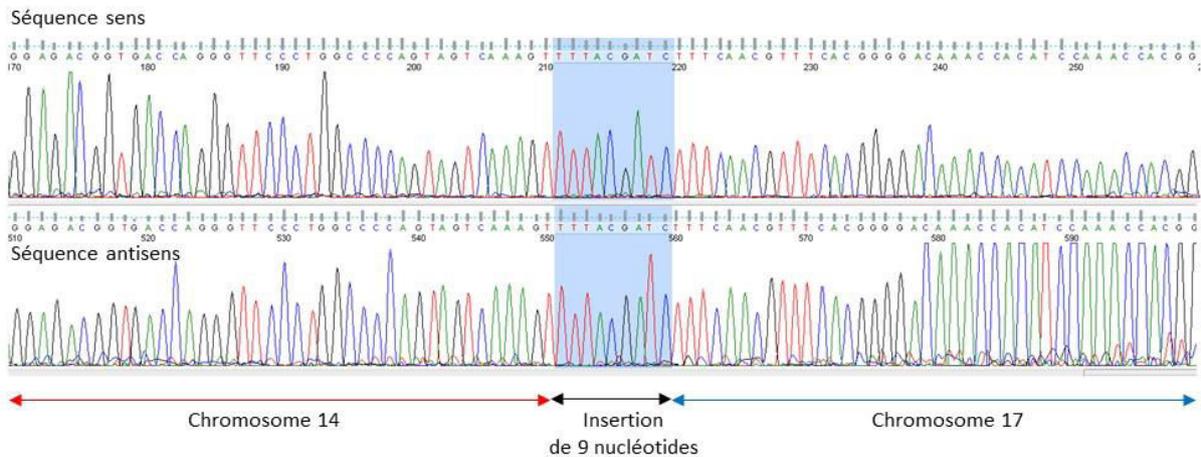


Figure 52 : Résultat du séquençage par technique Sanger du premier point de cassure impliquant IGJ4 et la position 82971132 sur le chromosome 17.

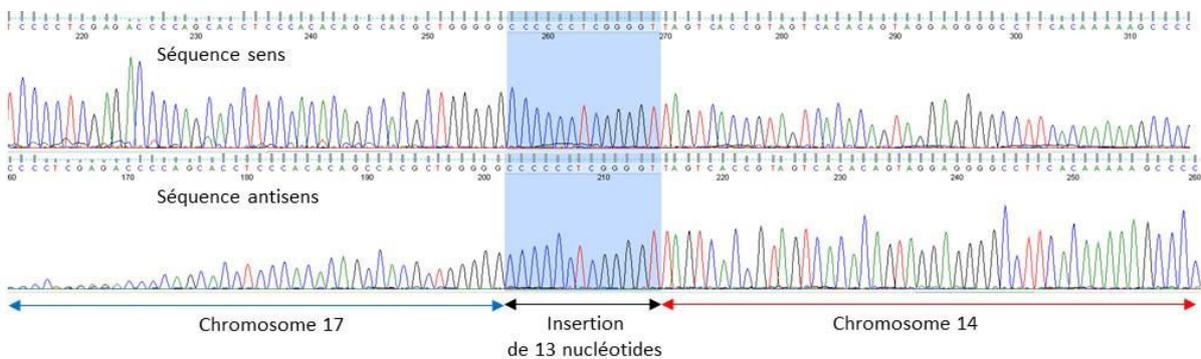


Figure 53 : Résultat du séquençage par Sanger du deuxième point de cassure impliquant IGHD4-17 et la position 82971126 sur le chromosome 17.

Les résultats obtenus en Sanger sont cohérents avec ceux du séquençage du génome entier et confirment l'insertion d'une portion d'*IGH* dans le chromosome 17, avec au niveau des jonctions l'insertion de 9 et 13 nucléotides, associée à une délétion de 6 paires de bases au niveau du chromosome 17. Ceci est compatible avec la CGH-array qui n'identifie pas de délétion au niveau du chromosome 17, celle-ci étant trop petite pour être visualisée par cette technique.



Cependant, le remaniement n'entraînerait pas l'insertion simple du fragment correspondant à la région située entre IGHJ4 et IGHD4-17. En effet les séquences obtenues correspondent à la région allant d'IGHJ4 vers IGHJ6 d'une part (et non IGHJ1), et d'IGHD4-17 vers IGHD3-16 (et non IGHD5-18) (Figure 54).

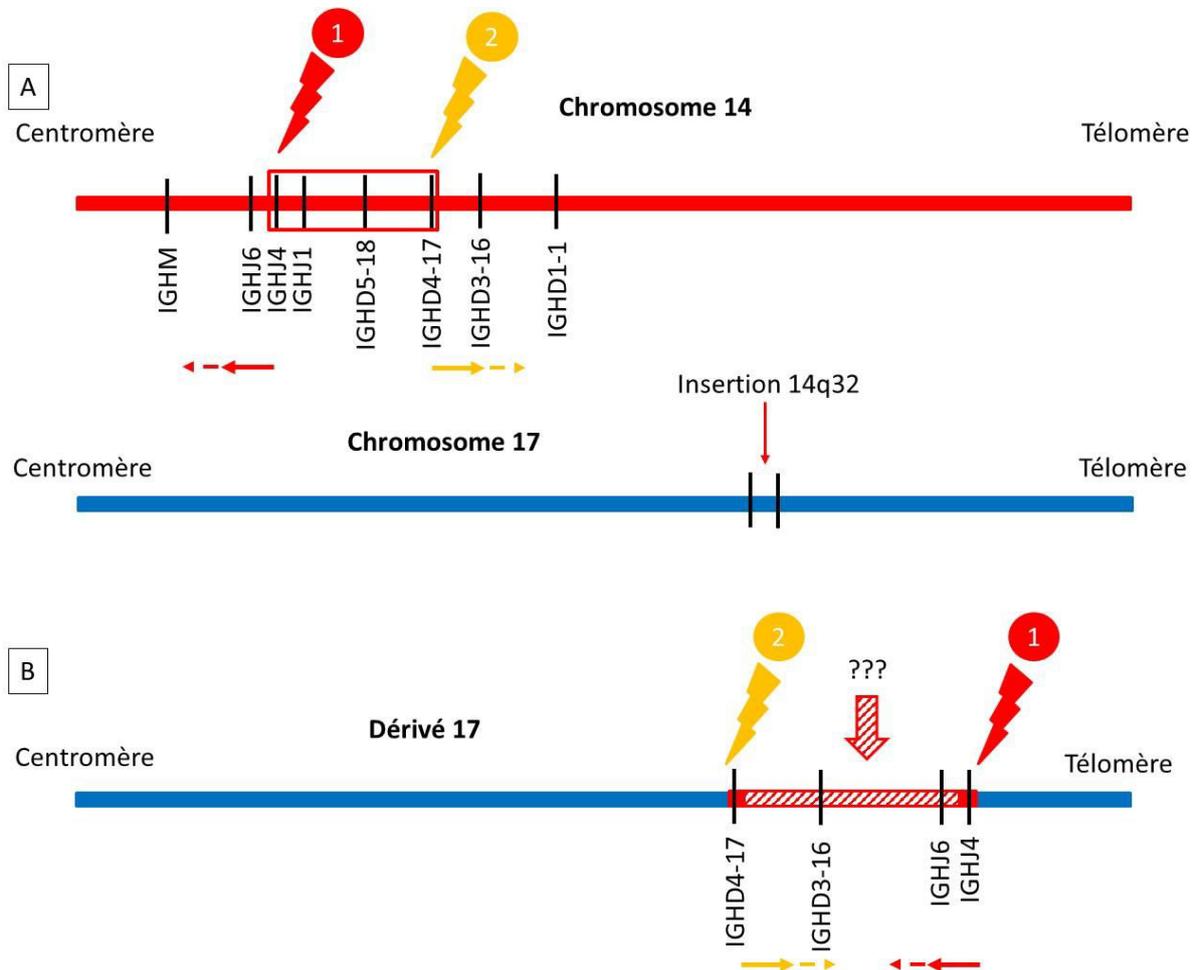


Figure 54 : Schémas représentant le réarrangement identifié chez le patient 1.

En A : la représentation des points de cassure sur les chromosomes 14 et 17 ; en B : le dérivé 17 obtenu avec les jonctions retrouvées par séquençage (flèches rouge et orange pointillées). La flèche rouge hachurée indique la séquence insérée de taille et séquence inconnue.

Ce résultat suggère donc un mécanisme plus complexe d'insertion. Ceci est compatible avec les résultats obtenus avec la FISH IGH (sonde Kreatech, Figure 32) ciblant la région située entre IGHJ4 et IGHD4-17 avec le signal rouge, et dont le résultat indiquait la délocalisation d'un fragment comprenant la région IGHV (signal vert). Ceci est également conforté par la FISH réalisée avec les fosmidés ciblant IGHV (Figure 45).



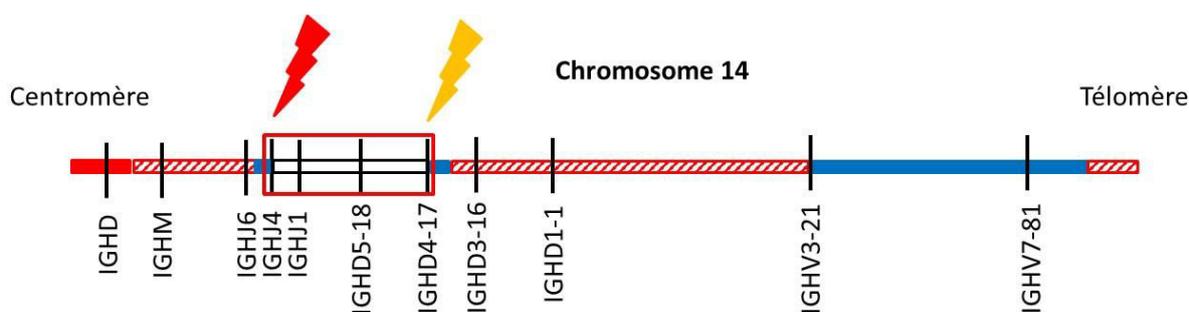


Figure 55 : Schéma récapitulatif des différents résultats obtenus concernant le remaniement entre les chromosomes 14 et 17 chez le patient n°1.

Le schéma représente un chromosome 14, avec en rouge, la partie restant sur le dérivé 14 (confirmation par FISH) ; en rouge hachuré, les régions incertaines sur leur localisation ; en bleu, les régions délocalisées sur le dérivé 17 (résultats obtenus par FISH et séquençage du génome entier) ; en blanc la région déléetée au cours du remaniement.

L'ensemble des résultats obtenus indique donc une insertion d'IGH avec des points de cassure impliquant IGHJ4 et IGHD4-17. Le fragment inséré comprend une grande partie d'IGHV. Le segment entre IGHJ4 et IGHD4-17 semble déléeté au cours du réarrangement.

g- Courte discussion et conclusion

Nous avons utilisé des amorces ciblant IGHJ6 en LM-PCR sans mettre en évidence le remaniement. L'étude du réarrangement montre que seules les enzymes SmaI et StuI coupent l'ADN sur le chromosome 17 après le remaniement et auraient généré des fragments d'environ 3000 et 3400 pb respectivement. Ces enzymes n'avaient pas été testées avec ces amorces dans un premier temps. Ceci a donc été réalisé. Les résultats obtenus ne permettent pas de mettre en évidence le remaniement. L'amplification de fragments de taille située entre 3000 et 4000 pb avait été réalisée dans d'autres tests de LM-PCR et est possible avec cette technique. Il semblerait donc y avoir un remaniement entre IGHJ4 et IGHJ6. L'utilisation d'amorces situées au niveau d'IGHJ4 avec les différentes enzymes de restriction pourrait permettre de tester cette hypothèse. Cependant, avec le problème persistant d'épuisement du matériel biologique, nous allons dans un premier temps privilégier l'analyse plus approfondie des résultats de NGS.

Les résultats obtenus par séquençage du génome entier mettent en évidence deux points de cassure qui pris isolément pourraient suggérer une translocation d'IGH. Les résultats obtenus par FISH permettent d'identifier une insertion complexe.

Etant donnée la localisation des points de cassure identifiés au niveau d'IGH, une implication du complexe de recombinaison VDJ et en particulier des enzymes RAG dans la survenue de cette translocation est fortement probable. Nous avons analysé les séquences en IGHJ4 et



IGHD4-17 : elles mettent en évidence des points de cassure au niveau des RSS (RSS avec espaceur 12 au niveau d'IGHD4-17 et espaceur 23 au niveau d'IGHJ4) (Figure 49). Ceci indiquerait un mécanisme faisant intervenir les enzymes RAG et le mécanisme de recombinaison VDJ dans l'apparition de ce remaniement. De plus, nous retrouvons au niveau des points de cassure l'insertion de nucléotides au hasard, ressemblant à des N-nucléotides.

L'origine du point de cassure au niveau du chromosome 17 est incertaine. Nous avons recherché la présence de RSS cryptique au niveau du chromosome 17 grâce au site RSS database⁶¹³. Celui-ci détecte une séquence pouvant correspondre à un RSS cryptique au niveau du point de cassure. Cependant, le point de cassure se situe à l'intérieur de cette séquence et non à l'extrémité ou à proximité de l'élément mimant l'heptamère (Figure 51). Les enzymes RAG peuvent se lier à l'ADN également via les histones ou encore de façon non spécifique. Leur implication pourrait être étayée par analyse ChIP-Seq (pour Chromatin ImmunoPrecipitation Sequencing) afin de mettre en évidence une fixation des enzymes RAG à ce niveau. Un autre mécanisme responsable d'une cassure double brin au niveau du chromosome 17 est possible. L'implication d'AID pourrait également être mise en cause. Cependant la séquence au niveau du chromosome 17 ne présente pas de motifs type CpG ou WGCW.

L'idéal pour affiner les régions délocalisées serait une analyse par FISH avec marche chromosomique. Cependant, le matériel biologique et en particulier les mitoses analysables disponibles sont à présent faibles. Nous allons réaligner les résultats du séquençage du génome entier sans référence (alignement *de novo*). Ceci risque d'être difficile étant donnée la séquence du gène *IGH* riche en GC et en séquences répétées. De plus, nous allons étudier plus précisément les différents résultats produits par l'analyse MANTA afin de déceler des remaniements au sein du chromosome 14. Une meilleure connaissance du fragment inséré nous permettra d'avancer dans l'interprétation du mécanisme de survenue du réarrangement.

Une hypothèse est qu'il s'agit d'un processus en plusieurs étapes avec une première translocation entre les chromosomes 14 et 17 au cours du réarrangement D_HJ_H avec les points de cassure identifiés par séquençage du génome entier puis un deuxième événement avec nouvelles cassures en 3' d'IGHJ4 sur le dérivé 14 et en aval d'IGHV sur le dérivé 17 (Figure 56).



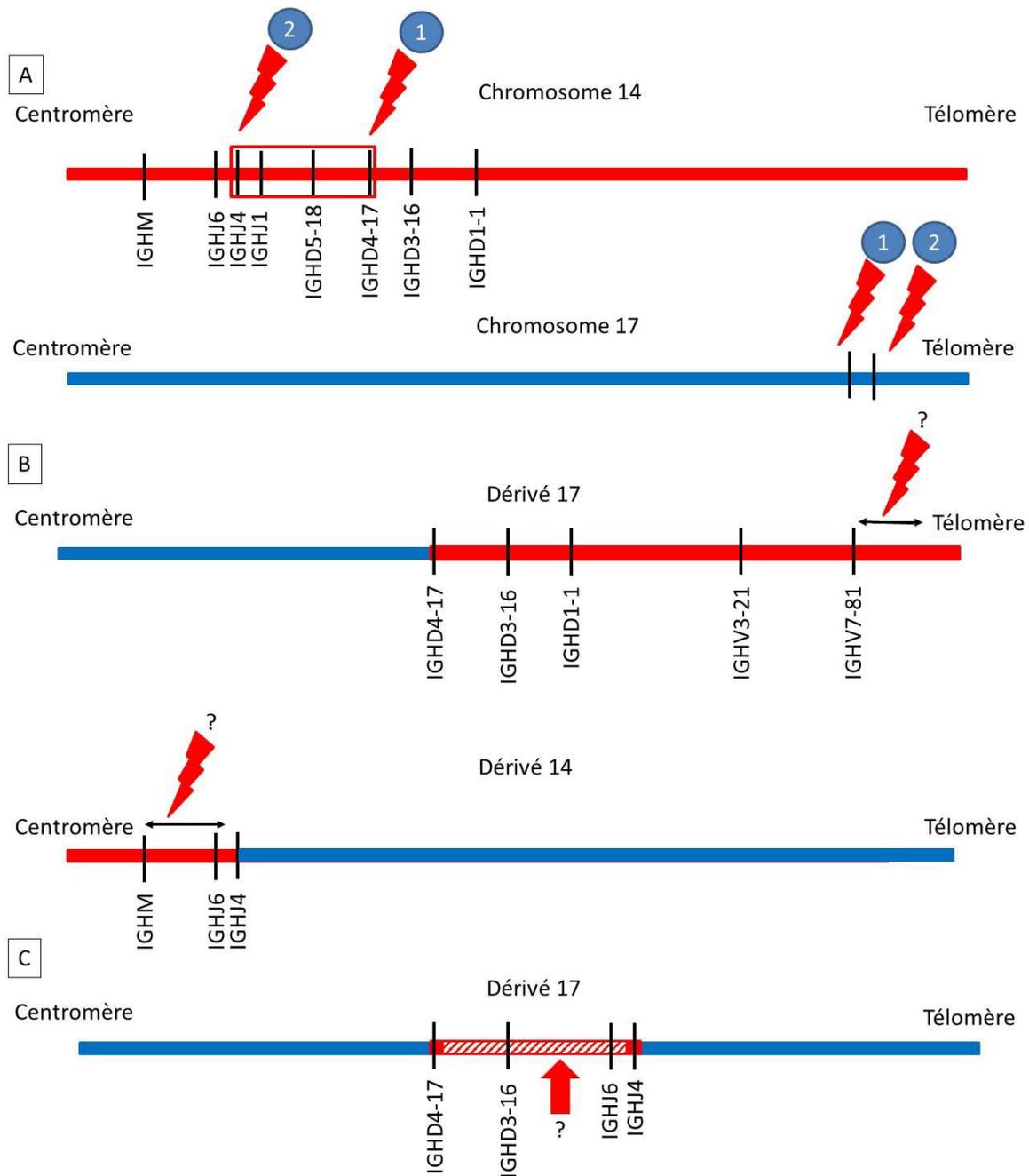


Figure 56 : Schéma de l'hypothèse en deux étapes pour le remaniement observé chez le patient n°1.
A- Points de cassure identifiés par séquençage du génome entier (éclairs rouges) au niveau des chromosomes 14 et 17.

B- Schéma de la translocation générée au cours d'une première étape selon les points de cassure identifiés par séquençage du génome entier. Les éclairs rouges indiquent les probables régions touchées au cours d'une deuxième étape par de nouvelles cassures double brin pouvant aboutir au remaniement complexe sur la base des données de FISH.

C- Schéma de l'insertion complexe obtenue au niveau du dérivé 17. La région hachurée en rouge correspond à la portion de chromosome 14 insérée de taille et séquence inconnues.



Une autre hypothèse est la génération de cassures sur le chromosome 14 avec circularisation du fragment généré, puis réouverture lors du réarrangement D_{HJH} et insertion dans le chromosome 17.

Un phénomène de chromothripsis peut également être en cause. Il s'agit d'un phénomène limité dans le temps, au cours duquel de nombreuses cassures (de 10 à des milliers) apparaissent de façon localisée sur un chromosome ou un bras de chromosome. Cette hypothèse semble moins plausible étant donné les points de cassures observés au niveau de RSS sur le chromosome 14, et non au hasard.

Par ailleurs, nous ne connaissons pas la région d'IGH exacte insérée dans le chromosome 17. En particulier, nous ne savons pas si l'enhancer E_{μ} est emporté, pouvant alors entraîner une surexpression du gène *B3GNTL1*. En l'absence de délocalisation de l'enhancer E_{μ} , on peut imaginer une disruption du gène entraînant une perte d'expression. Il existe des promoteurs en amont et en aval du point de cassure : la translocation, si elle implique un enhancer d'*IGH* (en particulier E_{μ}), est susceptible d'entraîner une dérégulation de l'expression du gène. La vérification de l'impact sur l'expression du gène sera faite par séquençage haut débit des ARN (RNA-Seq). Ceci nous permettra d'étudier une éventuelle dérégulation de ce gène et des autres situés à proximité.

Le gène *B3GNTL1* code une protéine impliquée dans la glycosylation et exprimée à différents niveaux de façon ubiquitaire. Des translocations impliquant ce gène ont été rapportées dans des cancers solides avec des partenaires situés sur les chromosomes 1, 3, 17 et X^{615,616}. Ces données sont en faveur de l'hypothèse d'un rôle oncogénique de la translocation retrouvée chez ce patient.



2- Patient 2

a- Résultats préliminaires

La deuxième patiente a bénéficié d'un bilan complet en 2011. Le caryotype alors réalisé montre une translocation entre les bras longs des chromosomes 17 et 22 (Figure 57). Il s'agit de la seule anomalie mise en évidence au caryotype.

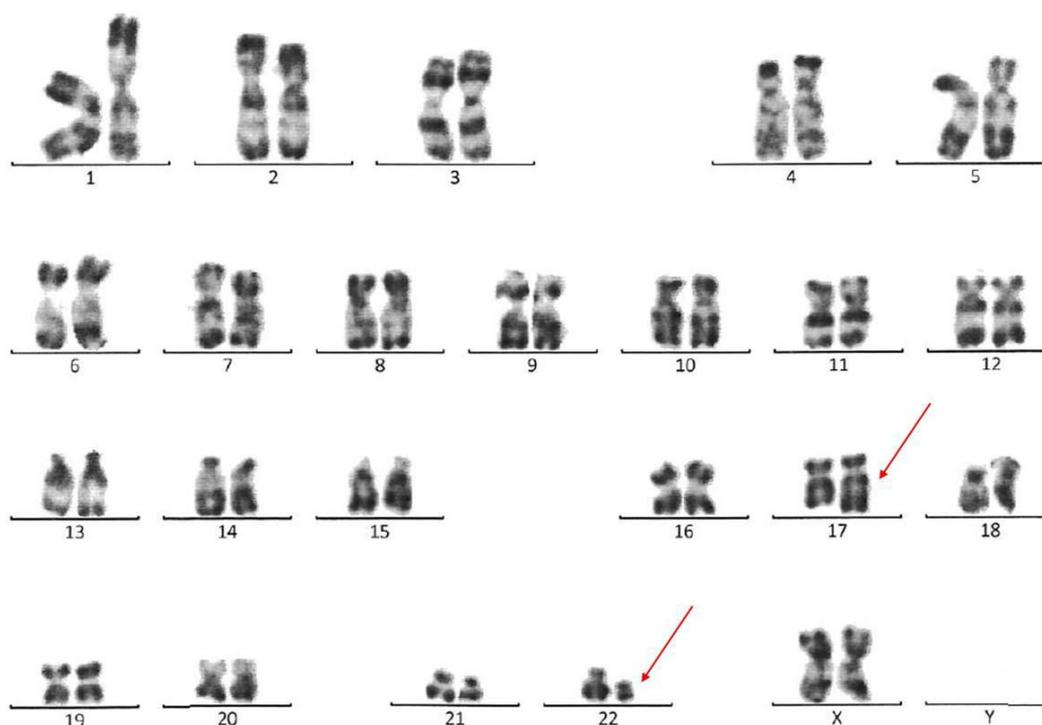


Figure 57 : Caryotype de la patiente n°2
Celui-ci met en évidence une translocation entre les bras longs des chromosomes 17 et 22.

La formule chromosomique était alors la suivante : $46,XX,t(17;22)(q25;q11)[19]/46,XX[1]$.

Le caryotype réalisé en 2016 montre la persistance de cette anomalie isolée. La formule chromosomique rendue était : $46,XX,t(17;22)(q25;q11)[15]$.

Devant la présence de l'implication du locus 22q11, une FISH pour IGL a été réalisée et montre un remaniement du gène (Figure 58). En particulier, on observe une délocalisation du signal rouge ciblant la région IGLC sur le chromosome 17.



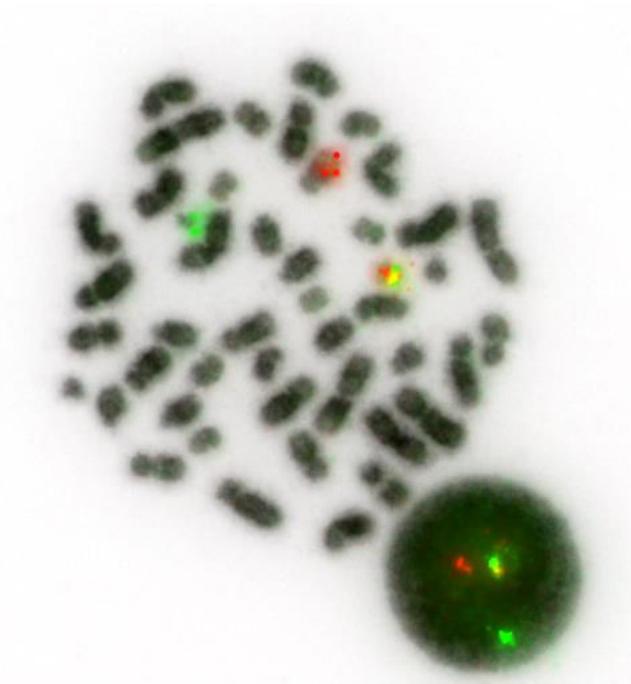


Figure 58 : Image de FISH avec la sonde IGL Dako concernant la patiente numéro 2. On observe une mitose avec un signal de fusion sur le chromosome 22 non remanié, un signal vert sur le dérivé 22 et un signal rouge sur le dérivé 17. On observe également un noyau dans lequel un remaniement d'IGL est mis en évidence (séparation du signal).

b- Résultats moléculaires

Les points de cassure rapportés dans les translocations impliquant *IGL* sont situés au niveau des régions de jonction et constantes^{617,618}. Nous avons mis au point des amorces pour réalisation de LM-PCR au niveau des régions IGLJ-C 1 à 5. Les différentes expériences menées n'ont pas permis de mettre en évidence le remaniement.

Un séquençage du génome entier a été réalisé et a permis de mettre en évidence les points de cassure suivants :

- chromosome 17, position 83175424 (gène AC139099.4) (Figure 59)
- chromosome 22, position 22850521 (au niveau d'IGLV3-6) (Figure 60)



TCATCATTTACAAGCCTCCTCTCTGTCCTCTTTGCAAGCTCCTATGAGCTTACACAGCCACCCTCAGT
 GTCAGTGTACCAAGGACAGGCAGCCATGATCACCTGCTCTTGAGATAACCTCAAAGATGAGTATGTT
 TACTGGTTCTGGCAGAAGCCAGACCAGGCCATACTGGTATATATGAAGGCAACAAGAGTGATAG
 AACTGAGCCCCAGGTTGTGCTCGGAGTCTCCTGGTGCCAGAACACTGGGCTTCCGTGGGACCTGAG
 GGGCTGAAACGGTGTGCTGGACCTGGACCCTTCTCACAGTCACCCTCAGGTAGCCCATCTCAGACAGG
 AGGGGACCCCTTGTCCCCATGTTTGGAGCGTGTGAGCTGCACACAGTCCTCCCTGGGTCTGAGAC
 CGCTGGTCTGCCCCACCCAGCTCTCTCCCTCTGG

avec en rouge la séquence issue du chromosome 22 et en bleu la séquence issue du chromosome 17. Le nucléotide A en gras souligné correspond à une mutation (G>A).

La séquence dérivée du chromosome 17 est la suivante :

CGAACGACTCGGCAGGCTCCAGAGTTTGGCTCATTTTCTGCTTGGTCCCTTTTTGATGCCTGTGATTTA
 TTTATAACAATAGTTTGCCTAATTCCAGATGTGGTGACACAGCCTGCAGACGCTGAGTGAATGAAG
 ACAGACCAGATTTTTCAGAGGGGTAGTGGTGTGGAGCAGGCTGGCCGCCAGGAATTTCTGATTTTC
 TGAGTCCAGCTCAGGGAACATGGCCA

avec en bleu la séquence issue du chromosome 17, et en rouge la séquence issue du chromosome 22. Les nucléotides soulignés et en gras correspondent à une homologie de séquence au niveau du point de cassure.

Ces résultats ont été confirmés par séquençage Sanger.

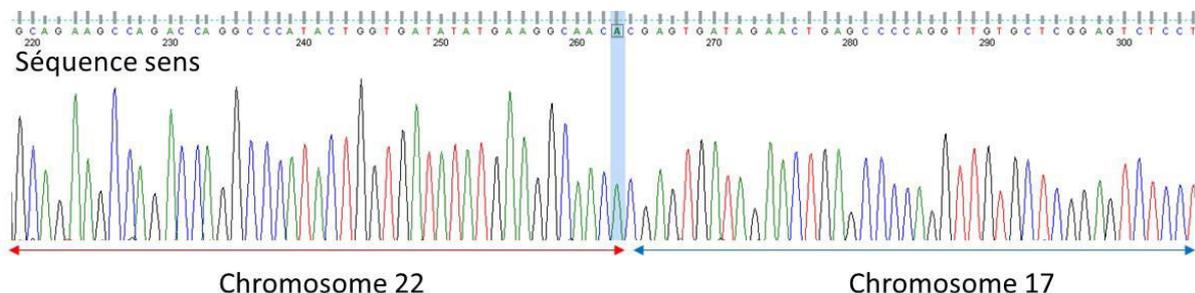


Figure 61 : Séquence sens obtenue par séquençage Sanger confirmant la jonction du der(22)t(22 ;17).

Concernant le dérivé 22, seule la séquence sens est lisible. La séquence antisens s'éteint après un poly-G. Une autre amorce située après cette région devrait permettre d'obtenir un résultat correct.

Le dérivé 17 n'a pas été mis en évidence. L'amorce utilisée au niveau du chromosome 22 semble trop éloignée du point de cassure. Nous allons mettre au point de nouvelles amorces plus proches afin de confirmer le dérivé 17.



Ce remaniement entraîne donc une délocalisation de l'enhancer 3'Eλ sur le dérivé 17 (Figure 62).

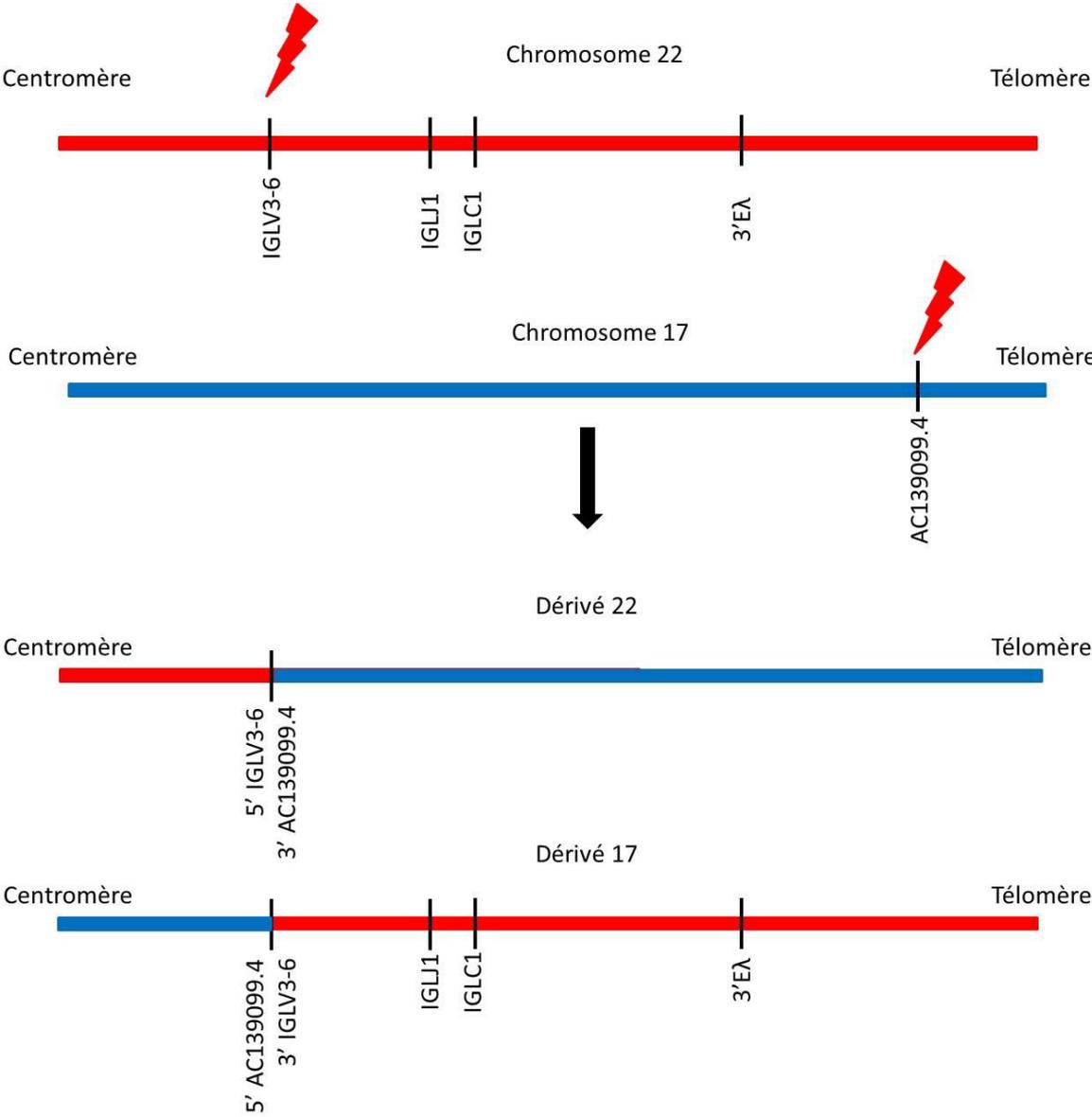


Figure 62 : Schéma représentant la translocation entre les bras longs des chromosomes 17 et 22 mise en évidence chez la patiente n°2.



c- Courte discussion

Le point de cassure au niveau du chromosome 22 est situé au niveau des régions variables à l'intérieur d'IGLV3-6. Il s'agit d'un gène non fonctionnel²³. Étant donnée la localisation au niveau des régions variables d'IGL, un mécanisme médié par RAG, au cours de la recombinaison VJ de la chaîne légère, peut être évoqué. Cependant, le point de cassure se situe à l'intérieur du gène IGLV3-6 et un peu à distance du RSS (133 pb).

En parallèle, la recherche de RSS cryptique au niveau du chromosome 17 a été réalisée à l'aide du site RSS Database et montre la présence de séquences pouvant correspondre à de potentiels RSS cryptiques à proximité du site de cassure. La première région retrouvée peut correspondre à un RSS avec espaceur 12 (CACAGCATGCAGACGCTGAGTGAAATGA), située 51 pb en amont du point de cassure, ou à un RSS avec espaceur 23 (CACAGCATGCAGACGCTGAGTGAAATGAAGACAGAACAG) situé alors à 40 pb en amont du point de cassure. Son orientation ne semble pas compatible avec un réarrangement médié par RAG. Un autre RSS cryptique avec espaceur 23 est identifié 109 paires de bases en aval du point de cassure (CACAGTCACCCTCAGGTAGCCCATCTCAGACAGGAGGGG) avec une orientation compatible avec la translocation. Cependant, leur localisation semble trop éloignée du point de cassure pour être mise en cause. Certains auteurs ne les considèrent que si une séquence mimant un heptamère (CACNNNN) est présente dans les 5 nucléotides à proximité du point de cassure⁶¹⁹. D'autres ont pris en compte les 20 nucléotides adjacents⁶²⁰. Une dernière étude a pris un seuil à 21 paires de bases⁶²¹.

En revanche, le point de cassure au niveau du chromosome 17 est situé au niveau d'un motif CGCG. Ceci suggère un rôle d'AID au cours de l'hypermutation somatique. L'analyse de la séquence en amont du point de cassure dans la région IGL révèle la mutation d'un nucléotide dans 3 séquences sur 4, y compris dans des séquences non impliquées dans le remaniement entre les chromosomes 17 et 22. Il peut s'agir d'une mutation dans le cadre de l'hypermutation somatique.

Dans ce cas, un rôle d'AID dans le mécanisme de survenue de cette translocation au cours de l'hypermutation somatique est privilégié.

Concernant le gène partenaire, il s'agit d'*AC139099.4*. Le point de cassure est situé au niveau de l'intron 2 qui est le plus long, le gène étant constitué de 3 exons. Il est répertorié dans NCBI gene sous le nom LOC101929650. Il s'agit d'un lncRNA. Il est répertorié dans la base de données LNCipedia sous le nom lnc-METRNL-2:1 ou LNC-TSPAN10-103:2¹¹¹. Le transcrit fait 641 pb. Ce gène est situé 80 kb en aval du gène *METRNL* (pour Meteorin-like, glial cell differentiation regulator), qui est impliqué dans l'adipogénèse⁶²².

Le point de cassure au niveau du chromosome 17 est situé dans ce cas environ 200 kb en aval du point de cassure mis en évidence chez le patient n°1. Il se peut qu'une cible commune soit en cause. Nous prévoyons de réaliser du RNA-Seq pour étudier l'expression des gènes situés dans cette région, dont *B3GNTL1*, *AC139099.4* et *METRNL*.



3- Patient 3

a- Résultats préliminaires

Concernant le cas de la troisième patiente, la cytogénétique réalisée en 2012 puis en 2016 sur sang avec stimulation par IL2/DSP30 met en évidence un caryotype complexe comprenant notamment une translocation entre les chromosomes 8 et 14 (Figure 63). Les FISH réalisées montrent une implication d'*IGH* (Figure 64), sans réarrangement de *MYC*. Il met également en évidence une translocation entre les chromosomes 15 et 22 n'impliquant pas *IGL* (Figure 65) et une délétion du bras long du chromosome 11. C'est donc la t(8;14) qui nous intéresse car elle implique un gène des immunoglobulines et un partenaire inconnu en 8q24.

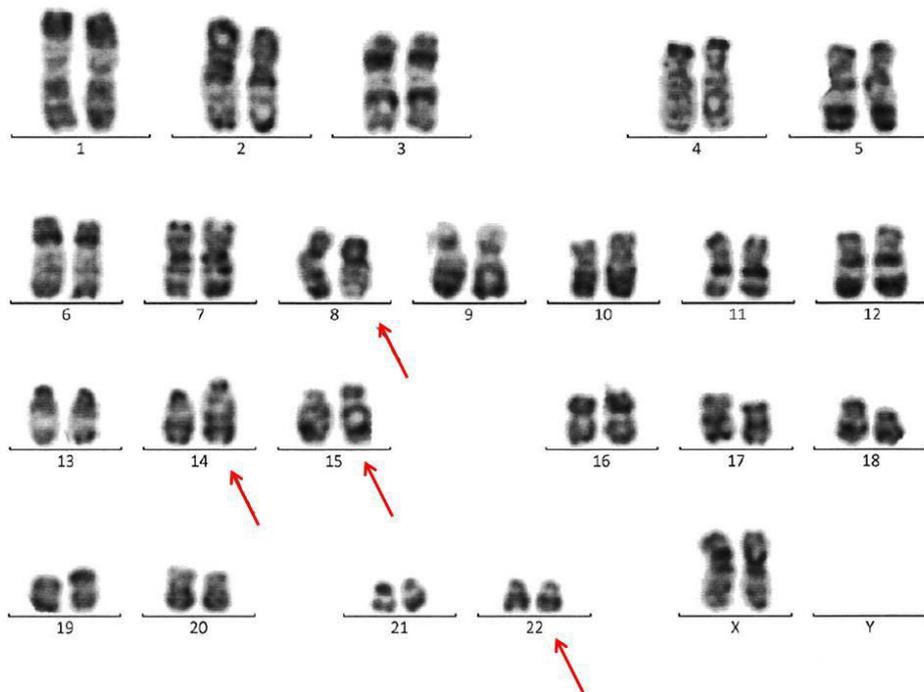


Figure 63 : Caryotype du patient n°3.

On observe la translocation entre les bras longs des chromosomes 8 et 14 d'une part et entre le bras court du chromosome 15 et le bras long du chromosome 22 d'autre part.



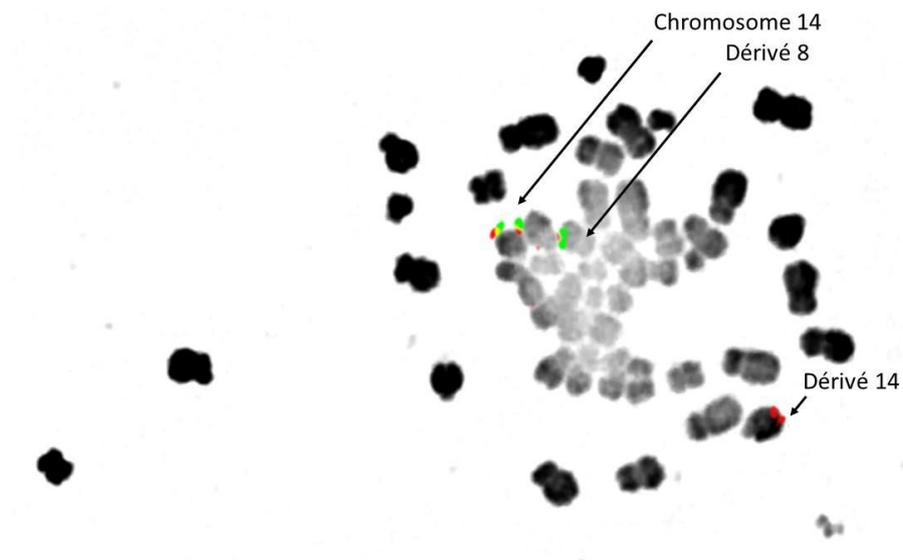


Figure 64 : Image de FISH métaphasique avec la sonde IGH Kreatech. On observe une fusion sur le chromosome 14 normal, une fusion avec un signal rouge semblant diminué sur le dérivé 8 et un signal rouge sur le dérivé 14.

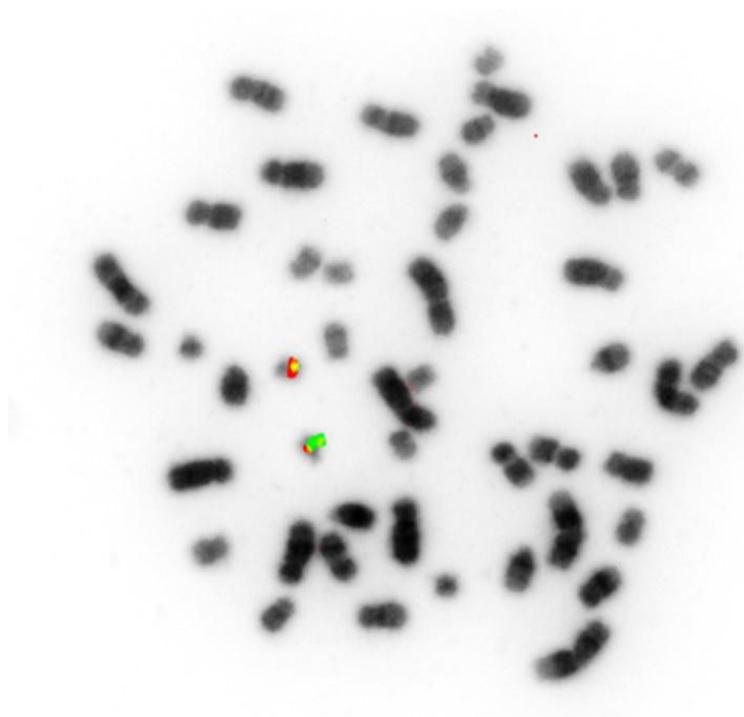


Figure 65 : Image de FISH métaphasique avec la sonde IGL Dako. On observe deux signaux de fusion situés sur les chromosomes 22.



La FISH du locus MYC avait été réalisée avec la sonde DAKO en 2012. Les images obtenues sur mitoses étaient de mauvaise qualité. Une seule mitose normale avait été vue. Les résultats de FISH interphasique montrent l'absence de séparation du signal, mais une amplification du locus avec 3 signaux de fusion est mise en évidence dans 13,5 % des noyaux analysés, compatible avec la présence d'un isochromosome 8q sous-clonal.

La formule cytogénétique rendue en 2012 est la suivante :

46,XX,del(11)(q14)[6]/46,XX,i(8)(q10),t(15;22)(p13;q12)[4]/46,XX,t(8;14)(q24;q32),t(15;22)(p13;q12)[9]/46,XX[1]

.ish t(8;14)(CMYC+,IGHdim;CMYC-,3'IGH+)[1]

.nuc ish(CMYCx3)[54/400],(IGHx2)(3'IGHsepIGHdimx1)[13/139],(D17Z1,P53)x2[150],(IGLx2)[238]

En 2016, le caryotype rendu était le suivant :

46,XX,t(8;14)(q24;q32),t(15;22)(p13;q12)[13]/46,sl,del(11)(q21q24)[7].ish 17p13(P53x2),17p11.1-q11.1(D17Z1x2)[20].nuc ish(P53,D17Z1)x2[206]

On observe en 2016 une augmentation de la proportion du clone comprenant la t(8;14) par rapport à 2012, probablement sélectionnée après traitement.

b- Résultats complémentaires

Le résultat de la FISH avec la sonde IGH de chez Kreatech montre une délocalisation du signal vert et d'une partie du signal rouge sur le chromosome 8. Ceci indique une région de cassure au niveau soit des régions constantes, soit des régions de jonction. Le plus probable, étant donnée la configuration de la sonde, est une cassure dans les régions constantes car le signal rouge en cas de cassure dans la zone de jonction semble assez faible pour pouvoir être visualisé. Dans cette hypothèse, nous avons réalisé de la FISH avec trois fosmidés ciblant les régions constantes les plus en amont du gène (côté télomérique) en aval d'IGHM : G248P85777C9, G248P8983A5 et G248P82502G1 initialement marqués tous les trois en Aqua (Figure 66).



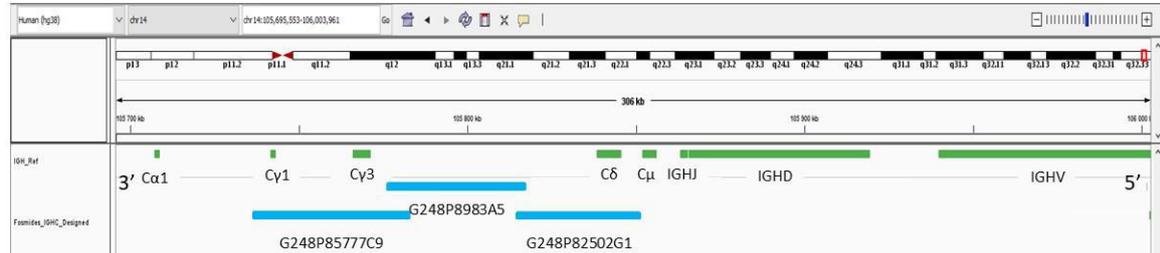
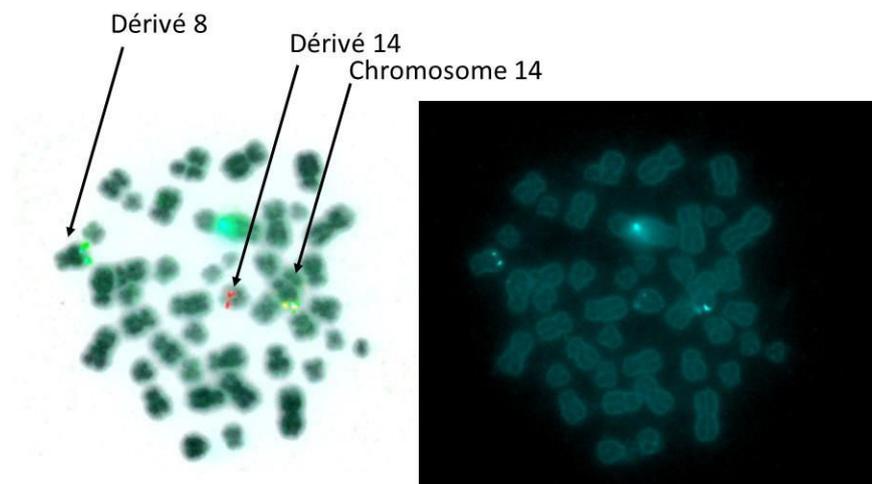
A**B**

Figure 66 : Image de FISH métaphasique avec les fosmides G248P85777C9, G248P8983A5 et G248P82502G1 marqués tous les trois en Aqua, ainsi que la sonde IGH Vysis.

A- Représentation schématique à partir du logiciel IGV du locus IGH (en vert) et des fosmides ciblant les régions constantes d'IGH (en bleu).

B- Trois signaux Aqua sont visibles : ils marquent le chromosome 14 normal et les dérivés 8 et 14. Le dérivé 8 semble être marqué plus fortement. La sonde IGH Vysis permet de visualiser une fusion sur le chromosome 14 normal, un signal rouge sur le dérivé 14 et un signal vert sur le dérivé 8.

Le résultat montre une séparation du signal Aqua avec un marquage résiduel sur le dérivé 14 faible et une délocalisation sur le dérivé 8 semblant plus marqué (Figure 66). Ceci semble indiquer un point de cassure au niveau des fosmides G248P85777C9 ou G248P8983A5. Pour aller plus loin, une deuxième FISH a été réalisée avec ces deux fosmides marqués respectivement en rouge et vert (Figure 67). Le résultat montre deux signaux de fusion marquant le chromosome 14 normal et le dérivé 8. Un signal rouge résiduel est retrouvé sur le dérivé 14. Ceci prouve une région de cassure située au niveau du fosmide G248P85777C9 ciblant les régions IGHG1 et IGHG3.



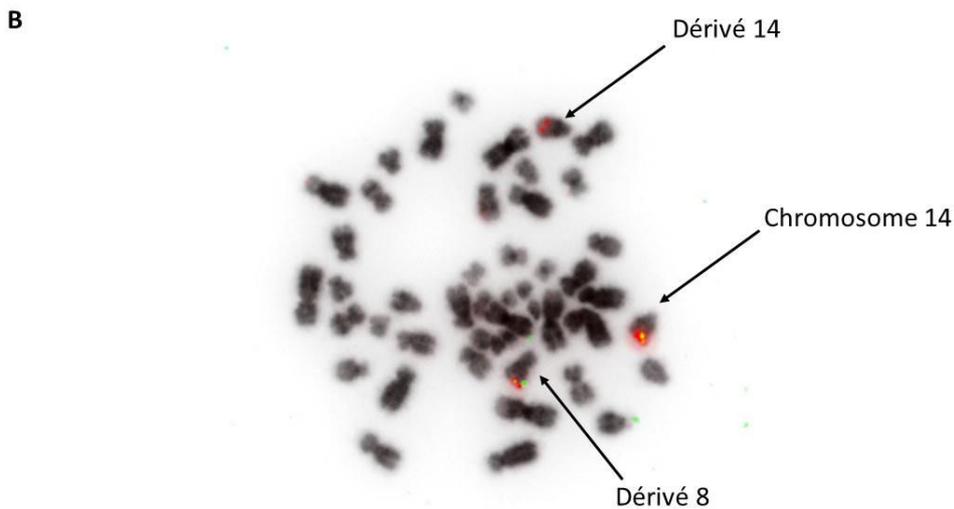
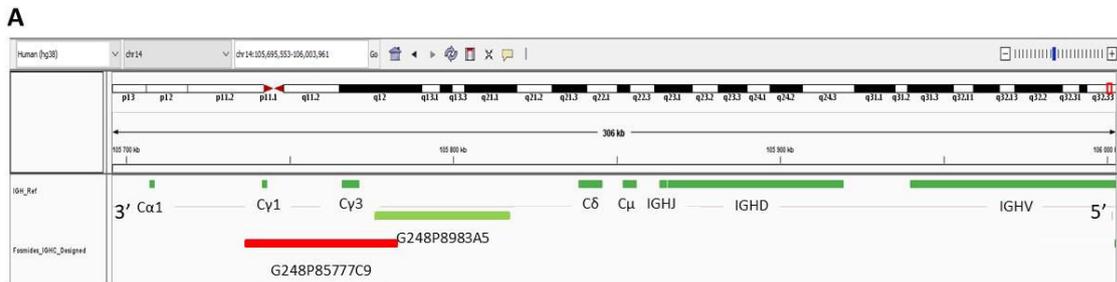


Figure 67 : Image de FISH métaphasique avec les fosmides G248P85777C9, G248P8983A5 marqués respectivement en rouge et vert.

A- Représentation schématique à partir du logiciel IGV du locus IGH (en vert) et des fosmides ciblant les régions constantes d'IGH : G248P85777C9, G248P8983A5 marqués respectivement en rouge et vert.

B- Deux fusions sont observables : l'une sur le chromosome 14 normal et l'autre sur le dérivé 8. Un signal rouge résiduel marque le dérivé 14.

Des expériences de LM-PCR ont alors été mises en œuvre avec des amorces ciblant IGHG1 et n'ayant pas permis de mettre en évidence le remaniement.

Une approche par séquençage du génome entier a alors été décidée. Celle-ci a permis de mettre en évidence le remaniement entre les chromosomes 8 et 14 avec les points de cassure suivants :

- Chromosome 14, position 105647500 (Figure 68)
- Chromosome 8, position 127196845 (Figure 69)



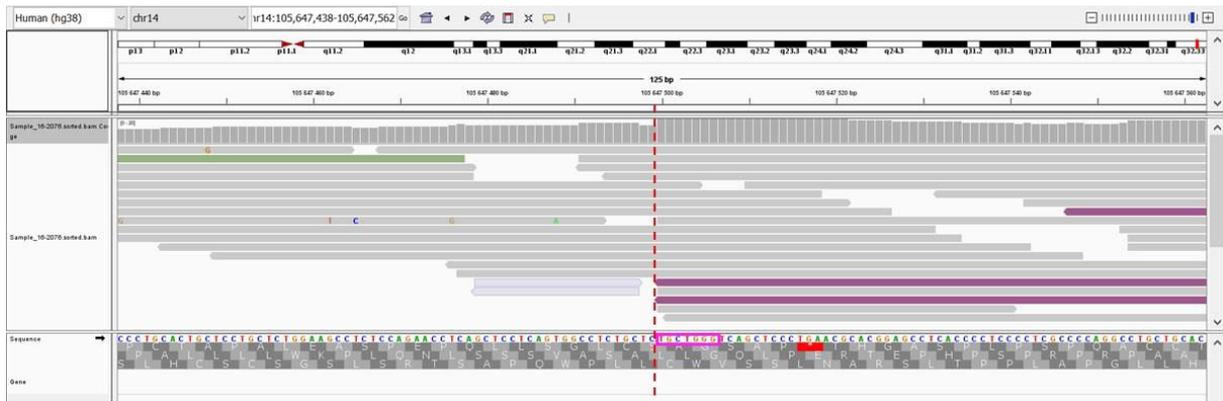


Figure 68 : Visualisation à partir du logiciel IGV des séquences obtenues par séquençage du génome entier au niveau du chromosome 14, position 105647500 concernant la patiente n°3. Les alignements colorés en gris correspondent aux séquences germinales. Ceux en violet représentent les séquences dont le début est aligné sur le chromosome 14 et la fin est située sur le chromosome 8. Le trait rouge représente le point de cassure identifié au niveau d'*IGH*. Il est situé 2711 pb en amont d'*IGHG2*. Une séquence de 7 nucléotides est commune aux deux chromosomes au niveau de la jonction des points de cassure et est encadrée ici en rose.

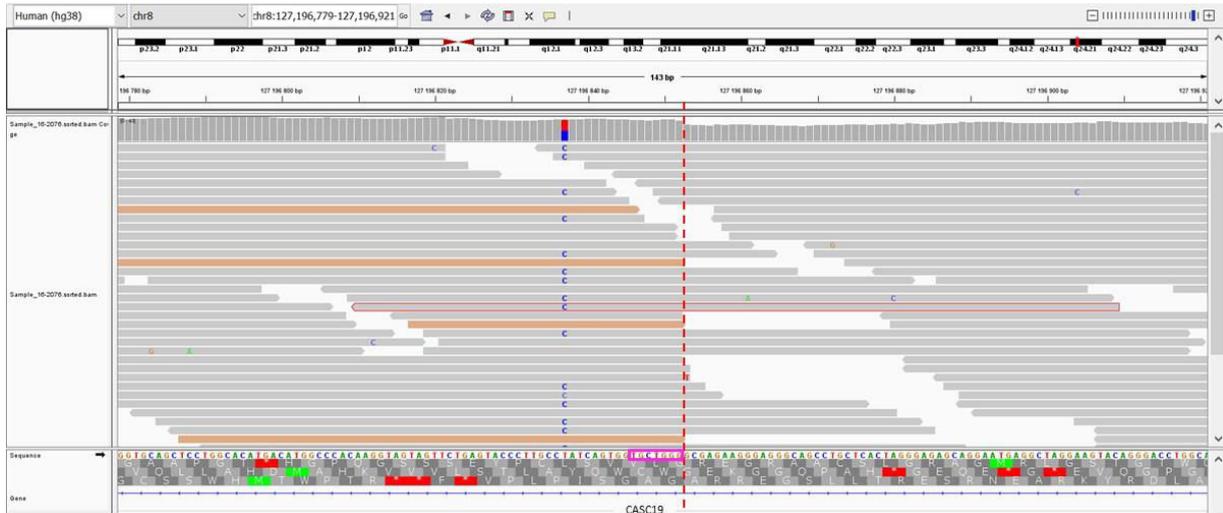


Figure 69 : Visualisation à partir du logiciel IGV des séquences obtenues par séquençage du génome entier au niveau du chromosome 8, position 127196845. Les alignements colorés en gris correspondent aux séquences germinales. Ceux en orange représentent les séquences pour lesquelles le début est aligné sur le chromosome 8 et la fin sur le chromosome 14. Le trait rouge représente la fin de lecture des séquences correspondant au remaniement au niveau du chromosome 8. Une séquence de 7 nucléotides est commune aux deux chromosomes au niveau de la jonction des points de cassure et est encadrée ici en rose. Le remaniement touche le gène *CASC19* au niveau du chromosome 8.



A partir de ces résultats, nous avons récupéré les séquences concernées. La séquence identifiée concernant le der(8)t(8;14) est la suivante :

ATTAAAGTCCTGGGTGCAGCTCCTGGCACATGACATGGCCCACAAGGTAGTAGTTCTGAGTACCCTT
 GCCTATCAGTGGT**GCTGGGTCAGCTCCCTGAACGCACGGAGCCTCACCCCTCCCCTGCCCCAGGCCT**
GCTGCACTCTGGGCCTTTCTGGGCCTCCCTGGACTCTCCCTCCTCCCATCTGTGCACTCAGCACAGCT
CTCCCCTCCACTCCGCTGCTGA

avec en bleu la séquence issue du chromosome 8, en vert une séquence de transition commune aux deux chromosomes et en rouge la séquence issue du chromosome 14.

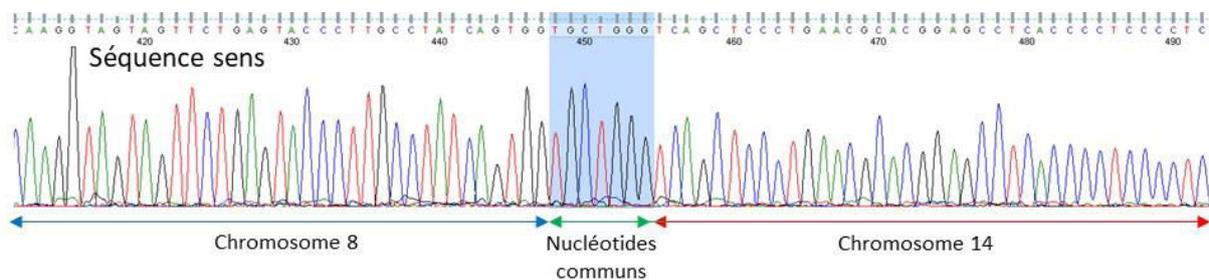


Figure 70 : Séquence sens obtenue par séquençage Sanger pour le der(8)t(8;14).

Ce résultat a été confirmé par séquençage Sanger. Seule la séquence sens est exploitable. En antisens, la présence d'une région répétée (CCCCTCCCCT) entraîne un arrêt prématuré de la séquence.

Ce point de cassure ne permet de mettre en évidence que le dérivé 8. La vérification par séquence du dérivé 14 issu des mêmes points de cassure ne permet pas d'amplification.

c- Courte discussion

Les résultats ont permis de mettre en évidence les points de cassure concernant la translocation entre les chromosomes 8 et 14. Le segment IGH impliqué est IGHG2 d'après le séquençage du génome entier. Ce résultat est discordant avec le résultat obtenu par FISH qui indiquait un point de cassure au niveau d'*IGHG3*. Il se peut, étant donnée la grande similarité entre ces régions, qu'il y ait une hybridation non spécifique de la sonde de FISH (fosmide).

Le point de cassure au niveau du chromosome 8 se situe dans le gène *CASC19* (pour Cancer Susceptibility 19), environ 538 kb en amont du gène *MYC*. La FISH réalisée avec la sonde *MYC* Dako aurait donc dû montrer une délocalisation du signal entier sur le chromosome 14.



Cependant, une seule mitose exploitable avait été visualisée et était normale. Il se peut que cette mitose n'ait pas été porteuse de la translocation. Les résultats de FISH interphasique sont compatibles avec le point de cassure retrouvé, n'entraînant pas de séparation du signal. Les résultats n'avaient pas été photographiés en 2012 et n'ont pas été reproduits avec la sonde DAKO. La sonde actuellement utilisée au laboratoire pour le locus MYC est la sonde Metasystem (Figure 36). Elle montre une séparation du signal (Figure 71). Cette sonde est constituée de 2 signaux vert et rouge plus espacés que la sonde DAKO et permet la détection d'un plus grand nombre de remaniement impliquant le locus 8q24, mais certains peuvent ne pas impliquer *MYC*, comme dans notre cas. C'est le cas par exemple des translocations impliquant *PVT1* (pour Plasmocytoma Variant Translocation gene 1), situé environ 52 kb en aval de *MYC*, et décrit dans des translocations variantes dans le lymphome de Burkitt⁶²³.



Figure 71 : Image de FISH métaphasique avec la sonde MYC Metasystem pour la patiente n°3. On observe une fusion sur un chromosome 8 normal, un signal rouge sur le dérivé 8 et un signal vert sur le dérivé 14.

Par séquençage du génome entier, nous n'avons pu mettre en évidence que le dérivé 8. Le dérivé 14 n'a pu être visualisé. Le dérivé 8 obtenu permet la délocalisation d'éléments régulateurs issus d'*IGH* : la 3'RR1 et E μ (Figure 72). Ceci peut donc être à l'origine de la dérégulation de potentiels oncogènes au niveau du dérivé 8.



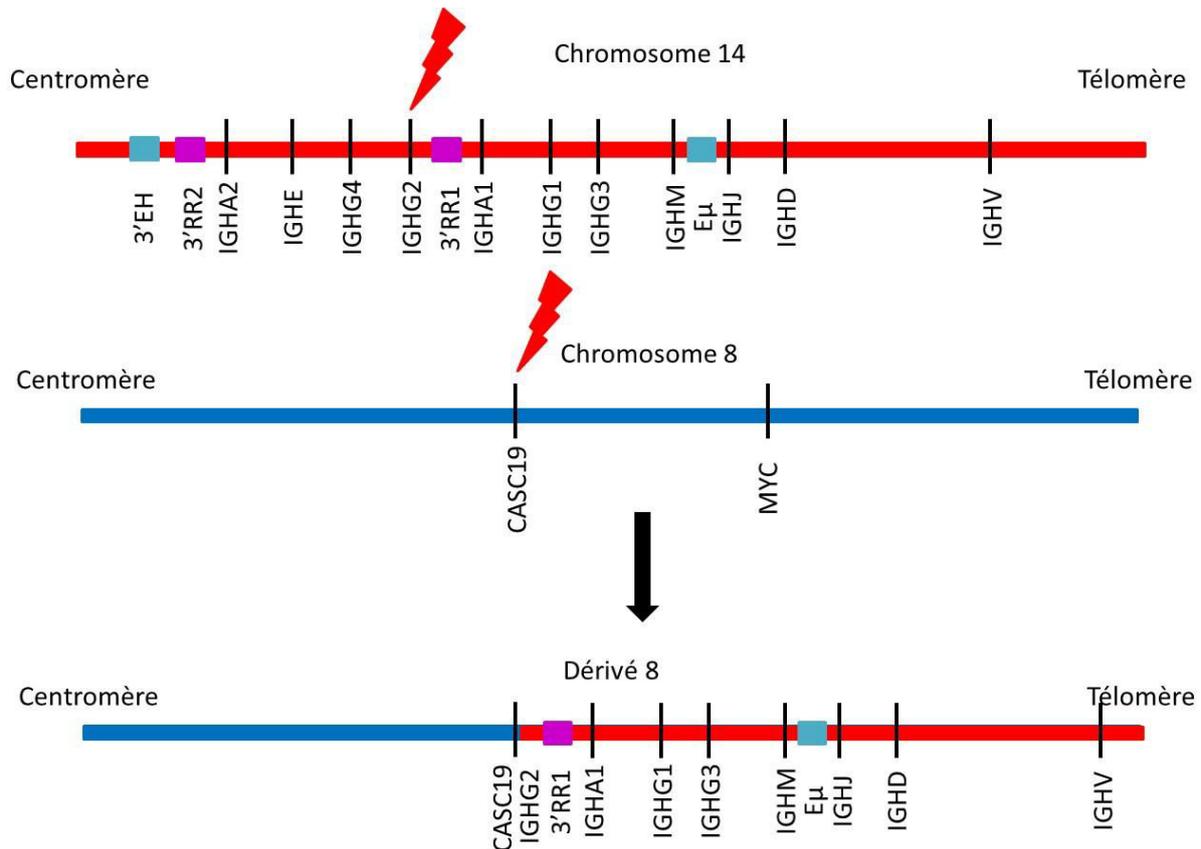


Figure 72 : Schéma représentant la translocation entre les bras long des chromosomes 8 et 14, ainsi que le dérivé 8 obtenu pour la patiente n°3. Les éléments régulateurs, enhancers et 3'RR, sont représentés en carrés bleus et violets respectivement.

Le dérivé 14, bien que non identifié, est également susceptible d'entraîner la dérégulation d'oncogènes via la 3'RR2 et 3'EH. Une analyse plus approfondie des résultats obtenus par séquençage du génome entier est susceptible de permettre d'identifier le dérivé 14. Nous allons également réaliser de la FISH à façon en ciblant *CASC19* afin de visualiser le réarrangement et éventuellement de voir si le dérivé 14 contient une partie de ce gène. Enfin, une analyse par RNA-Seq est prévue afin d'étudier les éventuelles dérégulations d'expression génique au niveau de la région 8q24.

Le mécanisme de survenue de la translocation est très probablement médié par AID au cours de la recombinaison de classe. En effet, le point de cassure au niveau du chromosome 14 touche la région switch IGHG2.

Concernant *CASC19*, il s'agit d'un lncRNA. Le point de cassure est situé au niveau de l'intron 1 (le plus long), le gène étant constitué de 3 exons. Une hyperexpression de ce gène a été décrite dans le cancer colorectal^{624,625}. Des essais *in vitro* montrent que son extinction entraîne une



inhibition de la migration cellulaire⁶²⁴. De plus, son expression est associée à la taille de la tumeur, la présence de métastases ganglionnaires et à distance, suggérant un rôle de CASC19 dans la survenue de métastases⁶²⁴.

