Aspects pratiques de la prise en charge des analyses médullaires: Génétique moléculaire

Frédéric Lambert & Mélissa François
Laboratoire de biologie moléculaire hématologique
Service de génétique humaine

☎ *04/366.25.47*
☎ *04/366.45.14/15*

flambert@chu.ulg.ac.be
http://www.genetique-hum-ulg.be/index.htm

Analyses de biologie moléculaire en hématologie

Quel(s) échantillon(s) ?

Pour quels test(s) ?

Quand et Pourquoi ?

1. Quel(s) échantillon(s) ?

Volume vs nombre de cellules

Conditions de prélèvement		
		Biologie moléculaire
		EDTA (ml) **conserver à 4°C**
Sang		20
Moelle hématopoïétique		5
PBSC		5
Biopsie	Transmettre à t° ambiante dans LP stérile ou milieu ou RNALater®	
Biopsie adénopathie	Transmettre à t° ambiante dans LP stérile ou milieu ou RNALater®	

Conditions de conservation et de transport ?

Dépendent des analyses subséquentes:
DNA *versus* **RNA** …

→ 4°C,
Le + vite possible au laboratoire (< 24H)

1. Quel(s) échantillon(s) ?

Pathologies		Sang	Moelle	Biopsie
LA		(X)*1,2	X	
SMP				
	LMC	X		
	PV-TE-MMM	X		
	HES/CEL	X		
	SMCD		X	
SLP				
	LLC	X		
	*LNH*3*			X
	MM		X	

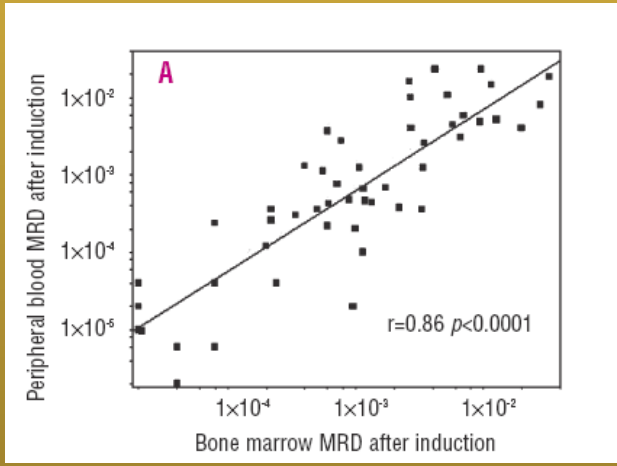
- *1, constitution banque de « tumeurs »
- *2, suivi MRD par RQ RT-PCR
- *3, selon propension à dissémination hématogène (MCL vs DLBCL)

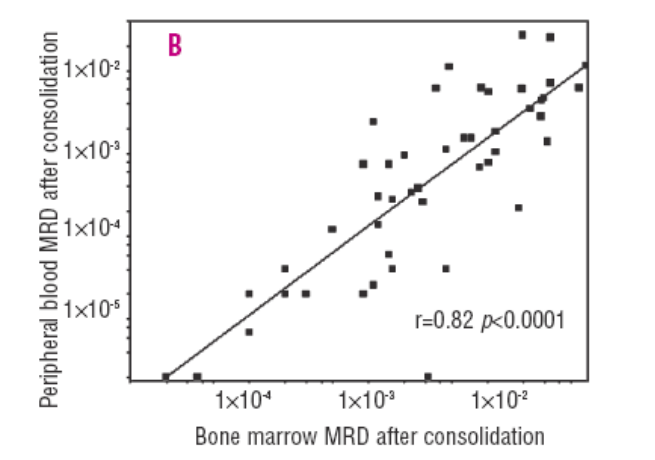
Sang versus moelle ?

Monitoring of minimal residual disease in adult acute myeloid leukemia using peripheral blood as an alternative source to bone marrow

Luca Maurillo, Francesco Buccisano, Alessandra Spagnoli, Giovanni Del Poeta, Paola Panetta, Benedetta Neri, Maria Ilaria Del Principe, Carla Mazzone, Maria Irno Consalvo, Anna Tamburini, Licia Ottaviani, Daniela Fraboni, Chiara Sarlo, Paolo De Fabritiis, Sergio Amadori, Adriano Venditti

Haematologica/the hematology journal, 2007; 92(05)





These preliminary results indicate that:

(i) PB evaluation can integrate BM assessment for MRD detection in patients with AML;
(ii) PB MRD status at the <u>end of consolidation</u> therapy may provide useful prognostic information.

Sang versus moelle ?

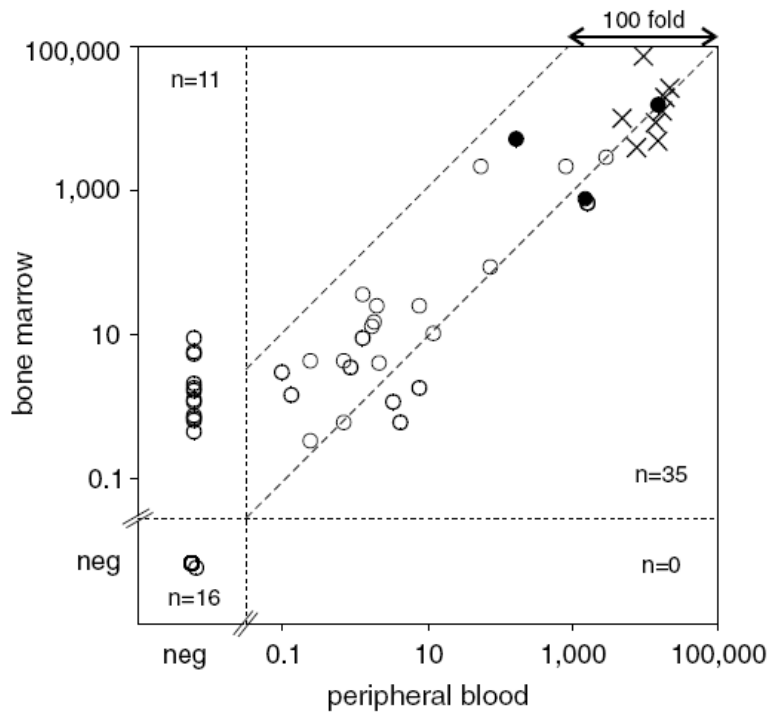


Figure 1 Correlation of NCN × 10^4 between 62 paired PB and BM samples from 10 *CBFB-MYH11*+ AML patients. ×, Paired diagnostic samples ($n=8$); ●, paired cytological relapse samples ($n=3$); ○, paired follow-up samples in cytological remission ($n=51$); and neg, MRD negative.

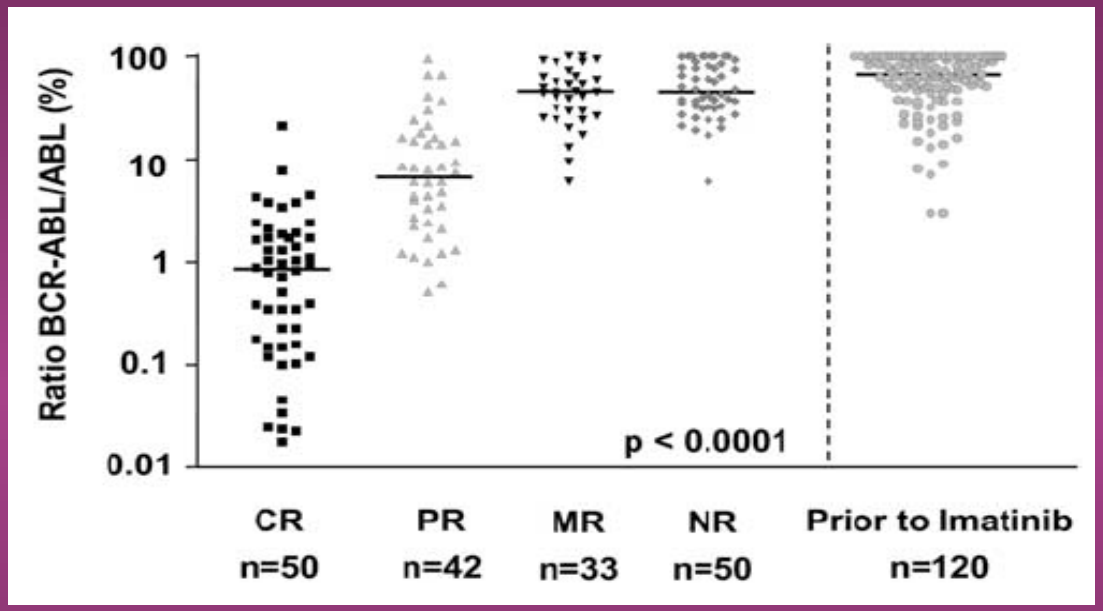
Boeckx et al, Leukemia (2005) 19, 1988–2022

- *CBFB-MYH11* AML can be monitored through regular evaluation of their PB at set points, thereby **avoiding multiple invasive BM punctures,**

- Such PB examinations could be performed **every 2–3 months after consolidation** and **BM** should be examined **in case of rising** CBFB-MYH11 transcripts in PB »

RQ PCR BCR-ABL sang périphérique vs cytogénétique médullaire

RQ PB



Bone marrow metaphases

« BCR-ABL/ABL ratio derived from RQ RT-PCR of *peripheral blood* specimens *vs* cytogenetic analyses of *bone marrow* metaphases.

Leukemia (2002) 16, 1579–1583

Quel(s) échantillon(s) ?

Etapes principales de la réalisation des analyses

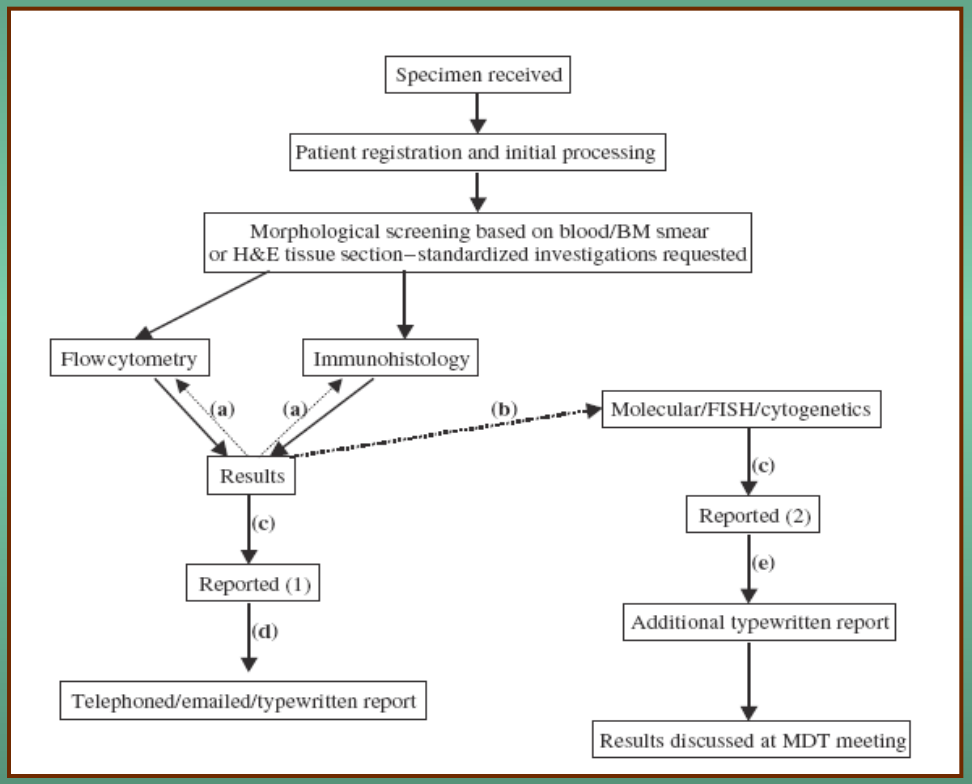
- **Etape 1: Lyse des g.r, sélection cellules d'intérêt, homogénisation (+/- 1-3 H)**
- Etape 2: Collecte des données biologiques
- Etape 3: Extraction des acides nucléiques (ADN, ARN)
- Etape 4: Rétro-transcription (RNA → cDNA)
- Etape 5: PCR
- Etape 6: Electrophorèse
- Etape 7: Séquençage
- Etape 8: Analyse
- Etape 9: Encodage des résultats
- Etape 10: Rédaction et validation des compte-rendus

Délais réponse moyen: 2-4 semaines → 1-3 mois

2. Pour quel(s) test(s) ?

Ce qui est nécessaire après évaluation:

- du contexte clinique:
  - Diagnostic *versus* suivi
- des données:
  - morphologiques,
  - du typage,
  - de la cytogénétique.



→ Importance de nous faire parvenir morphologie (histologie) et typage (IHC) !!!

S. J. Richards, A. S. Jack, *Clin.Lab. Haem.*, 2003

Pour quel(s) test(s) ?

Ancien formulaire: « choix » lors mise au point ???

BIOLOGIE MOLECULAIRE

04/366 25 47 (Dr F. LAMBERT - flambert@chu.ulg.ac.be) 04/366 45 14 et 45 15 (laboratoire)

Tube EDTA

L.L.A. - L.L.C.- MYELOME MULTIPLE - WALDENSTRöM

- ❑ Réarrangement monoclonal des locus CDRs I, II, III de l'IgH.
- ❑ Réarrangement monoclonal des locus CDRs des TCR γ, β et/ou δ .
- ❑ RT-PCR **qualitative** de recherche des transcrits m et/ou M-BCR/ABL, TEL/AML1, E2A/PBX1, MLL/AF4 ou SIL-TAL, (diagnostic).
- ❑ RT-PCR **quantitative** du niveau d'expression des transcrits BCR/ ABL, TEL/AML1, E2A/PBX1, MLL/AF4, HOX11, HOX11L2 ou SIL/TAL1, (suivi).
- ❑ RT-PCR quantitative du niveau d'expression des transcrits du gène **WT1**

LYMPHOMES

- ❑ Réarrangement monoclonal des locus CDRs I, II, III de l'IgH.
- ❑ Réarrangement monoclonal des locus CDRs des TCR γ, β et/ou δ.
- ❑ Réarrangements *BCL2-JH*.
- ❑ Réarrangements *BCL1-JH*.
- ❑ Recherche par RT-PCR sur-expression du gène encodant la cycline D1 (4*).
- ❑ Réarrangements *BCL6-JH*.
- ❑ Transcrit chimérique de fusion *NPM-ALK*.
- ❑ Transcrit chimérique AP12-MLT (1*)

L.M.A. - SMD

- ❑ RT-PCR **qualitative** de recherche des transcrits AML1-ETO, PML-RARα, *MYH11-CBFβ, MLL-AF9, DEK-CAN, (diagnostic)*.
- ❑ RT-PCR **quantitative** du niveau d'expression des transcrits *AML1-ETO, PML-RARα, MYH11-CBFβ*, MLL/AF9, DEK-CAN, (suivi).
- ❑ Duplication interne en tandem des exons 14–15 et/ou mutation D835X de l'exon 20 du gène **FLT3**.
- ❑ Mutation somatique de l'exon 12 du gène NPM1 (1*).
- ❑ RT-PCR quantitative du niveau d'expression des transcrits du gène **WT1**.

L.M.C. - SYNDROMES MYELOPROLIFERATIFS

- ❑ RT-PCR **qualitative** des transcrits de fusion m/M-BCR/ABL, (diagnostic).
- ❑ RT-PCR **quantitative** du niveau d'expression des transcrits m ou M-BCR/ ABL, (suivi).
- ❑ Mutations acquises conférant la résistance à l'imatinib (2*).
- ❑ RT-PCR FIP1L1-PDGFRA, DD syndrome d'**hyperéosinophilie essentielle** vs **CEL** (2*).
- ❑ Mutation somatique Asp816Val de c-Kit, Mastocytose systémiques (2*, sur **moëlle** exclusivement **et** si infiltration démontrée par histologie spécifique).
- ❑ Mutation somatique JAK2, V617F, SMP (2*, 3*, sang).

AUTRES

- ❑ Pour tout autre analyse, nous contacter svp (5*).

1. Mise au point (Diagnostic): Hypothèse diagnostique ?
2. Suivi: antériorité ?

Pour quel(s) test(s) ?

Nouveau formulaire:
collectes données cliniques + prescription informatisée…

(Cocher les cases adéquates svp; descriptif des analyses disponibles sur www.genetique-hum-ulg.be)

- ☐ **Mise au point :**
  - ☐ Hypothèse diagnostique (transmettre une copie du médullogramme, du typage lymphocytaire et/ou de l'histologie médullaire svp) :
    - ☐ Leucémie aigue :
      - ☐ LLA
        - ☐ B
        - ☐ T
      - ☐ LMA
        - ☐ de novo
        - ☐ II
    - ☐ Syndrome myélodysplasique
    - ☐ Leucémie lymphoïde chronique : ☐ B ☐ T
    - ☐ Syndrome myéloprolifératif :
      - ☐ LMC
      - ☐ PV
      - ☐ TE
      - ☐ MMM
      - ☐ Syndrome d'Hyperéosinophie/LCE
      - ☐ Mastocytose Systémique
      - ☐ Autre : .....
    - ☐ Lymphome non hodgkin
      - ☐ B
      - ☐ T
    - ☐ GMOI - Myélome multiple - Waldenström
    - ☐ Maladie de Hodgkin
    - ☐ Autres : .....
- ☐ **Suivi :**
  - Pathologie : .....
  - Mutation(s)/translocation(s) chromosomique(s) : .....
  - Autre analyse : .....
- ☐ **Bilan d'extension médullaire de LNH :**
  - ☐ Marqueur de clonalité identifié préalablement sur une biopsie / adénopathie transmise au laboratoire :
    - ☐ Oui
    - ☐ Non
    - ☐ Biopsie planifiée mais non encore réalisée / non planifiée

Liste exhaustive des analyses disponible sur: http://www.genetique-hum-ulg.be/index.htm

Centre de Génétique Humaine - C.H.U., Liège - Mozilla Firefox

Fichier Édition Affichage Historique Marque-pages Outils ?

Page précédente Page suivante Actualiser Arrêter Imprimer Historique Téléchargements Nouvel onglet Accueil

http://www.genetique-hum-ulg.be/labobmhemato.htm

courriers électroniques Moteurs de recherche NON TRAVAIL TRAVAIL BIO INFORMATIQUE

copernic Recherche Web Recherche PC: Tous

Centre de Génétique Humaine - C...

Service de Génétique Humaine

Laboratoires

accueil | consultations | cytogénétique | bioch. génétique | Bio. Mol. humaine | Bio. Mol. hématologique

Accueil / laboratoire de biologie moléculaire hématologique

Feuilles de demande d'analyses

Conditions de prélèvement

Recherche & Enseignement

Contacts

Laboratoire de Biologie Moléculaire Hématologique

Secrétariat

Mmes M. Delhaxhe et A. Legrand
Tél.: +32(0)4.366.25.47
fax: +32(0)4.366.47.14

Chef de clinique

Dr F. Lambert
Courriel: flambert@chu.ulg.ac.be
Tél.: +32(0)4.366.25.47
fax: +32(0)4.366.47.14

Cadres nosologiques :

- Leucémies Aigües (LLA & LMA) et SMD de type Anémie Réfractaire avec Excès de Blastes (AREB)
- Syndromes Lymphoprolifératifs Chroniques : LLC – LNH – LPL – HCL – Myélome Multiple – Maladie de Waldenström
- Syndromes Myéloprolifératifs Chroniques: LMC – PV – TE – MMM – CEL/HES –SMCD
- Tumeurs solides

Analyses réalisées :

Leucémies Lymphoblastiques Aigües (LLA)

- Réarrangement monoclonal des loci FR I, II et III de l'IgH.
- Réarrangement monoclonal des loci des chaines g, b et/ou d des TCR.
- Réarrangement monoclonal du loci l et/ou k, dont l' Ig k - kde, des chaines légères d'Ig.

- Transcrits chimériques de fusion m - M *BCR/ABL1* ; t(9;22)(q34;q11).
- Transcrits chimériques de fusion *E2A/PBX1* ; t(1;19)(q23;p13).
- Transcrits chimériques de fusion *ETV6/AML1* ; t(12;21)(p13;q22).

Terminé

démarrer 19:46

Le site: la liste complète des analyses disponible (http://www.genetique-hum-ulg.be/index.htm)

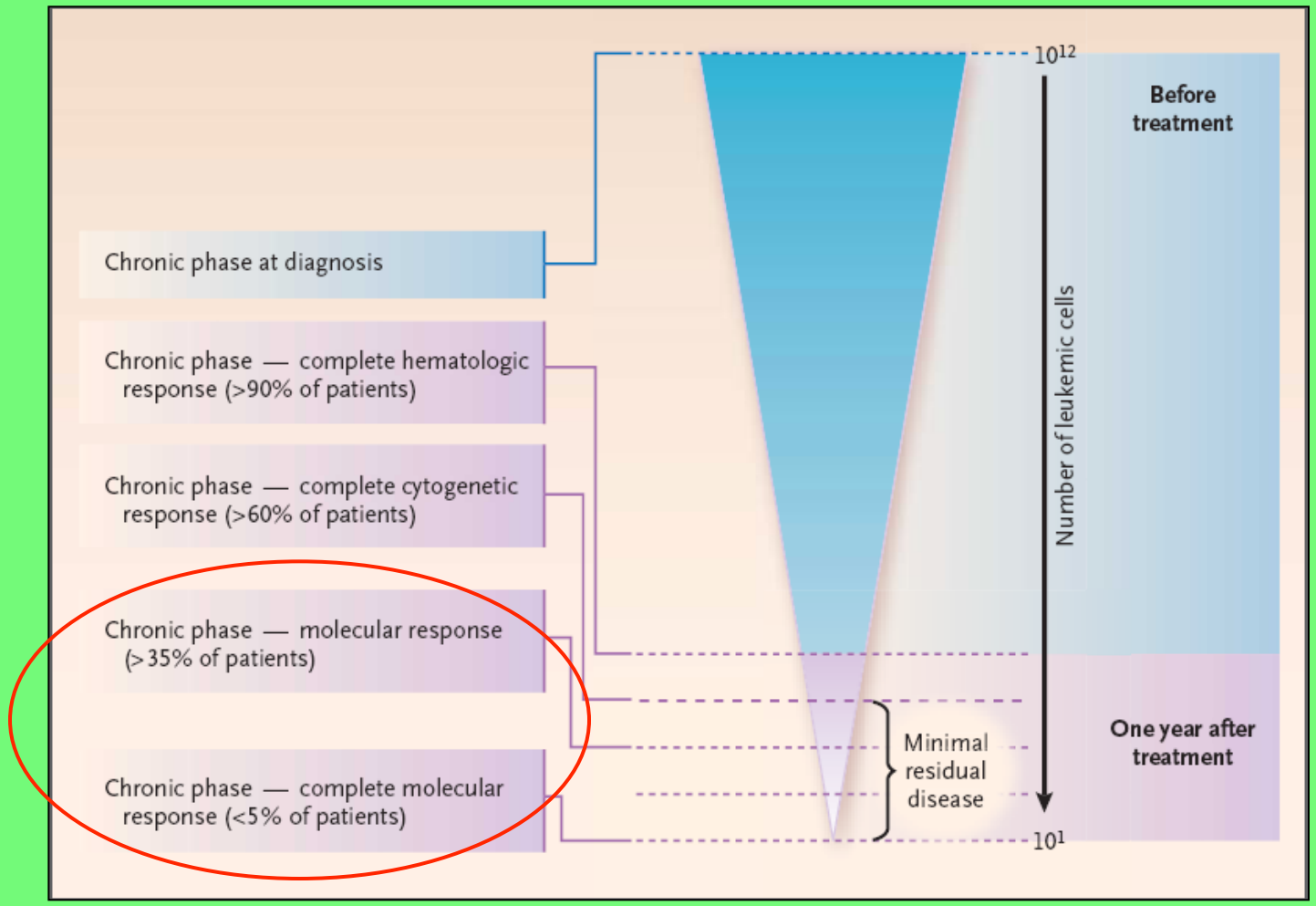
3. Quand?

Sensibilité analytique (quantitative) élevée

(combien de « cellules » pathologiques dans un échantillon donné ?)

→ Domaine de prédilection: évaluation réponse thérapeutique ciblée et
suivi « MRD »

Suivi moléculaire de thérapies ciblées, l'exemple des inhibiteurs de Tk dans la LMC



Suivi: biologie moléculaire

Löwenberg et al., NEJM

MAIS

- Sensibilité (capacité d'un test de donner un résultat positif lorsque la maladie est présente (Elevée: peu de faux négatifs)

- Spécificité (capacité d'un test de donner un résultat négatif lorsque la maladie n'est pas présente (Elevée: peu de faux positifs)

souvent basses !!!!

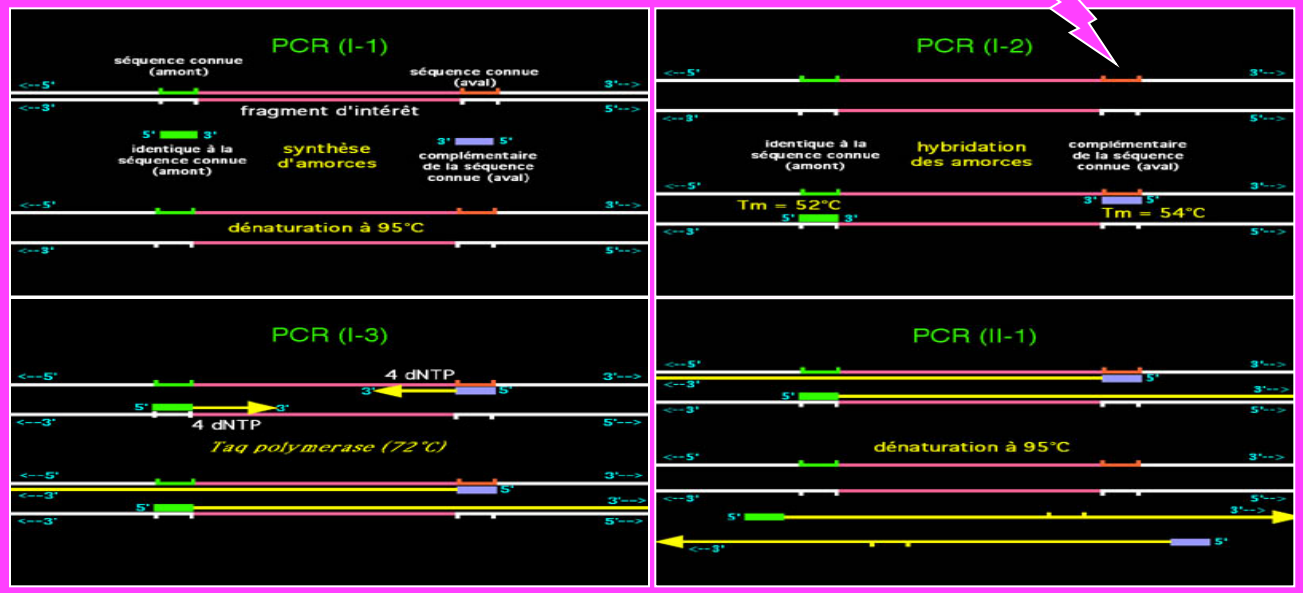
→ Mauvais outils de « screening » et de diagnostic

Biomol, une technique de base: La PCR

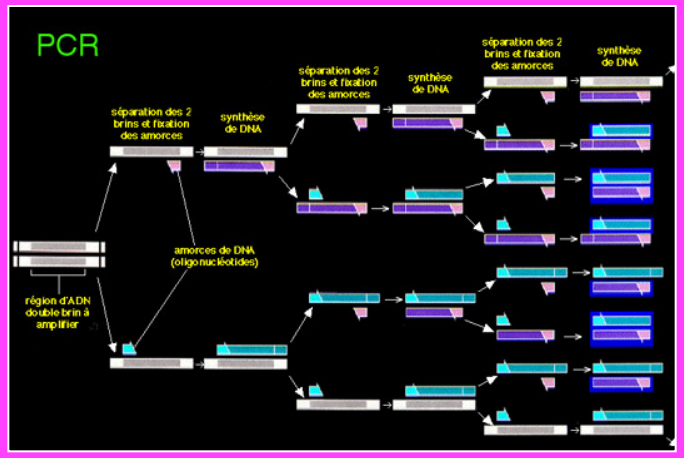
Amplification

F-

Amorces

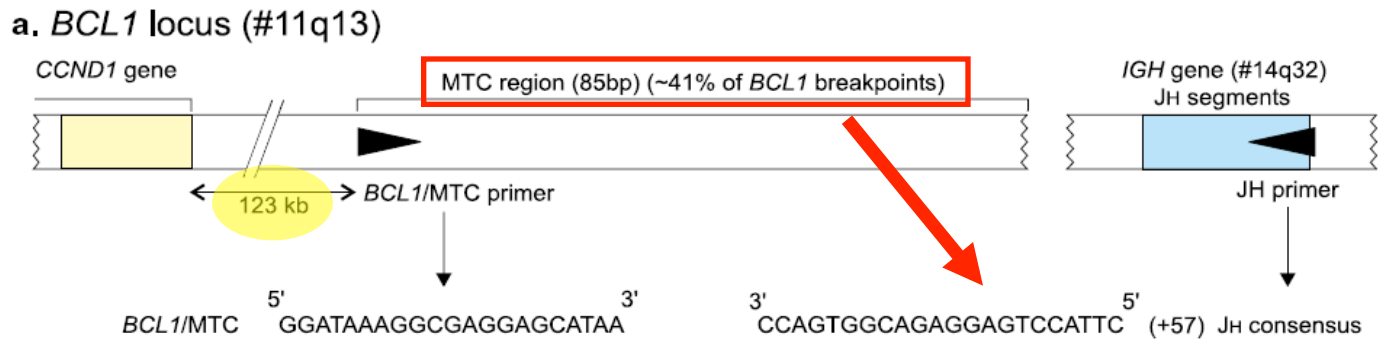


Cible spécifique

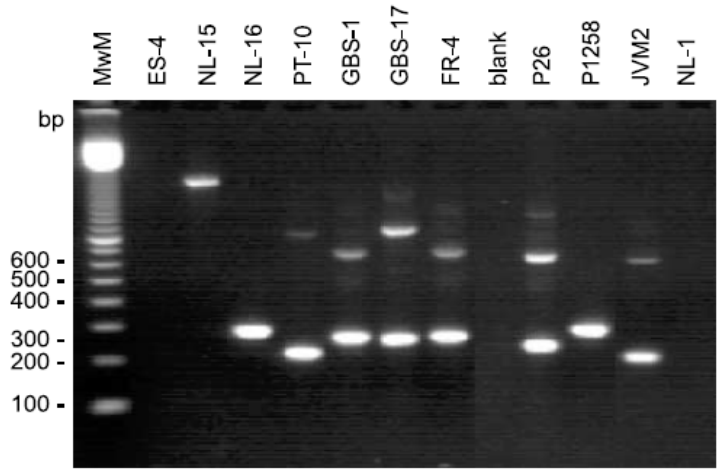


Les amorces confèrent la spécificité et la sensibilité

Recherche t(11;14): FISH versus PCR BCL1-JH ?



b. t(11;14) tube *BCL1* MTC-JH



t(11;14) tube *BCL1* MTC-JH

Sensibilité limitée !!!

VPN ↓

FISH BCL1/IgH

→ *dépend de l' hypothèse pré-test, soit du typage CD5+; CD23-; CD19+; FMC7+; CD79b+ et de l'expression de la CCND1*

van Dongen, Leukemia, 2003

FISH versus PCR ?

FISH is better than BIOMED-2 PCR to detect *IgH/BCL2* translocation in follicular lymphoma at diagnosis using paraffin-embedded tissue sections

B. Espinet et al. / Leukemia Research xxx (2007) xxx–xxx

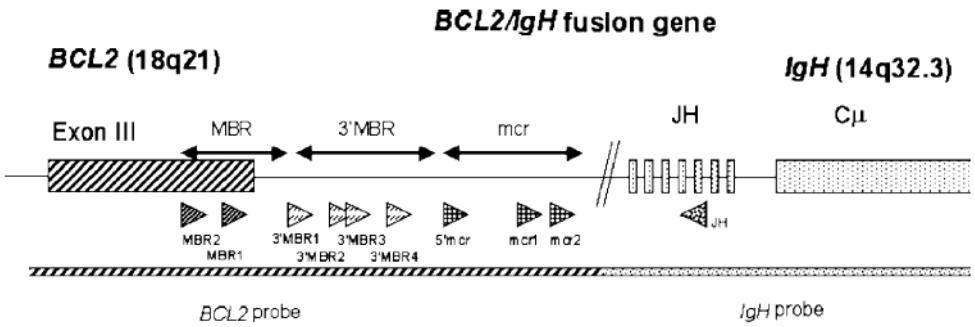


Fig. 2. Schematic diagram of the *IgH/BCL2* fusion gene showing the localization of the same PCR primers and FISH probes represented in Fig. 1.

FISH versus PCR ?

Interphase fluorescence in situ hybridization is more sensitive than BIOMED-2 polymerase chain reaction protocol in detecting *IGH-BCL2* rearrangement in both fixed and frozen lymph node with follicular lymphoma

M.-A. Belaud-Rotureau, Human Pathology (2007) 38, 365– 372

- 51 LNH FL; Questions: sensibilité et « applicabilité » FISH *versus* PCR ?
- FISH IGH-BCL2 « dual-fusion », « dual-color probes » applicable 100% cas,
- Détection t(14;18): 47/51 (92%), résultats concordant e/e empruntes et noyaux,
- Applicabilité de la PCR: 76% biopsies fixées (dégradation DNA),
- PCR BIOMED-2: détection IGH-BCL2 fusion 25/39 (64%) échantillons fixés et 11/36 FISH-positives donnent une PCR-negative (31%),
- Matériel congelé (100% d'applicabilité), amplification BCL2-JH breakpoint 20/28 (71%), 5 PCR-negatives (20%) de 25 FISH-positive cases.

ET
La sensibilité de détection d'une population clonale est fonction du nombre de « cibles » amplifiées

Table 1 Complementarity of Ig targets for clonality detection in five categories of B-cell malignancies (% clonality)[a]

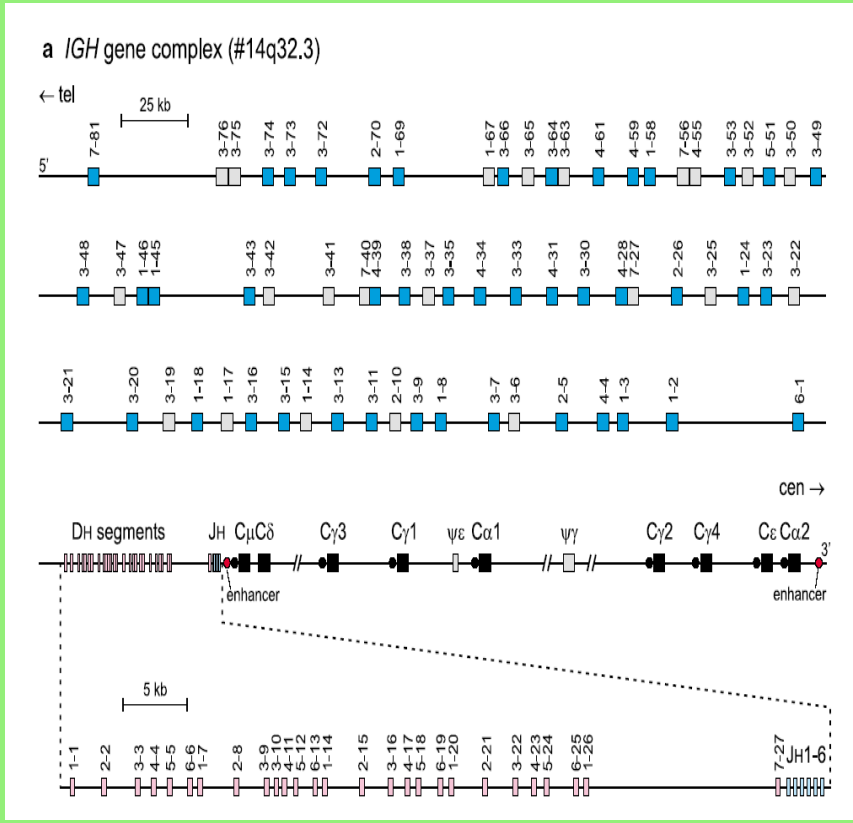
	IGH			*IGK*	*IGH+IGK*
	VH–JH	*DH–JH*	*VH–JH+DH–JH*	*Vκ–Jκ+Kde*	
MCL(%)	100	11	100	100	100
B-CLL(%)	100	43	100	100	100
FL(%)	84	19	86	84	100
MZL(%)	88	51	95	83	100
DLBCL(%)	79	30	85	80	98
TOTAL(%)	88	28	91	88	99

Abbreviations: B-CLL, B-cell chronic lymphocytic leukemia; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; FL, follicular lymphoma; MCL, mantle cell lymphoma; MZL, marginal zone B-cell lymphoma.
[a]For detailed information, see BIOMED-2 report by Evans *et al.*[30]

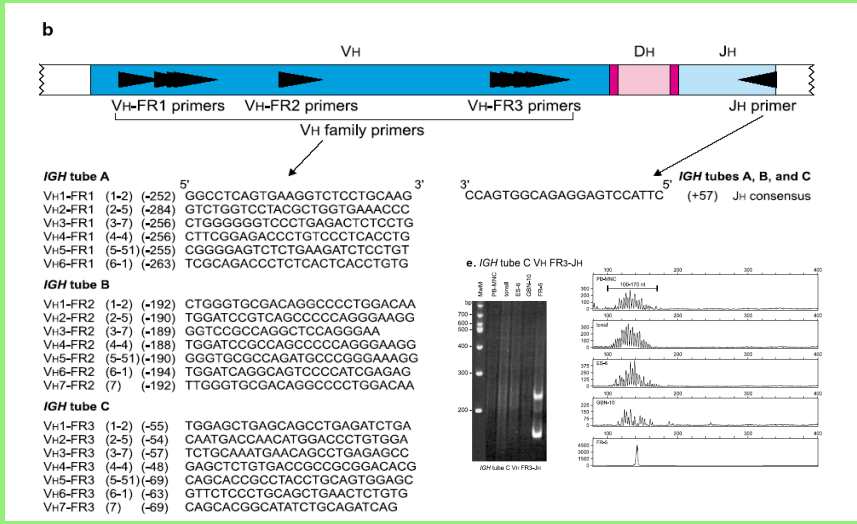
→ ↗ sensibilité (↓faux négatifs) nécessite de multiplier les « cibles »

van Krieken et al. Leukemia 2007

La sensibilité des PCR d'IgH est fonction du nombre de « primers » utilisés



Gene segment	IGH
V segments	
Functional (family)	44 (7)
Rearrangeable (family)	66 (7)[b]
D segments	
Rearrangeable (family)	27 (7)
J segments	
Functional	6[c]
Rearrangeable	6[c]



Multitude de segments V, D et J !!!!

van Dongen, Leukemia, 2003

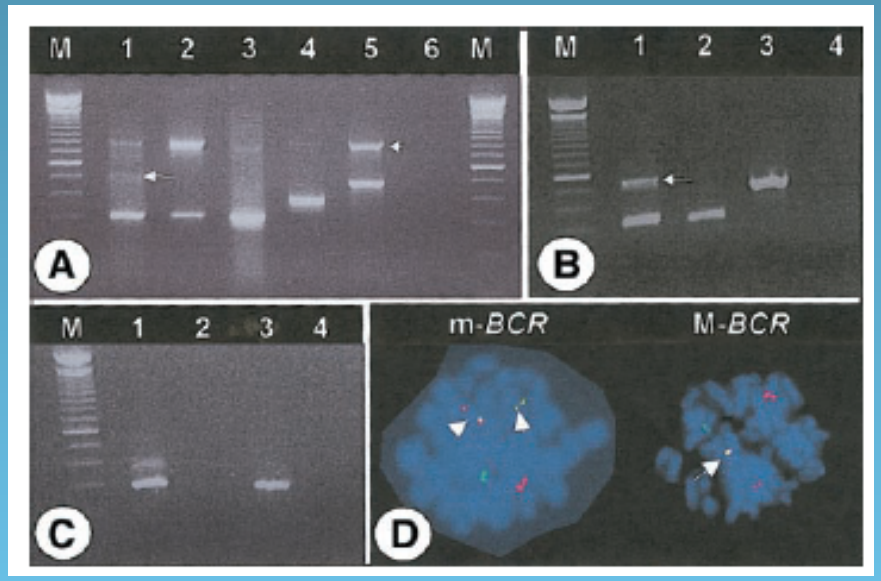
La bonne technique, au bon moment

L'exemple de la LMC

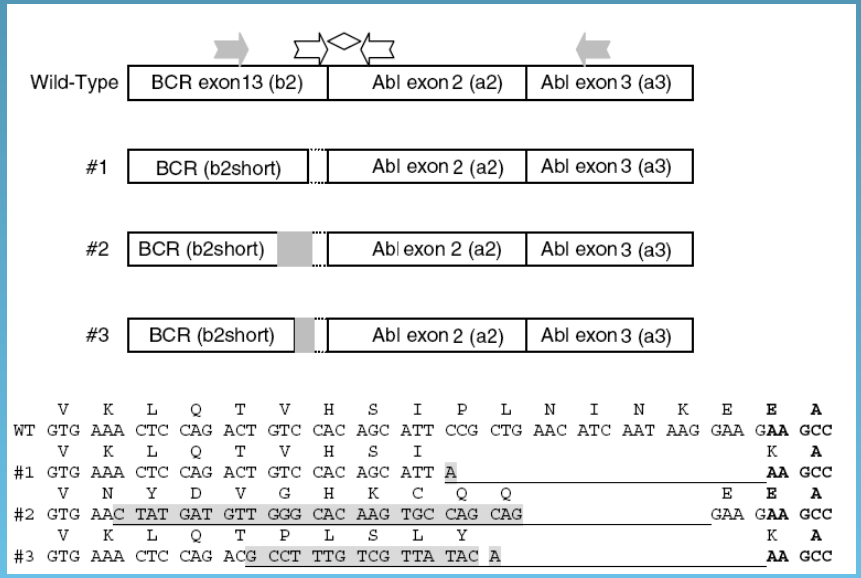
To the editor:

CML with an e1a3 *BCR-ABL* fusion: rare, benign, and a potential diagnostic pitfall

Rational use of the EAC real-time quantitative PCR protocol in chronic myelogenous leukemia: report of three false-negative cases at diagnosis



Haifa-Kathria Al-Ali et al., *BLOOD, 2002*



Dessart et al., Leukemia (2006) 20, 886–888

Variants = source de faux négatifs

Sensibilité ↓

Sensibilité analytique ↓

Les propriétés analytiques des tests de biologie moléculaire limitent leur utilité à titre d'outils « diagnostics »

- La valeur prédictive positive (VPP) est la probabilité que la maladie soit présente lorsque le test est positif.

- La valeur prédictive négative (VPN) est la probabilité que la maladie ne soit pas présente lorsque le test est négatif.

Dépendent de la probabilité pré-test (contexte clinique, analyses préalables) et des qualités des tests

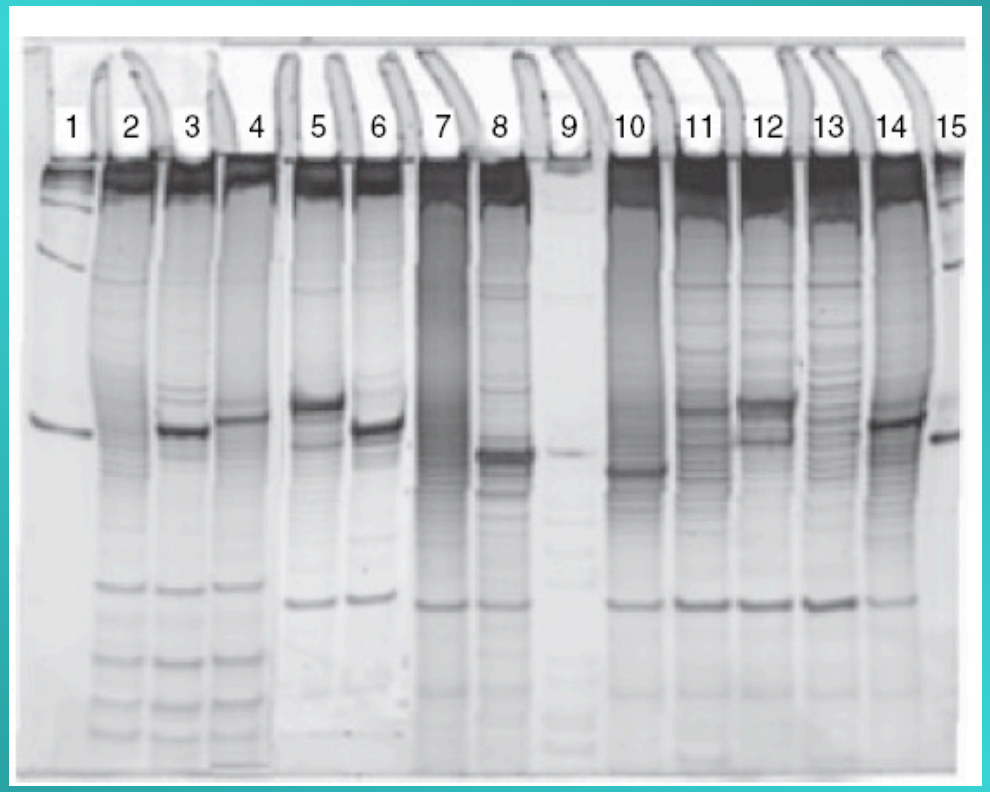
→ pas de screening possible !!!

VPP: PCR « IgH » dans les SLP-B chroniques ?

	IgH	BCL1/IgH	CCND1	BCL2/IgH	Hypermut IgVH
LLC	**X**	x	x	x	**X**
LCM	**X**	**X**	**X**		25%
FL	**X**			**X**	x
LPL-B	**X**	x	x		x
LT (HCL) + LT-V	**X**	x	x		x
LZM • **MALT** • **Splénique villeux et non villeux** • **Ganglionnaire**	**X**				x
LLP- MW	**X**	x			x

→ *dépend de l' hypothèse pré-test (typage lymphocytaire CD5+)*

Valeur prédictive positive des PCR IgH ?



Lymphocytoses monoclonales B chez les sujets sains !

Rachel, J.M et al., BJH, 2007

Indications des PCR d'IgH

5-10% des cas de diagnostics problématiques dans les pathologies lymphoïdes

- Prolifération B avec morphologie et typage non concluant,
- Proliférations lymphoïdes T,
- Lymphoproliférations post-greffes,
- Étude filiation entre deux tumeurs lymphoïdes chez 1 patient,
- Bilan d'extension des LNH ?

van Dongen et al, Leukemia, 2003

Quel test(s), pour quel(s) usage?

PCR d'IgH et « diagnostic » médullaire des LNH

Polymerase Chain Reaction-Based Diagnosis of Bone Marrow Involvement in 170 Cases of Non-Hodgkin Lymphoma

Morphology remains the gold standard in the evaluation of BM involvement by NHL. Although the comparative analysis of BM clonality and that of the lymph nodes is considered a valuable tool that increases the reliability of clonality, PCR-based clonality of BM does not significantly add to the sensitivity of diagnosing BM involvement by NHL.

Yoon Hee Kang et al, Cancer. 2002 Jun 15;94(12):3073-82.

SLP-B: translocations chromosomiques et gènes de fusion ne sont pas spécifiques à 100%

Table 1. Frequent balanced chromosome translocations and their molecular consequence in mature B cell malignancies

Disease	Translocation	Gene rearrangement	Frequency (%)
Mantle cell lymphoma	t(11;14)	*IGH-CCND1*	100
Follicular lymphoma	t(14;18)	*BCL2-IGH*	90
Diffuse large B cell lymphoma	t(14;18)	*BCL2-IGH*	15
	t(3;14)	*IGH-BCL6*	up to 40
	t(3;22)	*IGL-BCL6*	up to 40
	t(2;3)	*IGK-BCL6*	up to 40
	t(8;14)	*IGH-MYC*	5–10
Burkitt's lymphoma	t(8;14)	*IGH-MYC*	80
	t(2;8)	*MYC-IGK*	15
	t(8;22)	*MYC-IGL*	5
MALT lymphoma	t(11;18)	*API2-MALT1*	50 (lung)
			20 (stomach)
	t(14;18)	*IGH-MALT1*	20
	t(3;14)	*IGH-FOXP1*	50 (thyroid)
			20 (ocular adnexa)
			10 (skin)
Lymphoplasmacytoid lymphoma	t(9;14)	*IGH-PAX5*	Unclear
Multiple myeloma	t(11;14)	*IGH-CCND1*	15
	t(6;14)	*IGH-CCND3*	3
	t(4;14)	*IGH-MMSET* & *IGH-FGFR3*	15
	t(14;16)	*IGH-MAF*	5
	t(14;20)	*IGH-MAFB*	2

Bench et al, 2007

Gènes de fusion et sujets sains

Detection of Major bcr-abl Gene Expression at a Very Low Level in Blood Cells of Some Healthy Individuals

By C. Biernaux, M. Loos, A. Sels, G. Huez, and P. Stryckmans

Blood, Vol *86*, No *8* (October 15). 1995: pp 3118-3122

The Presence of Typical and Atypical BCR-ABL Fusion Genes in Leukocytes of Normal Individuals: Biologic Significance and Implications for the Assessment of Minimal Residual Disease

By Shikha Bose, Michael Deininger, Joanna Gora-Tybor, John M. Goldman, and Junia V. Melo

Blood, Vol 92, No 9 (November 1), 1998: pp 3362-3367

Frequency of the *Bcl-2/IgH* Rearrangement in Normal Individuals: Implications for the Monitoring of Disease in Patients With Follicular Lymphoma

Karin E. Summers, Journal of Clinical Oncology, Vol 19, No 2 (January 15), 2001: pp 420-424

22 %

3. Biologie moléculaire: Quand et pourquoi ?

- Diagnostic:
  - Critères OMS de diagnostic (D816V c-Kit)
  - Recherche de mutations « cryptiques » avec importance diagnostique et/ou pronostique (MYH11-CBFB; *FIP1L1-PDGRA*)
  - Orientation thérapeutique: facteur prédictif (Statut mutationnel IgH VH LLC si CD5+;CD23+; FMC7-;CD79b-;SIgMf)
  - Echec du caryotype (biopsies, LLC…)

→ MAIS toujours matériel vers le laboratoire de biologie moléculaire pour « génotypage si suivi ultérieur.

- Suivi:
  - Paramètre décisionnel dans protocoles thérapeutiques (MRD J35 LLA, BCR-ABL1 post imatinib…)
  - Evaluation filiation tumeur T1 *versus* T2 (LNH)

Les groupes pronostics des AML de l'adulte reposent sur les données du caryotype

Table 1. Hierarchical Cytogenetic Classification Systems Used to Define Prognostic Groups in Younger Adults With AML

Risk Category	MRC	SWOG/ECOG	CALGB*†
Favorable	t(8;21)	t(8;21) without del(9q) or complex karyotype	t(8;21)
	inv(16)/t(16;16)	inv(16)/t(16;16)/ del(16q)	inv(16)/t(16;16)
	t(15;17)	t(15;17)	del(9q)
Intermediate	Normal karyotype	Normal karyotype	Normal karyotype
	del(7q)	−Y	−Y
	+8	+6	del(5q)
	del(9q)	+8	del(7q)
	abn(11q23)	del(12p)	t(9;11)
	+21		+11
	+22		del(11q)
	All other aberrations		abn(12p)
			+13
			del(20q)
			+21
Unfavorable	abn(3q)	abn(3q)	inv(3)/t(3;3)
	−5/del(5q)	−5/del(5q)	t(6;9)
	−7	t(6;9)	t(6;11)
	≥ 5 aberrations	−7/del(7q)	−7
		t(9;22)	+8 sole or with 1 additional aberration
		abn(9q)	t(11;19)
		abn(11q)	≥ 3 aberrations
		abn(17p)	
		abn(20q)	
		abn(21q)	
		≥ 3 aberrations	

Cytogénétique

?

Fröhling et al., 2005

Valeur pronostic des anomalies cytogénétiques et moléculaire des AML

Table 3. Cytogenetic Findings and Frequently Associated Molecular Abnormalities in AML

Cytogenetic Finding	Molecular Abnormality	Selected Reference
t(8;21)(q22;q22)	*KIT* exon 8 mutation	39
	KIT codon 816 mutation	39
	CEBPA downregulation	182
inv(16)(p13q22)/ t(16;16)(p13;q22)	*KIT* exon 8 mutation	39
	KIT codon 816 mutation	39
	NRAS mutation	41
	KRAS mutation	41
	CEBPA downregulation	121
t(15;17)(q22;q11~21)	*FLT3* ITD	51
	FLT3 activation loop mutation	53
t(6;9)(p23;q34)	*FLT3* ITD	53
del(9q)	*CEBPA* mutation	183
+11	*MLL* PTD	184
+21	*RUNX1* mutation	87
Normal karyotype	*MLL* PTD*	185
	FLT3 ITD*†	186
	FLT3 activation loop mutation*	50
	CEBPA mutation	125
	NPM mutation†	181
	BAALC overexpression	180

Table 2. Molecular Abnormalities Frequently Detected in AML With Normal Karyotype

Molecular Abnormality	Prognostic Relevance	Selected Reference
Negative prognostic effect		
FLT3 ITD	Significantly shorter CRD and OS	50
FLT3$^{ITD/-}$*	Significantly shorter DFS and OS	54
MLL PTD	Significantly shorter CRD	179
BAALC overexpression	Significantly shorter DFS, EFS, and OS	180
Positive prognostic effect		
CEBPA mutation	Significantly longer CRD and OS	125
Unknown prognostic effect		
NPM mutation	Not determined	181

Subdivision des patients du groupe « caryotype N » en sous-groupes

Fröhling et al. 23 (26): 6285. (2005)

Recherche de mutations cryptiques/orientation ϴ au diagnostic:

- **LLA**
  - ✓ ***HOX11, HOX11L2, NUP214-ABL1, MYB***
- **LMA**
  - ✓ **FLT3-ITD et D835M**
  - ✓ **mutations NPM1**
  - ✓ ***c-KIT***
- **SMP**
  - ✓ **JAK2 V617F**
- **HES/CEL**
  - ✓ ***FIP1L1-PDGFRA***
- **Mastocytoses systémiques**
  - ✓ **c-kit D816**

Non détectables par cytogénétique classique !!!

Vers une classification « semi-moléculaire » des SMPs »

Leukemia (2007), 1–9
© 2007 Nature Publishing Group All rights reserved 0887-6924/07 $30.00
www.nature.com/leu

SPOTLIGHT REVIEW

Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms

A Tefferi[1] and JW Vardiman[2]

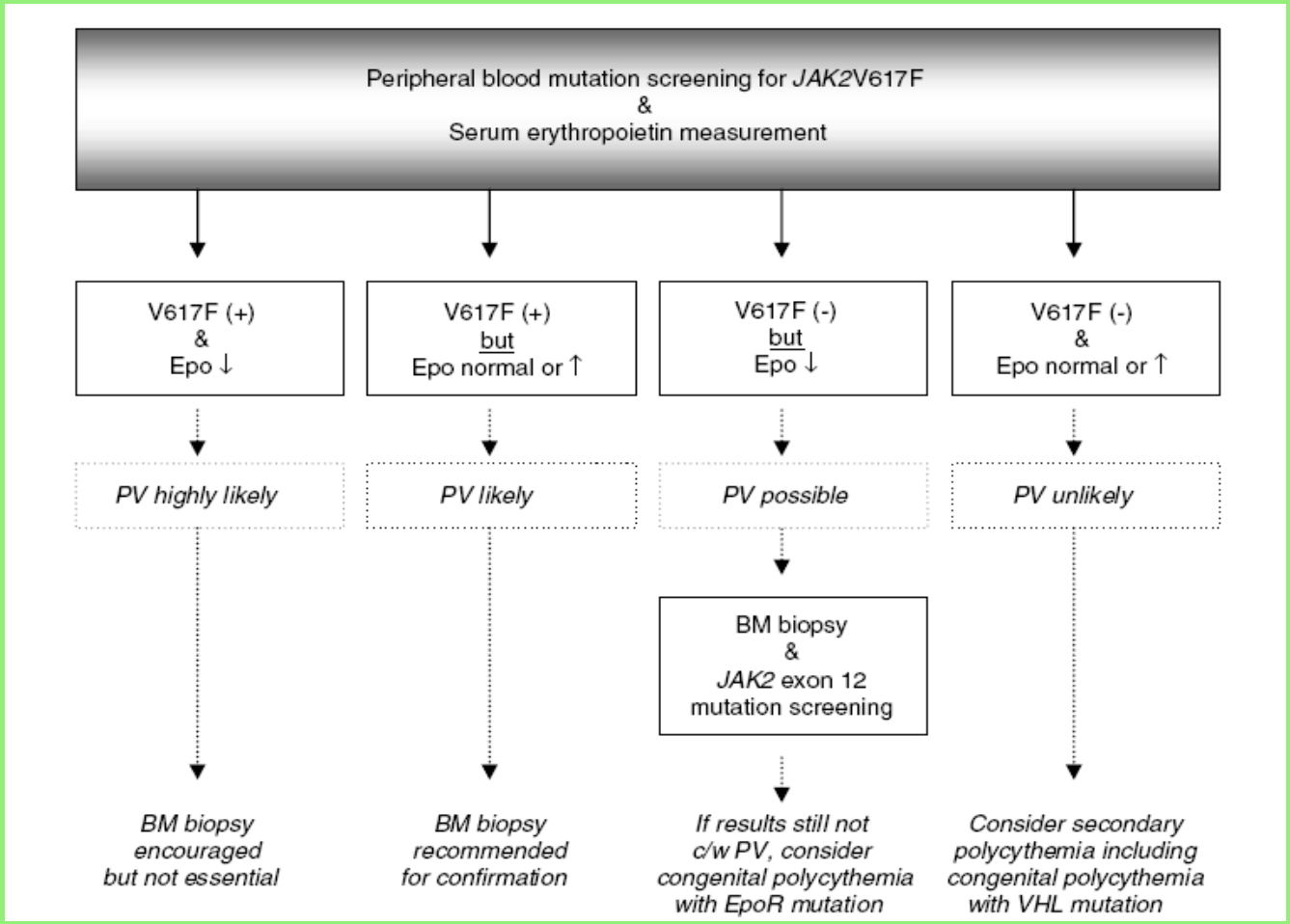
[1]*Division of Hematology, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA and* [2]*Department of Pathology, University of Chicago, Chicago, IL, USA*

Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel

Ayalew Tefferi,[1] Juergen Thiele,[2] Attilio Orazi,[3] Hans Michael Kvasnicka,[2] Tiziano Barbui,[4] Curtis A. Hanson,[1] Giovanni Barosi,[5] Srdan Verstovsek,[6] Gunnar Birgegard,[7] Ruben Mesa,[1] John T. Reilly,[8] Heinz Gisslinger,[9] Alessandro M. Vannucchi,[10] Francisco Cervantes,[11] Guido Finazzi,[4] Ronald Hoffman,[12] D. Gary Gilliland,[13] Clara D. Bloomfield,[14] and James W. Vardiman[15]

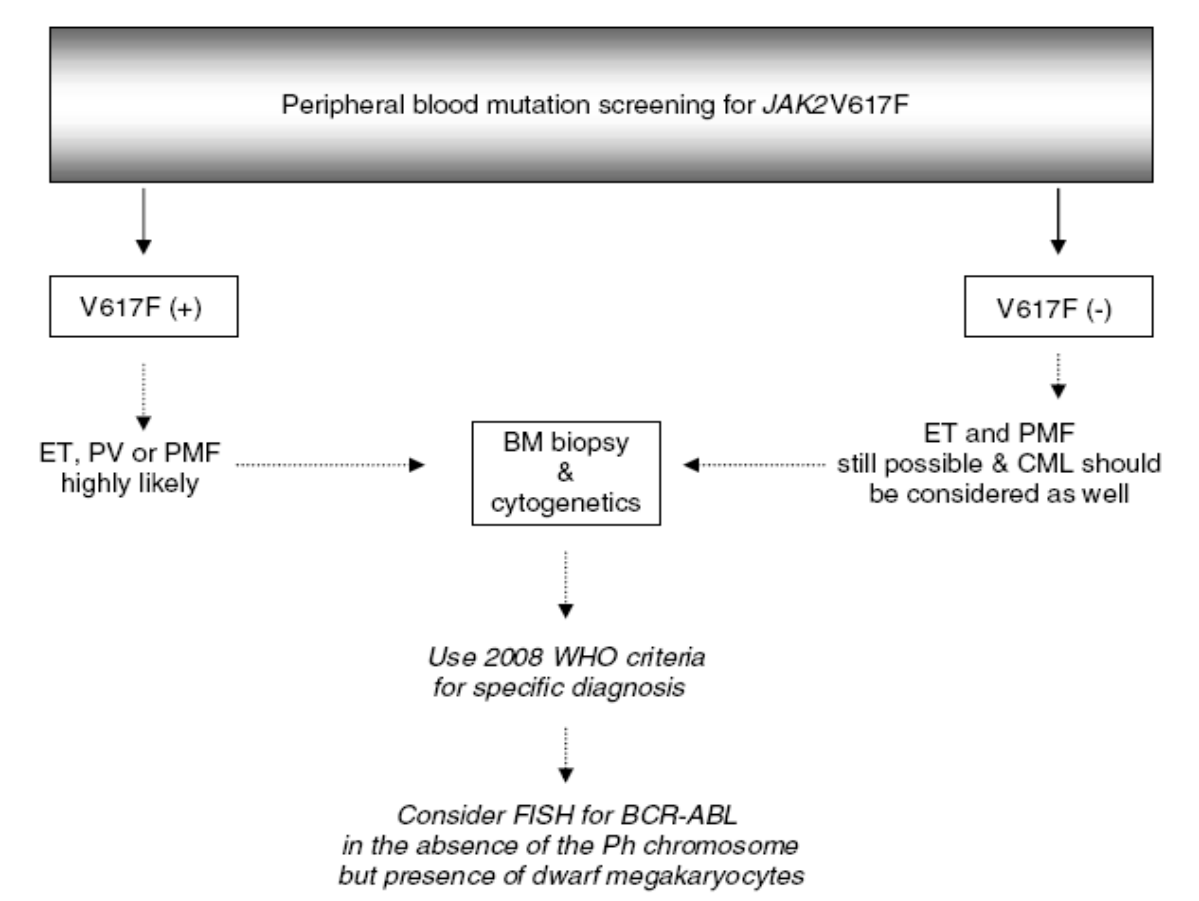
BLOOD, 15 AUGUST 2007 VOLUME 110, NUMBER 4

Algorithme diagnostic pour la mise au point des polycythemies vraies



A. Tefferi and JW.Vardiman, *Leukemia*, 2007

Algorithme diagnostic pour la mise au point des thrombocythémies essentielles



A. Tefferi and JW.Vardiman, *Leukemia,* 2007

Anomalies « spécifique » et sujets sains

Brief report

JAK2^{V617F}: prevalence in a large Chinese hospital population

Xuesong Xu,[1,2] Qi Zhang,[1] Jian Luo,[1] Shu Xing,[1,3] Qingshan Li,[1] Sanford B. Krantz,[4] Xueqi Fu,[1] and Zhizhuang Joe Zhao[1,3]

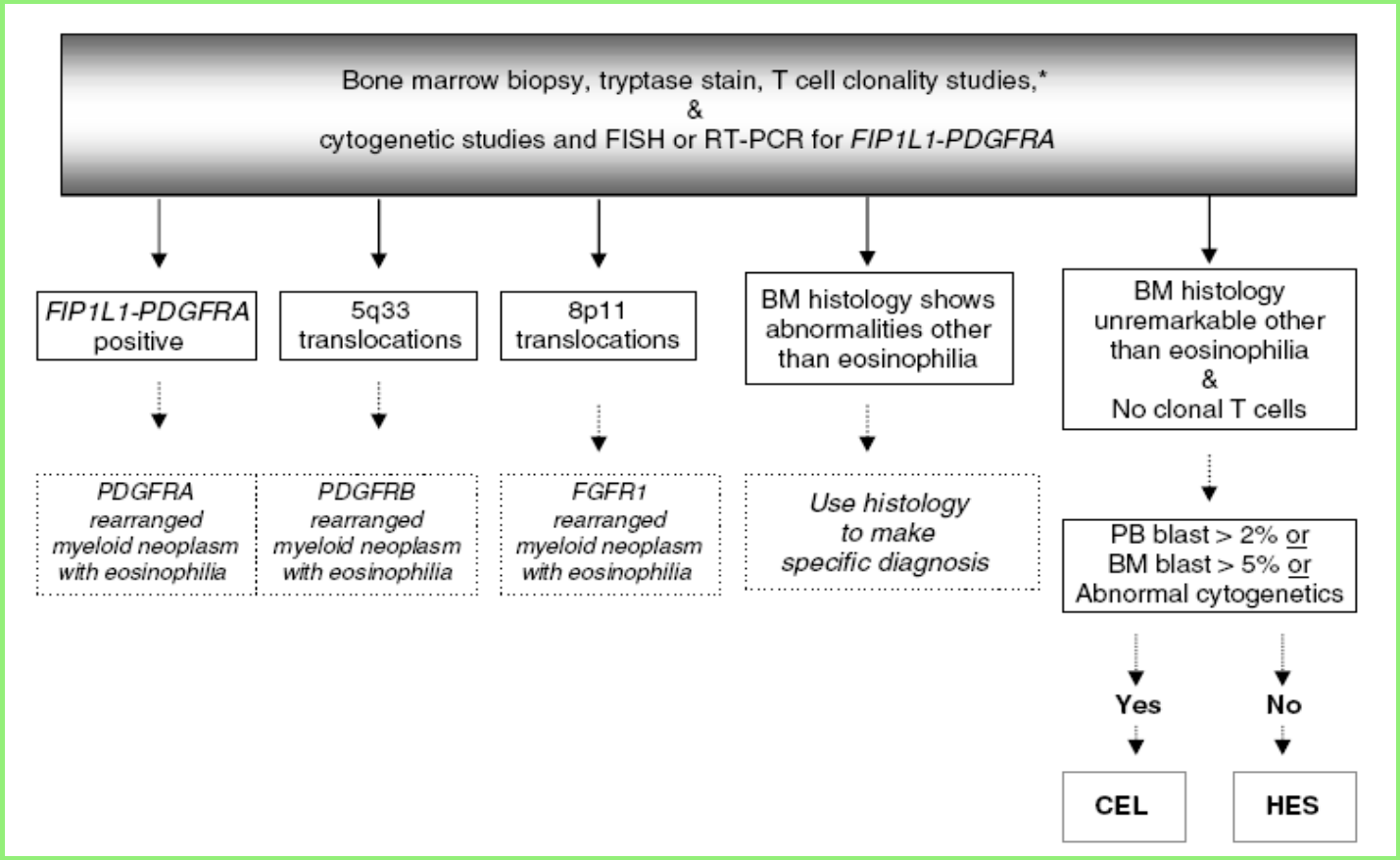
[1]Edmond H. Fischer Signal Transduction Laboratory, College of Life Sciences, Jilin University, Changchun, China; [2]Clinical Laboratory, China Japan Union Hospital, Jilin University, Changchun, China; [3]Department of Pathology, University of Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma City; [4]Hematology/Oncology Division, Department of Medicine, Vanderbilt-Ingram Cancer Center, Vanderbilt University, Nashville, TN

Blood, 2007

- 37 JAK2V617F / n= 3935, soit ~ 1%.
- 0.3%, detectés par DNA-sequençage (sensibilité ~ 10-20%)

- **“JAK2V617F may not be used exclusively for the diagnosis of MPDs, but it may be useful for the early identification of MPDs and other diseases”**

Algorithme diagnostic pour la mise au point des hypereosinophilies primaires



A. Tefferi and JW.Vardiman, *Leukemia*, 2007

Vers une classification « semi-moléculaire » des SMPs »

- Chronic myelogenous leukemia
- Polycythemia vera
- Chronic idiopathic myelofibrosis (with extramedullary hematopoiesis)
- Essential thrombocythemia
- Chronic neutrophilic leukemia
- Chronic eosinophilic leukemia / HES
- Chronic myeloproliferative disease, unclassifiable

BCR-ABL1

***JAK2* exon Δ 12**

***JAK2* V617F**

MPLW515F

FIP1L1-PDGFRA

X-PDGFRB

Vardiman et al., BLOOD, 2002

Evaluation moléculaire de la réponse aux inhibiteurs de TK

	Hematologic response	Cytogenetic response	Molecular response (BCR-ABL to control gene ratio according to the international scale)
Definitions	Complete: Platelet count $< 450 \times 10^9$/L; WBC count $< 10 \times 10^9$/L; differential without immature granulocytes and with less than 5% basophils; nonpalpable spleen	Complete: Ph^+ 0% Partial: Ph^+ 1%-35% Minor: Ph^+ 36%-65% Minimal: Ph^+ 66%-95% None: $Ph^+ > 95\%$	"Complete" indicates transcript nonquantifiable and nondetectable Major: ≤ 0.10
Monitoring	Check every 2 wk until complete response achieved and confirmed, then every 3 mo unless otherwise required	Check at least every 6 mo until complete response achieved and confirmed, hence at least every 12 mo	Check every 3 mo; mutational analysis in case of failure, suboptimal response, or transcript level increase

Baccarani et al,BLOOD, 15 SEPTEMBER 2006 VOLUME 108, NUMBER 6

Pour quel(s) usages(s) ?

Quantitative PCR of bone marrow BCL2/IgH$^+$ cells at diagnosis predicts treatment response and long-term outcome in follicular non-Hodgkin lymphoma

Alessandro Rambaldi, Emanuela Carlotti, Elena Oldani, Irene Della Starza, Michele Baccarani, Sergio Cortelazzo, Francesco Lauria, Luca Arcaini, Enrica Morra, Alessandro Pulsoni, Luigi Rigacci, Maurizio Rupolo, Francesco Zaja, Pier Luigi Zinzani, Tiziano Barbui, and Robert Foa

BLOOD, 1 MAY 2005 VOLUME 105, NUMBER 9

Table 2. Correlation between BCL2/IgH$^+$ cells in the BM at diagnosis with clinical response after CHOP

	Amount of BCL2/IgH$^+$ cells in the BM			
Clinical response	High (%)	Intermediate (%)	Low (%)	P, χ^2
Complete	5 (26)	16 (61)	22 (71)	.007
Partial	10 (53)	8 (31)	8 (26)	.1
None	4 (21)	2 (8)	1 (3)	.1

For high, n = 19; intermediate, n = 26; low, n = 31.

Table 3. Predictive factors of clinical and molecular CR after CHOP

	Univariate		Multivariate by logistic analysis	
Factors	No. CR/no. total (%)	P, χ^2	OR (95% CI)	P
Sex		.46	0.80 (0.16-4.17)	.79
Male	14/48 (29)			
Female	6/28 (21)			
Age		.77	2.85 (0.23-35.25)	.41
60 y or younger	17/66 (26)			
Older than 60 y	3/10 (30)			
LDH*		.67	1.35 (0.11-16.47)	
Yes	3/9 (33)			
No	17/64 (27)			
Bulky disease†		.018	NA	NA
Yes	0/13 (0)			
No	20/63 (32)			
BM infiltration (histology)		.009	0.32 (0.06-1.63)	.17
Yes	9/52 (17)			
No	11/24 (46)			
Clinical stage		.023	0.49 (0.02-9.53)	.63
Below III	3/4 (75)			
III or higher	17/72 (24)			
RQ-PCR on BM at diagnosis‡		< .001	11.46 (2.66-49.3)	.001
High	0/19 (0)			
Intermediate	3/26 (11)			
Low	17/31 (55)			

« Take home message » (1)

- Cytogénétique classique:
  - Image globale de la pathologie *sans* hypothèse préalable nécessaire à la réalisation des tests
- *FISH* et biologie moléculaire:
  - prescription basée sur une **hypothèse pré-test**,
  - Recherche d'anomalie(s) ciblée(s) et connue(s)

« Take home message » (2)

- *B*iologie moléculaire:
  - Si valeur diagnostique ajoutée,
  - Si résultat décisionnel dans prise en charge patient (pharmacogénomique – protocoles multicentriques).

Dans quel contexte légal ?

SERVICE PUBLIC FEDERAL
SECURITE SOCIALE

F. 2007 — 2685 [C – 2007/23020]

7 JUIN 2007. — Arrêté royal modifiant l'annexe à l'arrêté royal du 14 septembre 1984 établissant la nomenclature des prestations de santé en matière d'assurance obligatoire soins de santé et indemnités

588431-588442

Dépistage d'anomalies acquises chromosomiques ou géniques (à l'exception du réarrangement des gènes des immunoglobulines ou des gènes du récepteur des cellules T), au moyen d'une méthode de biologie moléculaire dans la phase d'investigation diagnostique d'une leucémie aiguë, y compris le lymphome de Burkitt ou le lymphome T- ou B-lymphoblastique ou l'anémie réfractaire avec excès de blastes (AREB) .....B 3000

(Maximum 5) (Règle diagnostique 1) Classe 30

588571-588582

Dépistage d'anomalies acquises chromosomiques ou géniques au moyen d'une méthode de biologie moléculaire pour le suivi d'une affection lymphoïde ou myéloïde, à l'exception d'une leucémie myéloïde chronique, pour laquelle les anomalies concernées ont été établies dans la phase d'investigation diagnostique et pour laquelle un traitement à but curatif est instauré .....B 3000

« Article 33*bis*. § 1er. Tests de biologie moléculaire sur du matériel génétique humain pour des affections acquises.

(Maximum 4) (Règle de cumul 1) Classe 30

588593- 588604

Dépistage d'un réarrangement de gène acquis, au moyen d'une méthode quantitative de biologie moléculaire pour le suivi d'une leucémie myéloïde chronique dans laquelle un réarrangement du gène bcr/abl a été établi dans la phase d'investigation diagnostique, et pour laquelle un traitement à but curatif est instauré .....B 3000

(Maximum 4) (Règle de cumul 1) Classe 30

Dans quel contexte ?

§ 5. Pour pouvoir être portées en compte, les prestations mentionnées au § 1er doivent satisfaire aux conditions suivantes :

1° Les examens 588431-588442, 588453-588464, 588475-588486, 588490-588501, 588512-588523, 588534-588545, 588851-588862 et 588556-588560 doivent être prescrits dans le cadre d'un programme de soins oncologiques reconnus pour la phase diagnostique des affections mentionnées dans la prestation, sur base de données cliniques, cytologiques, immunophénotypiques ou anatomopathologiques qui confirment l'affection mentionnée ou rendent nécessaire son infirmation;

2° Les examens 588571-588582, 588593-588604, 588770-588781, 588792-588803, 588836-588840, 588851-588862 et 588556-588560 doivent être prescrits, dans le cadre d'un programme de soins oncologiques reconnus et dans le cadre d'une stratégie de traitement et d'un plan de suivi structurés pour un patient souffrant d'une des affections mentionnées dans la prestation;