

Identification de translocations par NGS capture

Dr. Thomas Steimlé

Février 2021

Laboratoire d'oncohématologie de l'hôpital Necker

Introduction

LAL-T

Méthode

Résultats préliminaires

Introduction

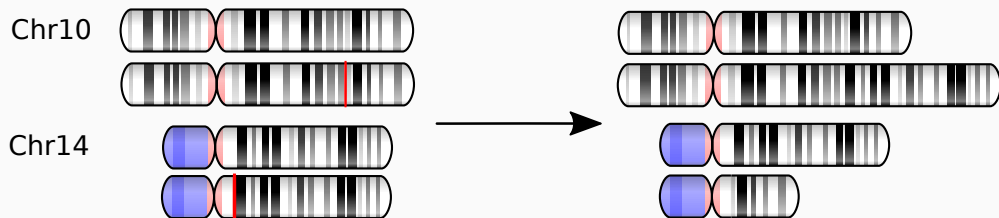
- **Rationnel** : les fragments d'ADN capturés peuvent contenir des points de cassures si ils sont à une distance proche des sondes. La séquence de ces fragments étant chimérique, l'alignement sur le génome de référence ne permet pas d'observer les translocations.
- **Objectifs** : détecter les reads chimériques et identifier les partenaires qui les composent.
- **Hypothèse** : il existe des translocations impliquant des partenaires inconnus.
- **Hypothèse alternative** : il existe des insertions de TREC.

LAL-T

Translocations réciproques équilibrées impliquant *TRD-A*

Les translocations impliquants le locus *TRD-A* sont observées dans $\approx 20\%$ des *LAL-T*. Avec pour partenaires principaux:

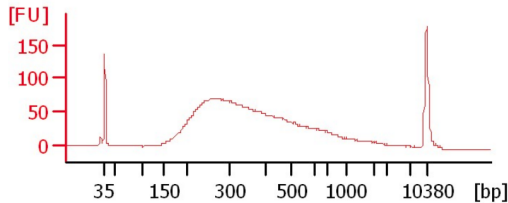
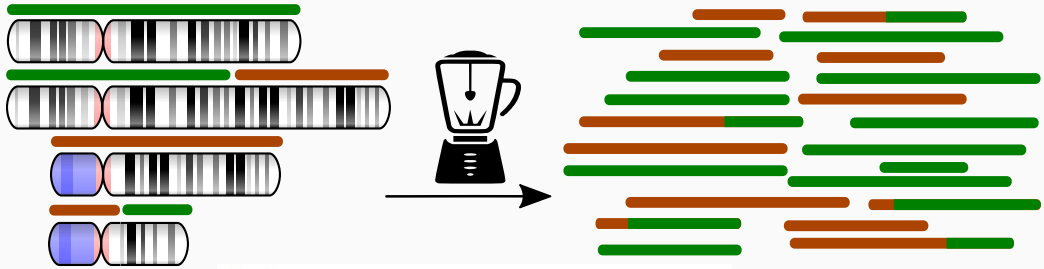
- *TLX1* t(10;14)(q24;q11) EFS allongé
- *TAL1* t(1;14)(p33;q11)
- *LMO1* t(11;14)(p15;q11)
- *LMO2* t(11;14)(p13;q11)



Méthode

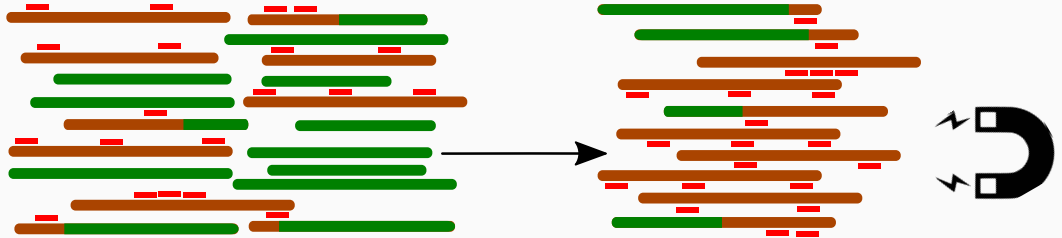
Méthode: confection de la bibliothèque

1) **Fragmentation** mécanique des chromosomes tumoraux en fragements allant de 200 à 900 pb.



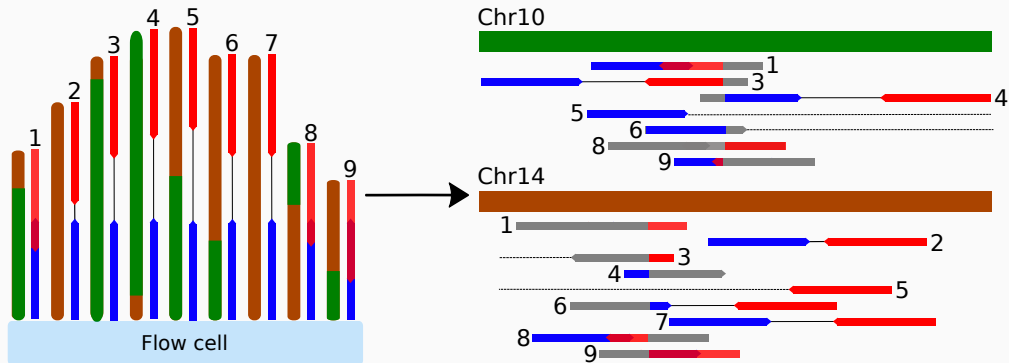
Méthode: confection de la bibliothèque

2) **Sélection** des fragments d'intérêt par sondes magnétiques (rouge) ici les sondes ont été choisies pour être complémentaires des locus *TRDV TRDD*.



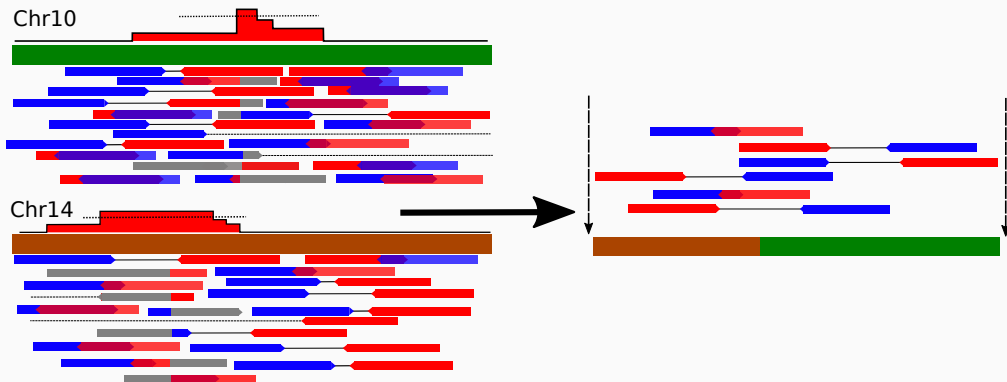
Méthode: analyse

3) **Séquençage** (paired-end 2x 150) des fragments puis **alignement** (bwa mem) des reads (R1/R2) sur le génome de référence (hg19).



Méthode: analyse

- 4) **Détection** des positions où les reads anormaux sont nombreux (SVXplorer), ces reads anormaux sont ensuite isolés (awk).
- 5) **Assemblage** entre eux des reads anormaux (spades) pour obtenir une **séquence consensus** qui est alignée sur le génome de référence afin d'identifier les partenaires et le point de cassure (bwa mem).



Résultats préliminaires

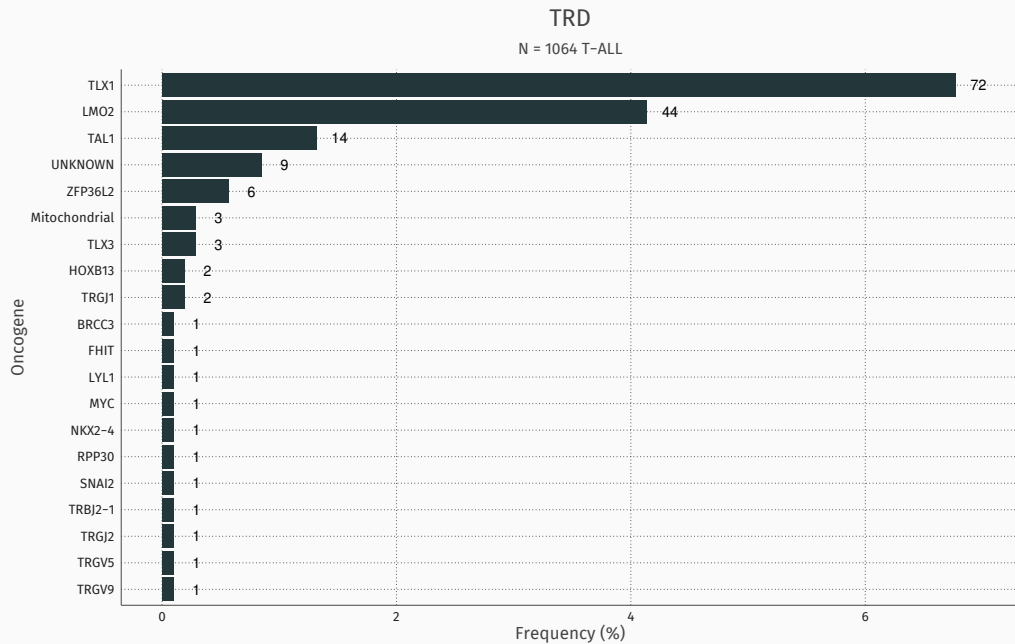
Comparaison avec la FISH TRD

- N = 265

NGS \ FISH	FISH	
	+	-
+	41	4
-	4	216

- Sensibilité = 91 %
- Spécificité = 98 %

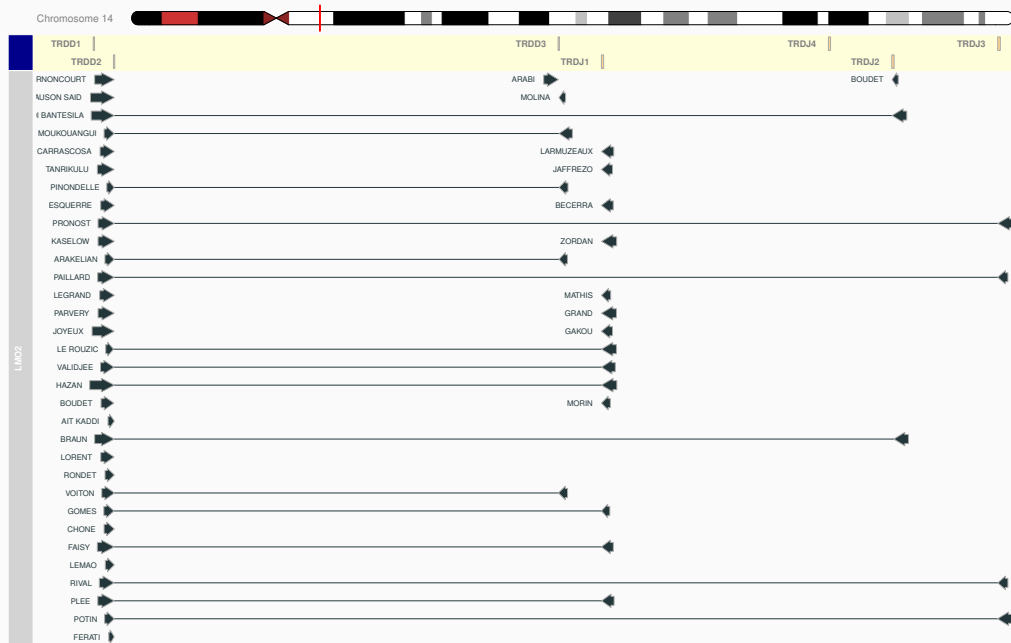
Translocations impliquant le locus TRD



Translocations impliquant le locus TRD avec pour partenaire TLX1



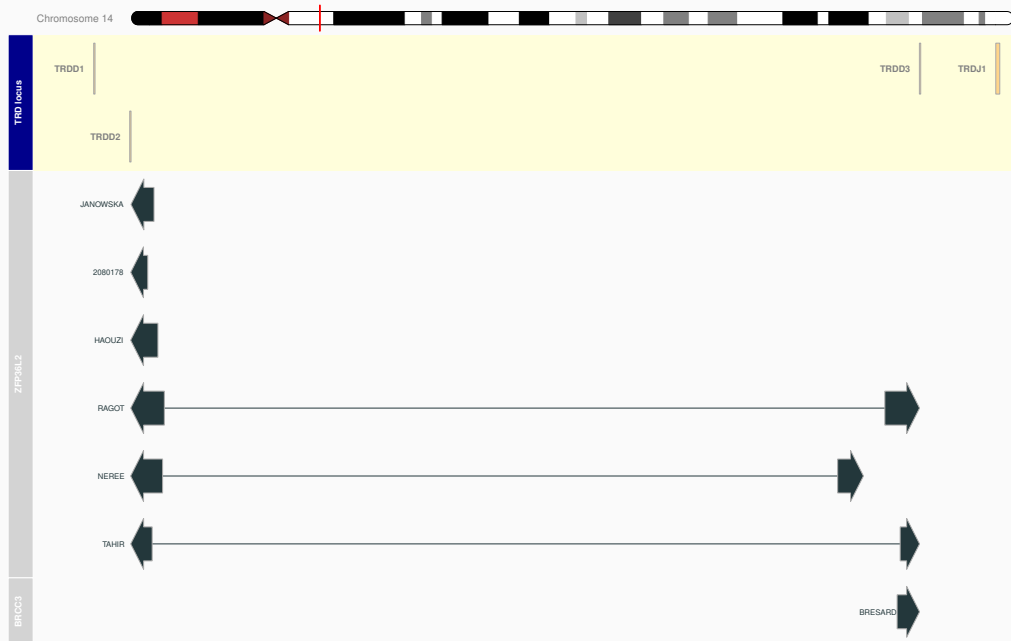
Translocations impliquant le locus TRD avec pour partenaire LMO2



Translocations impliquant le locus TRD avec pour partenaire TAL1



Translocations impliquant le locus TRD avec pour partenaire ZFP36L2



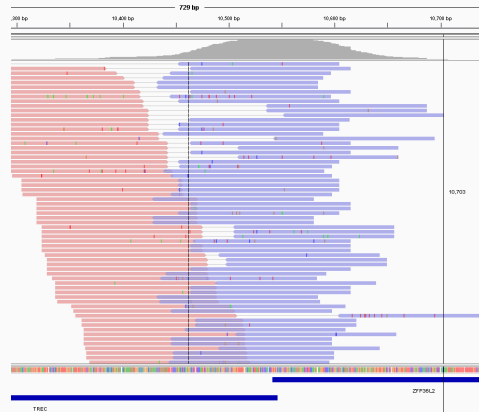
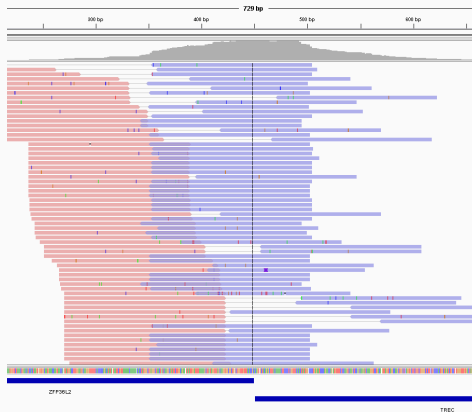
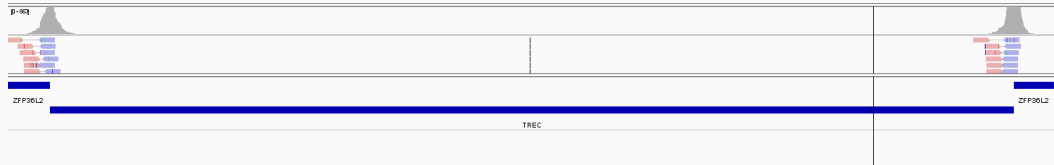
Translocations impliquant le locus TRD avec pour partenaire ZFP36L2



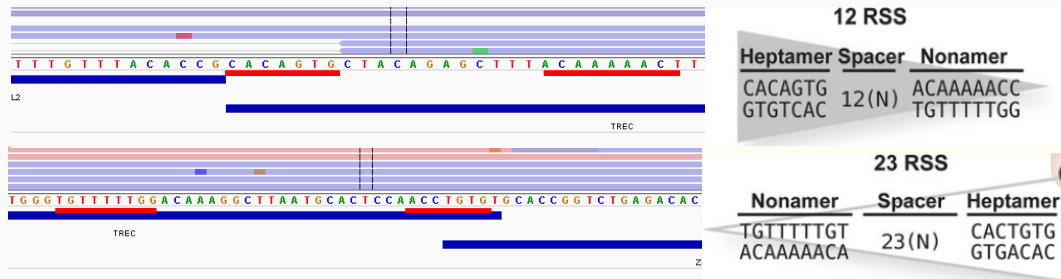
Translocations impliquant le locus TRD avec pour partenaire ZFP36L2



Alignement sur le neo-chromosome pTer-ZFP36L2-TREC-ZFP36L2-centro



Recombination signal sequences



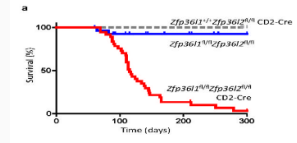
- Très probable **ré-insertion d'une boucle d'excision** du *TRD* (D2-D3).
- Cependant il semble que des translocations homozygotes doivent être éliminées (long-reads).

Caracteristiques des cas

Nom	Clonotype	NOTCH1/FBXW7	ETP	HOXA	Comm
RAGOT	2 x δ D2- δ D3	Q2398*	0	1	
TAHIR	δ D2- δ D3 // GL	P2514fs	1	1	
NEREE		FBXW7 R465H	“immature”	0	
2080178	δ D2- δ J1 // δ V1- δ J2	(NRAS)	0	0	
HAOUZI	δ D2- δ J1 // δ V1- δ J2	P2443fs	0	0	e1a2
JANOWSKA		T1602S		0	

- Clonotypes compatibles
- Prédominance de mutations **PEST** sur la voie NOTCH1 ($\approx 80\%$)

- Molécule de liaison aux ARNm (RBP) en 3' UTR.
- Régule l'expression en favorisant la dégradation de certains ARNm (excision de la queue polyA).
- dKO ($L1^{fl/fl}L2^{fl/fl}$ cd2-cre) murin → LAL-T.
- Réduction de l'expression d'icTCR- β dans la pop DN dKO.
- Augmentation de l'expression de **Notch1** relativement à thymus normal et notamment dans la pop DN.
- L'expression de ZFP36L2 serait régulée positivement par Tcf-1.



Hodson DJ, Janas ML, Galloway A, et al. Deletion of the RNA-binding proteins ZFP36L1 and ZFP36L2 leads to perturbed thymic development and T lymphoblastic leukemia. Nat Immunol. 2010;11(8):717-724

Wang F, Qi Z, Yao Y, et al. Exploring the stage-specific roles of Tcf-1 in T cell development and malignancy at single-cell resolution. Cell Mol Immunol. 2021;18(3):644-659. doi:10.1038/s41423-020-00527-1

- L'**hyperméthylation** d'un super enhancer de ZFP36L2 est observée dans les cancers squameux de l'oesophage (~1 kb en aval du 3'UTR).
- Des **mutations récurrentes** de type fs ou ponctuelle ont été observées dans les LA. Jurkat = P190L, CEM et PEER = A329V. Ainsi que des délétions.
- Dans LT_M liaison aux pre-ARNm notamment de INFγ, TNF, Pim1 puis **bloque la formation du complexe ribosomal** et la traduction. Lors de l'activation des LT_M cette **inhibition est rapidement levée** et permet une traduction importante.

Lin, De-Chen et al. "Identification of distinct mutational patterns and new driver genes in oesophageal squamous cell carcinomas and adenocarcinomas." Gut vol. 67;10 (2018): 1769-1779. doi:10.1136/gutjnl-2017-314607

Iwanaga E, Nanri T, Mitsuya H, Asou N. Mutation in the RNA binding protein TIS11D/ZFP36L2 is associated with the pathogenesis of acute leukemia. Int J Oncol. 2011;38(1):25-31.

Salerno F, Engels S, van den Biggelaar M, et al. Translational repression of pre-formed cytokine-encoding mRNA prevents chronic activation of memory T cells. Nat Immunol. 2018;19(8):828-837. doi:10.1038/s41590-018-0155-6

Supp