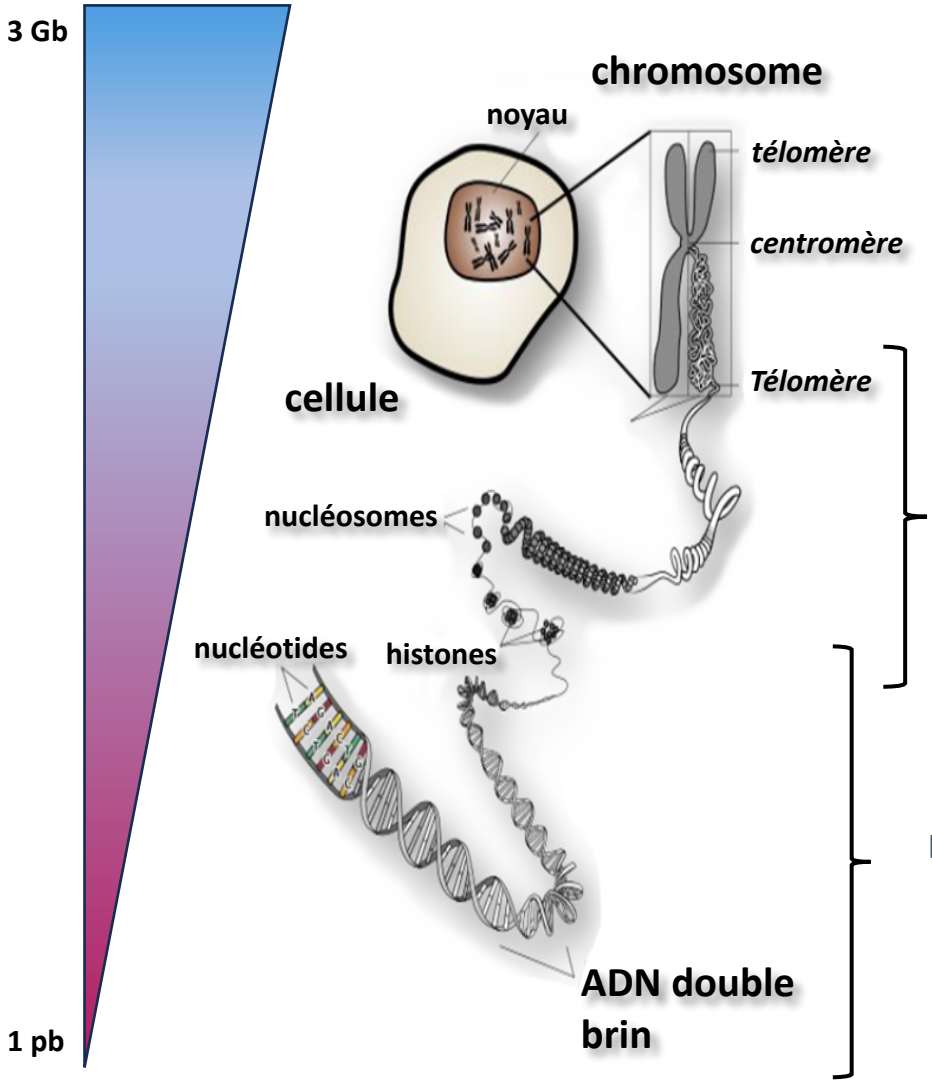
# Les fusions géniques
## Interprétation selon les techniques
## Messages à retenir

Daniel Pissaloux
*Biologiste Moléculaire*
*Coordinateur de l'UF de Pathologie Moléculaire*
*Département de Biopathologie*
*CENTRE LÉON BÉRARD*

2023
22 au 24 novembre
CARREFOUR PATHOLOGIE

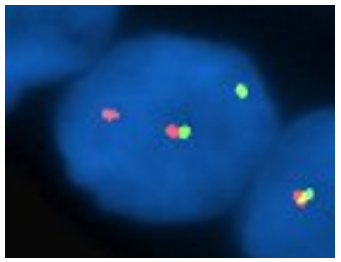
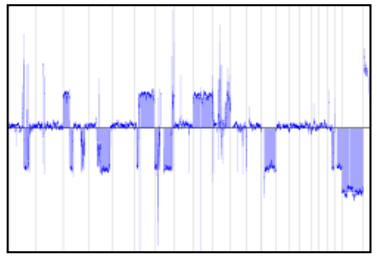
# Détection des fusions géniques au Centre Léon Bérard




**Cytogénétique conventionnelle**
*(~ 2 Mb – 3 Gb)*

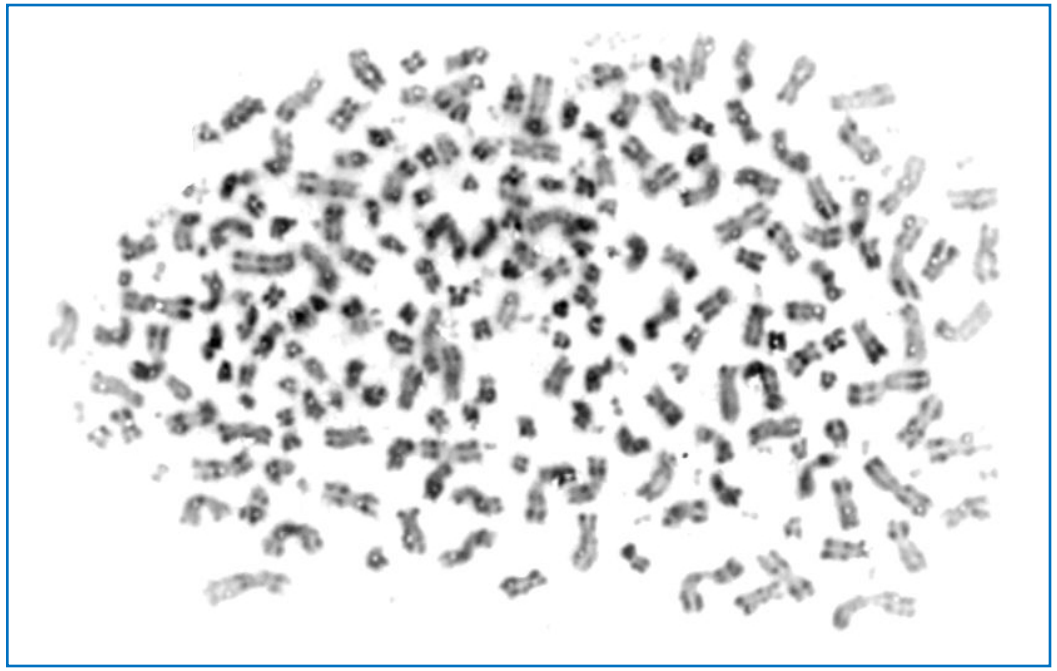
**Cytogénétique moléculaire**
*(~ 10 kb - 3 Gb)*

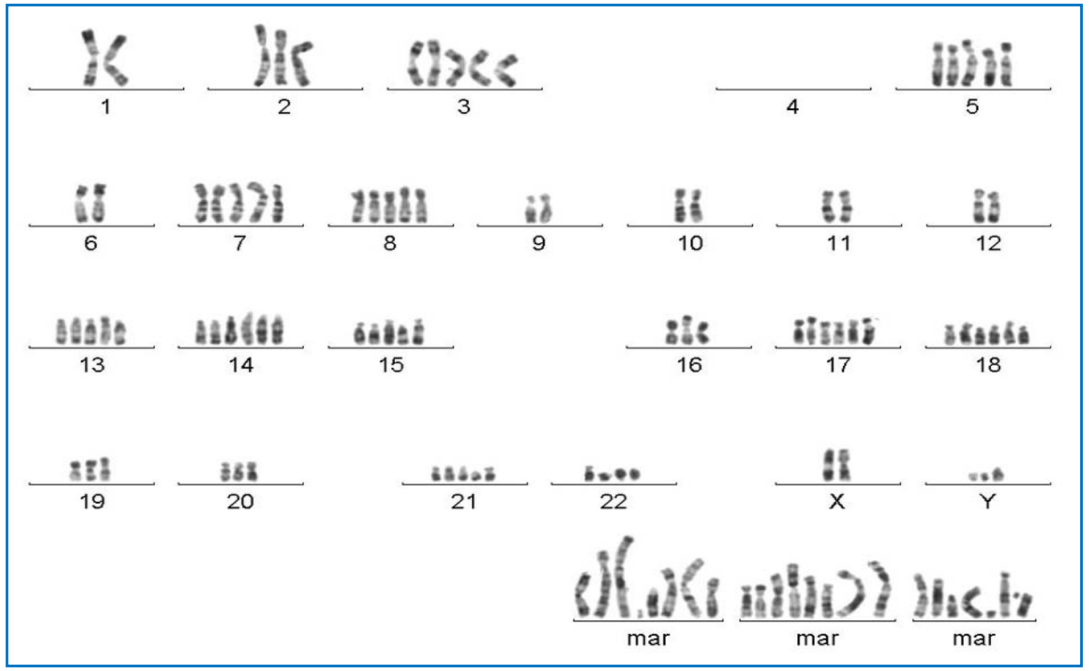
**Biologie moléculaire**
*(~ 1pb – 3 Gb)*

| Méthodes ciblées | Méthodes pangénomiques |
|---|---|
| | caryotype |
|  FISH |  puces CGH |
| PCR / qPCR / dPCR | RNAseq (panels, WERS) |

# Exemple de mise en difficulté du caryotype

- Génomes complexes, chromosomes inclassables



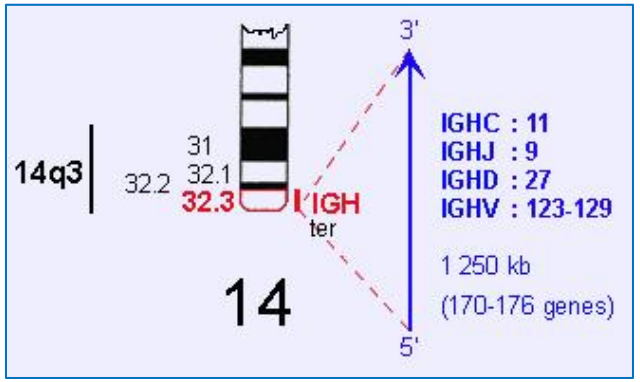



⇒ En particulier, bandes très remaniées et translocations difficilement détectables

# Exemple de mise en difficulté du caryotype (suite)

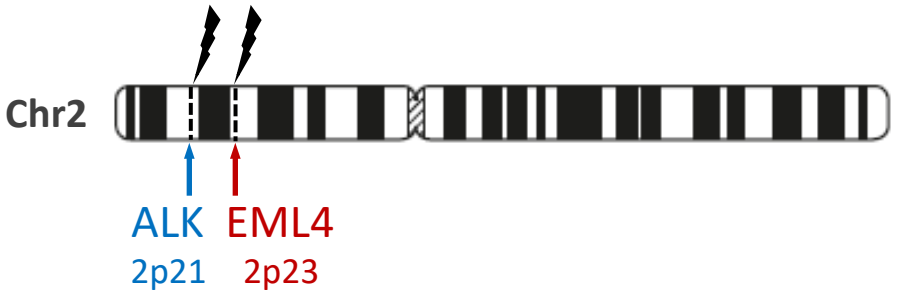
- Altérations de très petite taille :
  - Translocations en positions télomériques

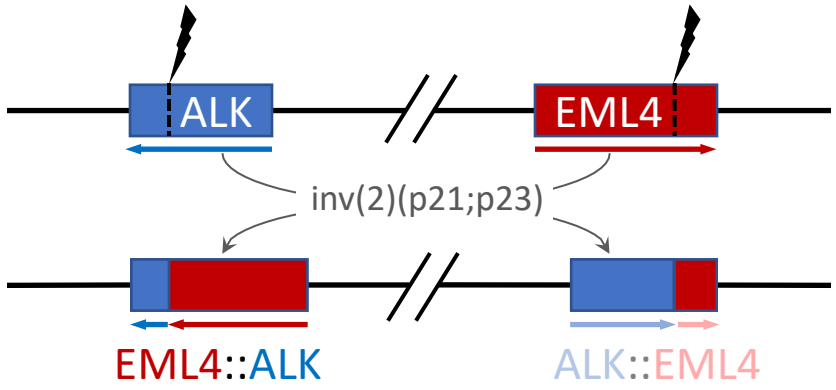
    Ex : translocations impliquant IGH




  - Réarrangements intrachromosomiques sur loci proches (inversions, délétions)

    Ex : EML4::ALK



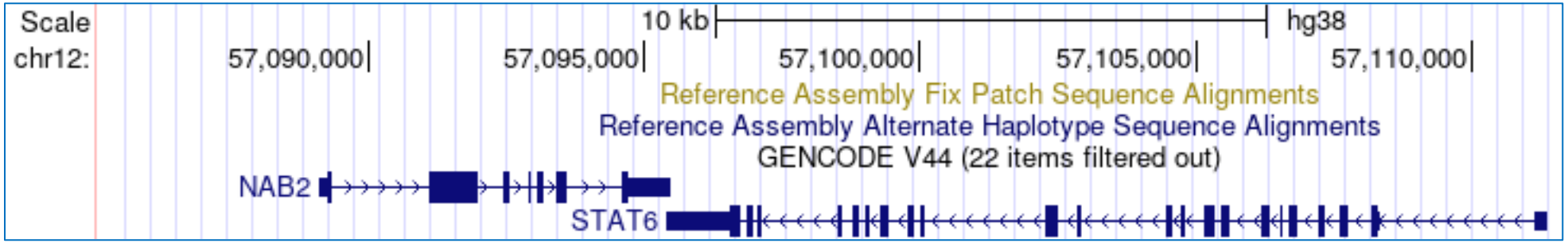




⇒ Résolution largement insuffisante du caryotype pour de nombreuses fusions de description récente

# Exemples de mise en difficulté de la technique FISH

- Crypticité totale

Ex : inversion NAB2::STAT6 dans les tumeurs fibreuses solitaires

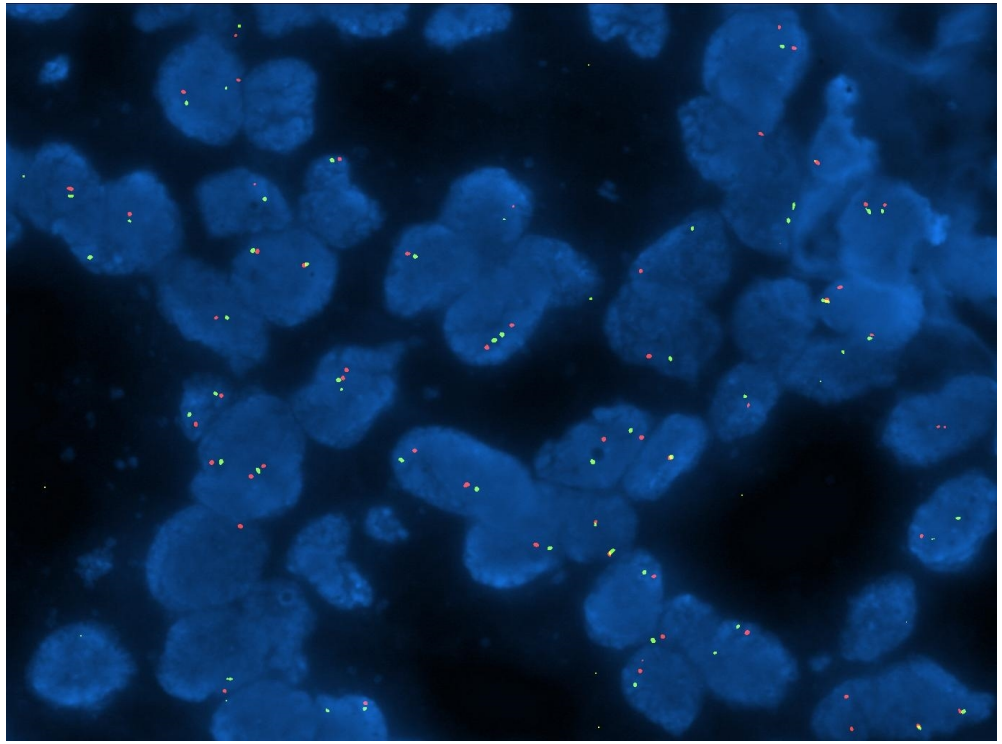



⇒ Gènes contigus, design de sonde FISH break-apart impossible

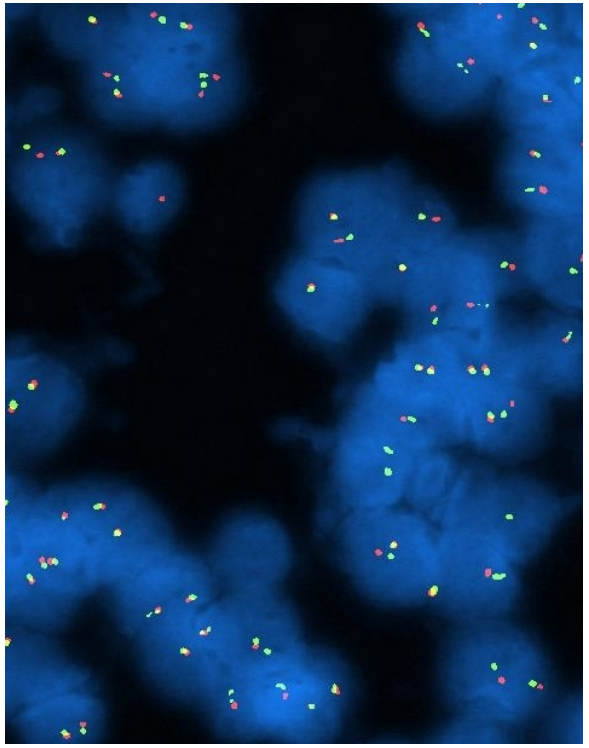
# Exemples de mise en difficulté de la technique FISH (suite)

- Inversions intra-chromosomiques

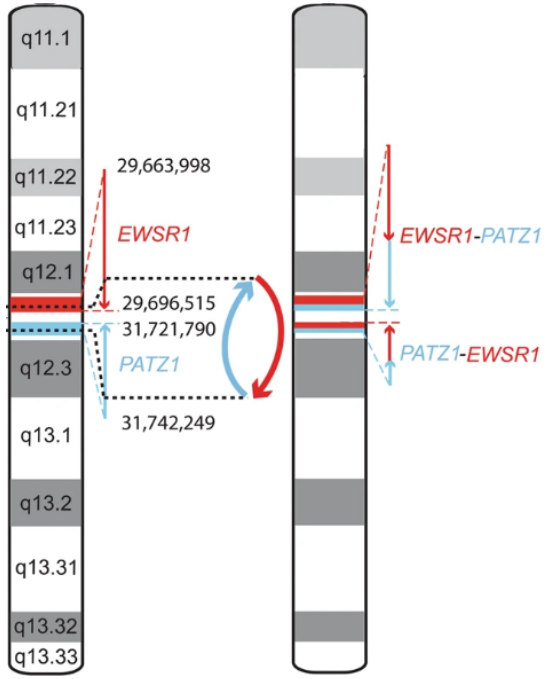
  Ex : fusions EML4::ALK (ADK poumon / TMI / TS…), sarcomes EWSR1::PATZ1



**Vysis LSI ALK (2p23) Dual Color BA**
**ADK pulmonaire EML4::ALK**



**ZytoLight SPEC EWSR1 Dual Color BA**
**Sarcome EWSR1::PATZ1**



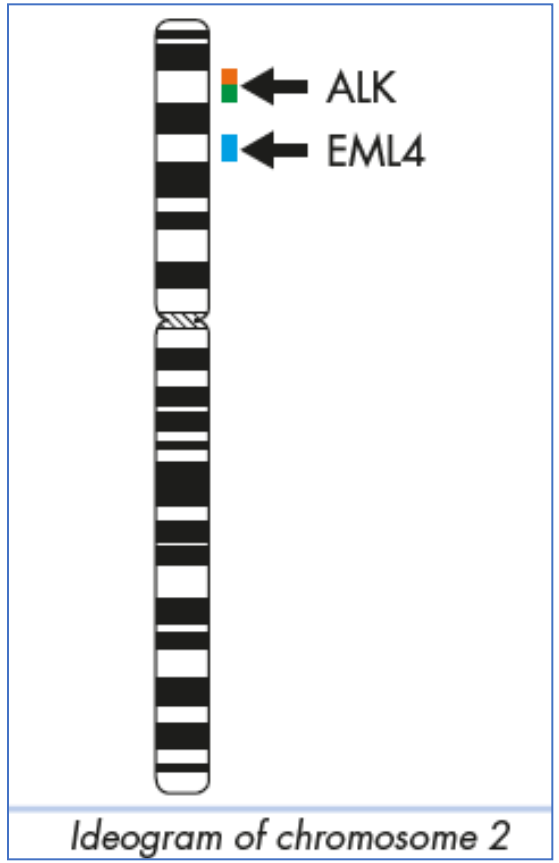

(*PMID: 31189996, 2019*)

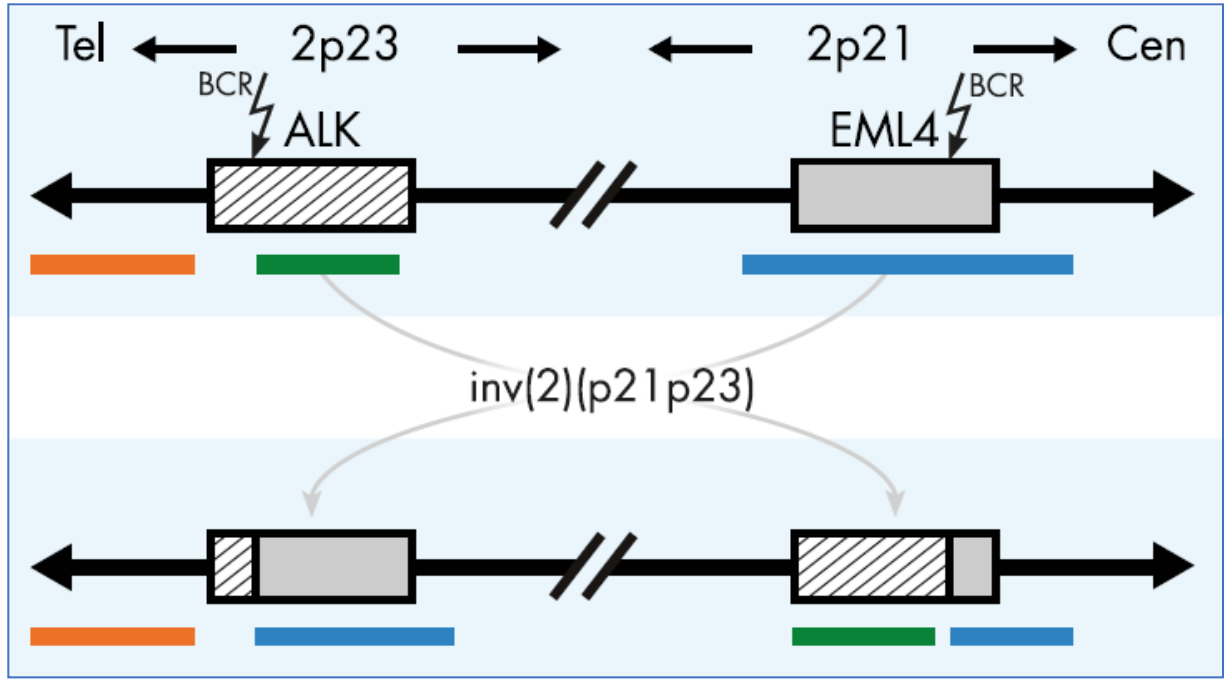
⇒ Faibles espacements ou artéfacts de dégradation ?

# Exemples de mise en difficulté de la technique FISH (suite)

- Inversions intra-chromosomiques : solution possible

  Ex : sonde 3 couleur BA + fusion pour les réarrangements EML4::ALK



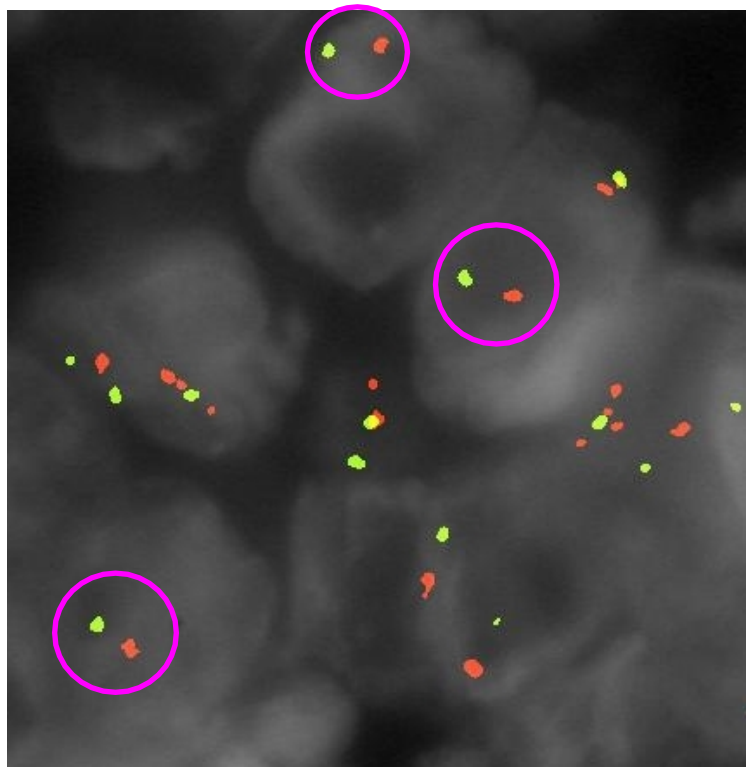




**ZytoLight SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe**

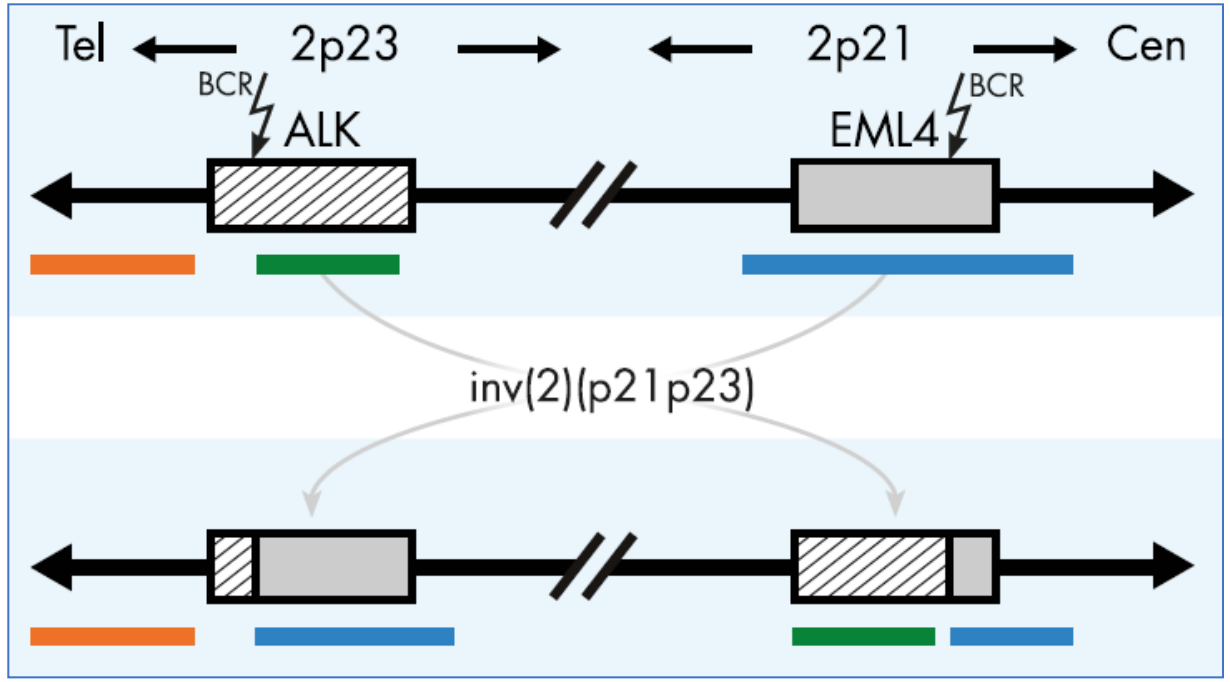
# Exemples de mise en difficulté de la technique FISH (suite)

- Inversions intra-chromosomiques : solution possible

  Ex : sonde 3 couleur BA + fusion pour les réarrangements EML4::ALK



**ADK pulmonaire**
**Image sans signal aqua**

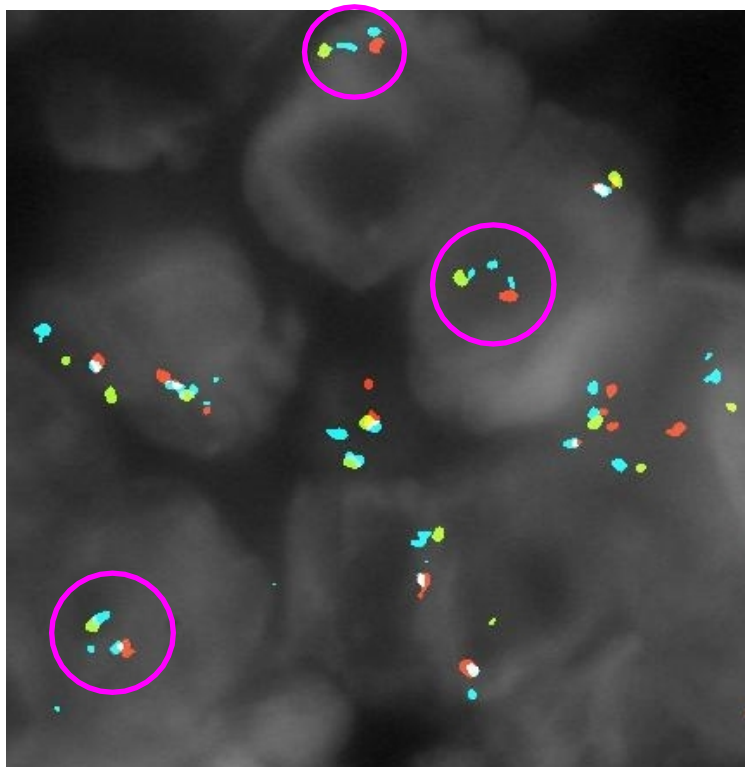



**ZytoLight SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe**

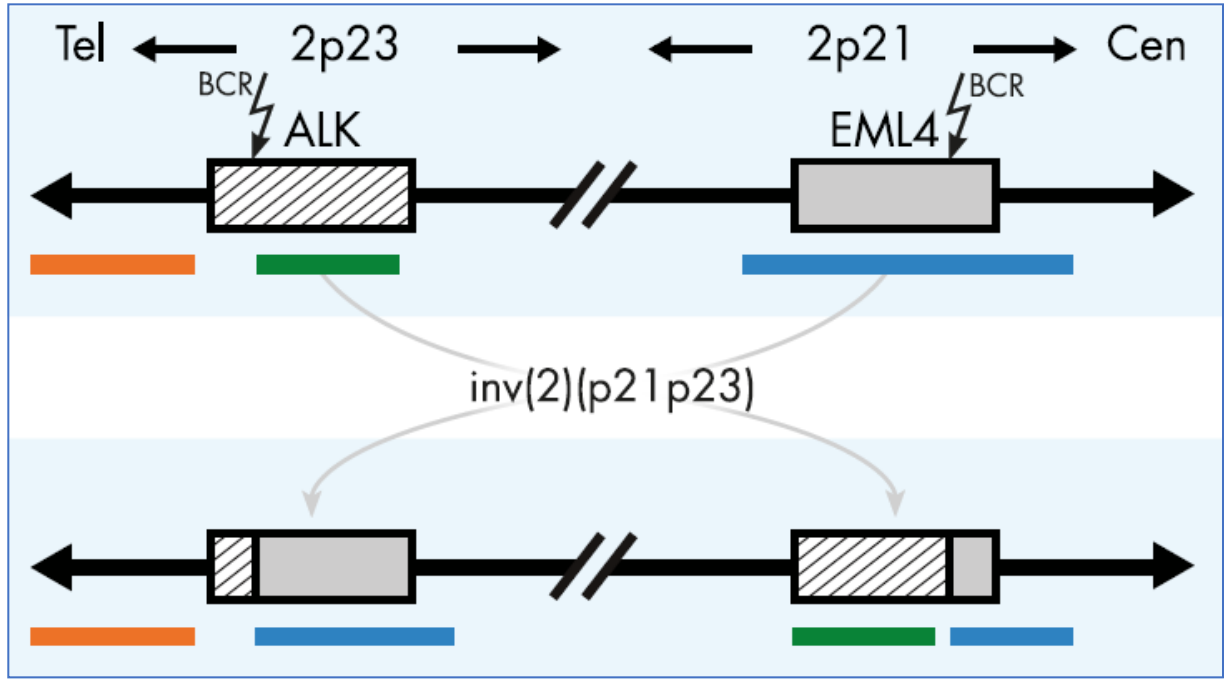
# Exemples de mise en difficulté de la technique FISH (suite)

- Inversions intra-chromosomiques : solution possible

  Ex : sonde 3 couleur BA + fusion pour les réarrangements EML4::ALK



**ADK pulmonaire**
**Image avec signal aqua**




**ZytoLight SPEC ALK/EML4 TriCheck Probe**

⇒ À adopter en 1ère intention pour les ADK pulmonaires

# Exemples de mise en difficulté de la technique FISH (suite)

- Attention à la non spécificité du gène ciblé

  Ex : sonde EWSR1 BA

| Histotype | Translocation | Fusion |
|---|---|---|
| Chondrosarcome myxoïde extrasquelettique | t(9;22)(q22;q12) | EWSR1::NR4A3 |
| Ewing / PNETs | t(11;22)(q24;q12) | EWSR1::FLI1 |
| Sarcome EWSR1::PATZ1 | t(22;22)(q12;q12) | EWSR1::PATZ1 |
| Fibrosarcome épithélioïde sclérosant / sarcome fibromyxoïde de bas grade | t(11;22)(p11;q12) | EWSR1::CREB3L1 |
| Histiocytome fibreux angiomatoïde | t(2;22)(q33;q12) | EWSR1::CREB1 |
| Liposarcome myxoïde / à cellules rondes | t(12;22)(q13;q12) | EWSR1::DDIT3 |
| Rhabdomyosarcome épithélioïde | t(12;22)(q13q12) | EWSR1::TFCP2 |
| Sarcome à cellules claires | t(12;22)(q13;q12) | EWSR1::ATF1 |
| Sarcome osseux EWSR1::NFATC2 | t(20;22)(q13;q12) | EWSR1::NFATC2 |
| Sarcome myxoïde pulmonaire primitif | t(2;22)(q33;q12) | EWSR1::CREB1 |
| Tumeur à cellules fusiformes fibroblastique acrale | t(15;22)(q22;q12) | EWSR1::SMAD3 |
| Tumeur desmoplastique à petites cellules rondes | t(11;22)(p13;q12) | EWSR1::WT1 |
| Tumeur myoépithéliale | t(1;22)(q23;q12) | EWSR1::PBX1 |
| Mésothéliome péritonéal | t(14;22)(q32;q12) | EWSR1::YY1 |

⇒ Bien penser aux diagnostics différentiels possibles

# Exemples de mise en difficulté de la technique FISH (suite)

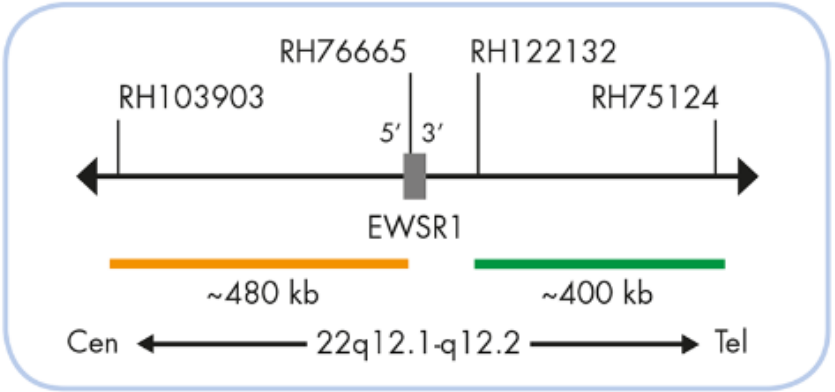
- Attention à la non spécificité du gène ciblé : solutions possibles

  - Si possible, privilégier le partenaire 3’ en FISH

    Ex : NR4A3 BA pour les chondrosarcomes myxoïdes extrasquelettiques
    WT1 BA pour les tumeurs desmoplastiques à petites cellules rondes
    DDIT3 BA pour les liposarcomes myxoïdes…

  - Pour certaines tumeurs, sondes 3 couleurs BA + fusion disponibles

    Ex : ZytoLight ® SPEC EWSR1/FLI1 TriCheckTM Probe pour confirmer un sarcome d’Ewing



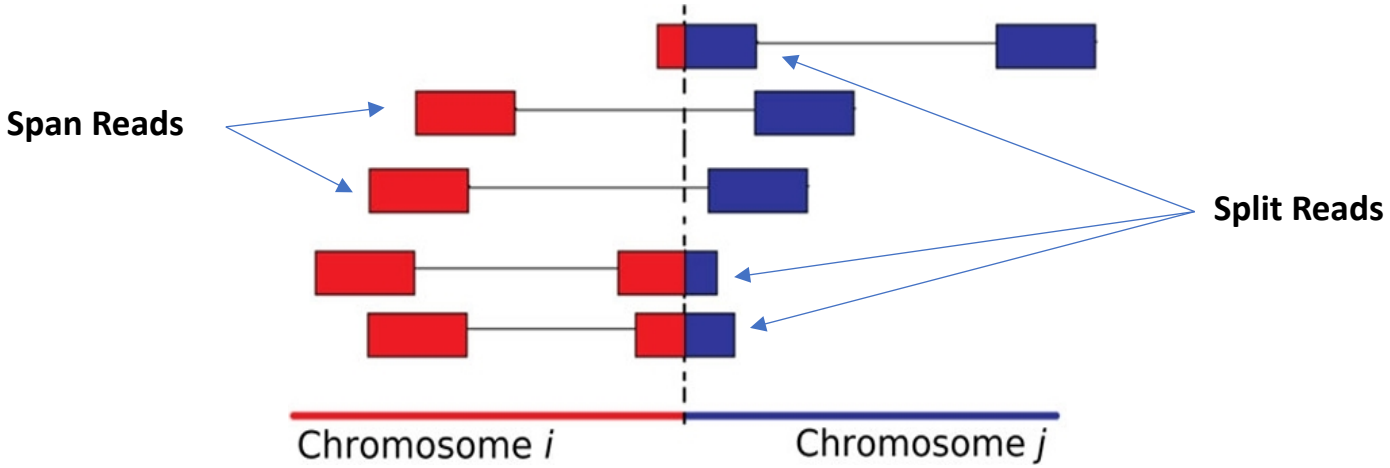
*SPEC EWSR1 Probe map (not to scale).*

*SPEC FLI1 Probe map (not to scale).*

⇒ S’adapter au maximum au contexte clinique

# RNAseq : détection des fusions par WERS au CLB

- 5 algorithmes : FusionMap, STARFusion, ERICScript, FUSIONcatcher, ARRIBA
- Principe : recherche de séquences chimériques sur les paired ends

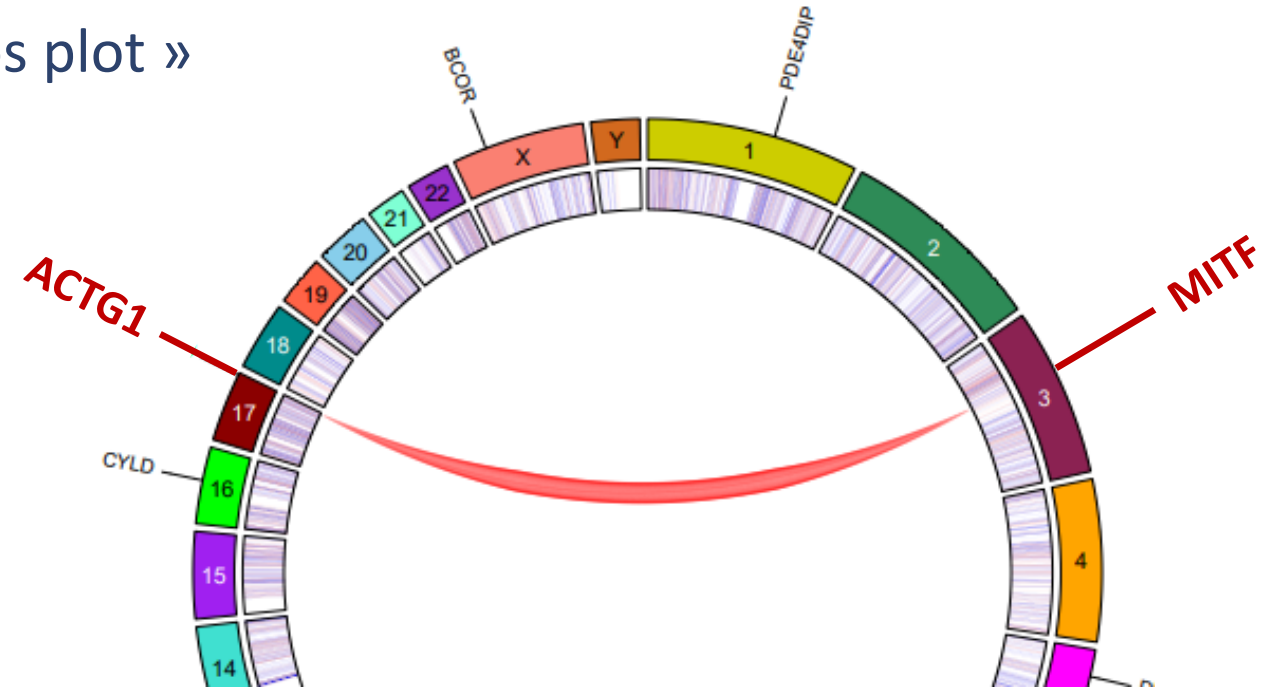



- Méta-analyse / synthèse

| FusionGene | Left_break_pc | Right_break_p | nb_tools | Fusio | STARF | ERICSc | FUSIO | ARRIBA | SplitR | Spanl | Frame | Transcripts |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Known_Fusion:ACTG1--MITF | 17:81511903:- | 3:69937822:+ | 5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 168 | 131 | InFrame | ACTG1_ENST00000573283_(e3)--MITF_ENST00000352241_(e3) |
| Known_Fusion:MITF--ACTG1 | 3:69959420:+ | 17:81512360:- | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | InFrame | MITF_ENST00000352241_(e9)--ACTG1_ENST00000573283_(2_five_prime_utr) |
| Known_Fusion:KLHDC2--NEMF | 14:49786385:+ | 14:49796109:- | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 5 | 1 | NoFrame | KLHDC2_ENST00000298307_(13_three_prime_utr)--NEMF_ENST00000555863_(processed_t |
| Known_Fusion:RCL1--JAK2 | 9:4849550:+ | 9:5021963:+ | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 3 | 2 | NoFrame | RCL1_ENST00000381750_(e8)--JAK2_ENST00000381652_(3_five_prime_utr) |
| Known_Fusion:GNG10--UGCG | 9:111666946:+ | 9:111914605:+ | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | NoFrame | GNG10_ENST00000374293_(2_three_prime_utr)--UGCG_ENST00000374279_(e2) |
| ZNF717-ITD | 3:75737680:- | 3:75737754:- | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 19 | 0 | InFrame | ZNF717_ENST00000652011_(802bp_INset_e5)--ZNF717_ENST00000652011_(1591bp_INset_ |

# RNAseq : détection des fusions par WERS au CLB

- Représentation de type « circos plot »



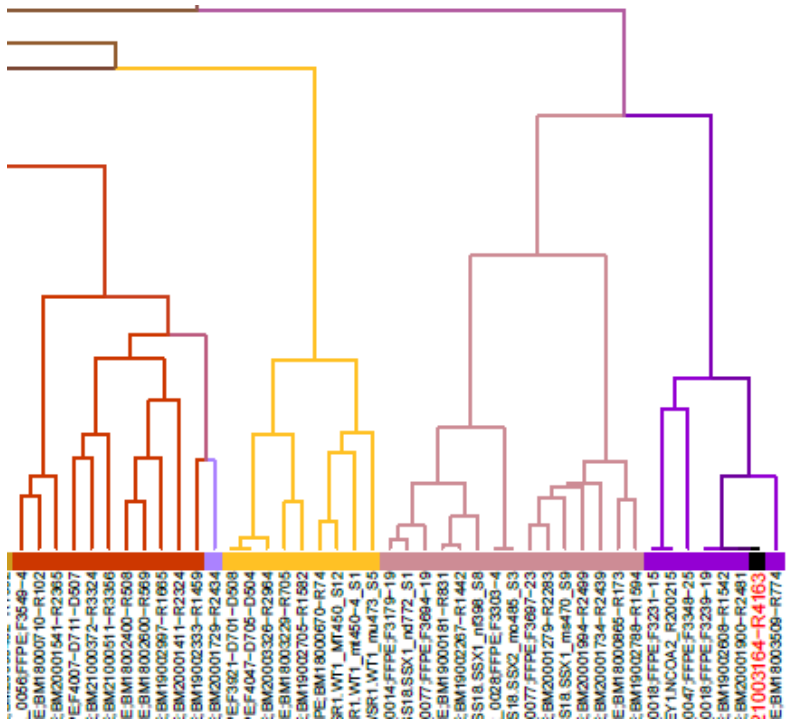

- Méta-analyse / synthèse

| FusionGene | Left_break_pc | Right_break_p | nb_tools | Fusio | STARF | ERICSc | FUSIO | ARRIBA | SplitR | Spanl | Frame | Transcripts |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Known_Fusion:ACTG1--MITF | 17:81511903:- | 3:69937822:+ | 5 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 168 | 131 | InFrame | ACTG1_ENST00000573283_(e3)--MITF_ENST00000352241_(e3) |
| Known_Fusion:MITF--ACTG1 | 3:69959420:+ | 17:81512360:- | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | InFrame | MITF_ENST00000352241_(e9)--ACTG1_ENST00000573283_(2_five_prime_utr) |
| Known_Fusion:KLHDC2--NEMF | 14:49786385:+ | 14:49796109:- | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 5 | 1 | NoFrame | KLHDC2_ENST00000298307_(13_three_prime_utr)--NEMF_ENST00000555863_(processed_t |
| Known_Fusion:RCL1--JAK2 | 9:4849550:+ | 9:5021963:+ | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 3 | 2 | NoFrame | RCL1_ENST00000381750_(e8)--JAK2_ENST00000381652_(3_five_prime_utr) |
| Known_Fusion:GNG10--UGCG | 9:111666946:+ | 9:111914605:+ | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | NoFrame | GNG10_ENST00000374293_(2_three_prime_utr)--UGCG_ENST00000374279_(e2) |
| ZNF717-ITD | 3:75737680:- | 3:75737754:- | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 19 | 0 | InFrame | ZNF717_ENST00000652011_(802bp_INset_e5)--ZNF717_ENST00000652011_(1591bp_INset_ |

# L’apport diagnostic de la classification des profils d’expression

- Spécificité du WERS par rapport à du RNAseq panel
- Méthodes de clustering classiques (Pearson / Spearman), algorithmes t-SNE et UMAP

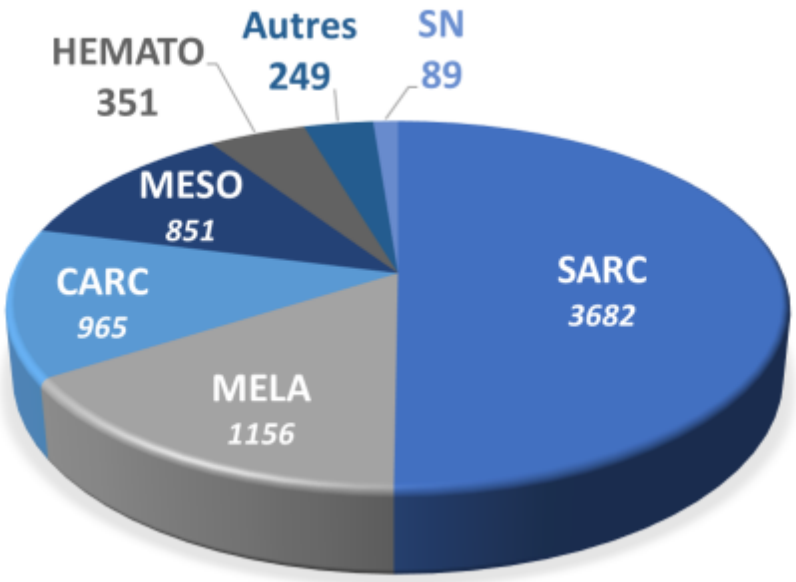
Ex : clustering d’un chondrosarcome mésenchymateux au sein du groupe des CSM

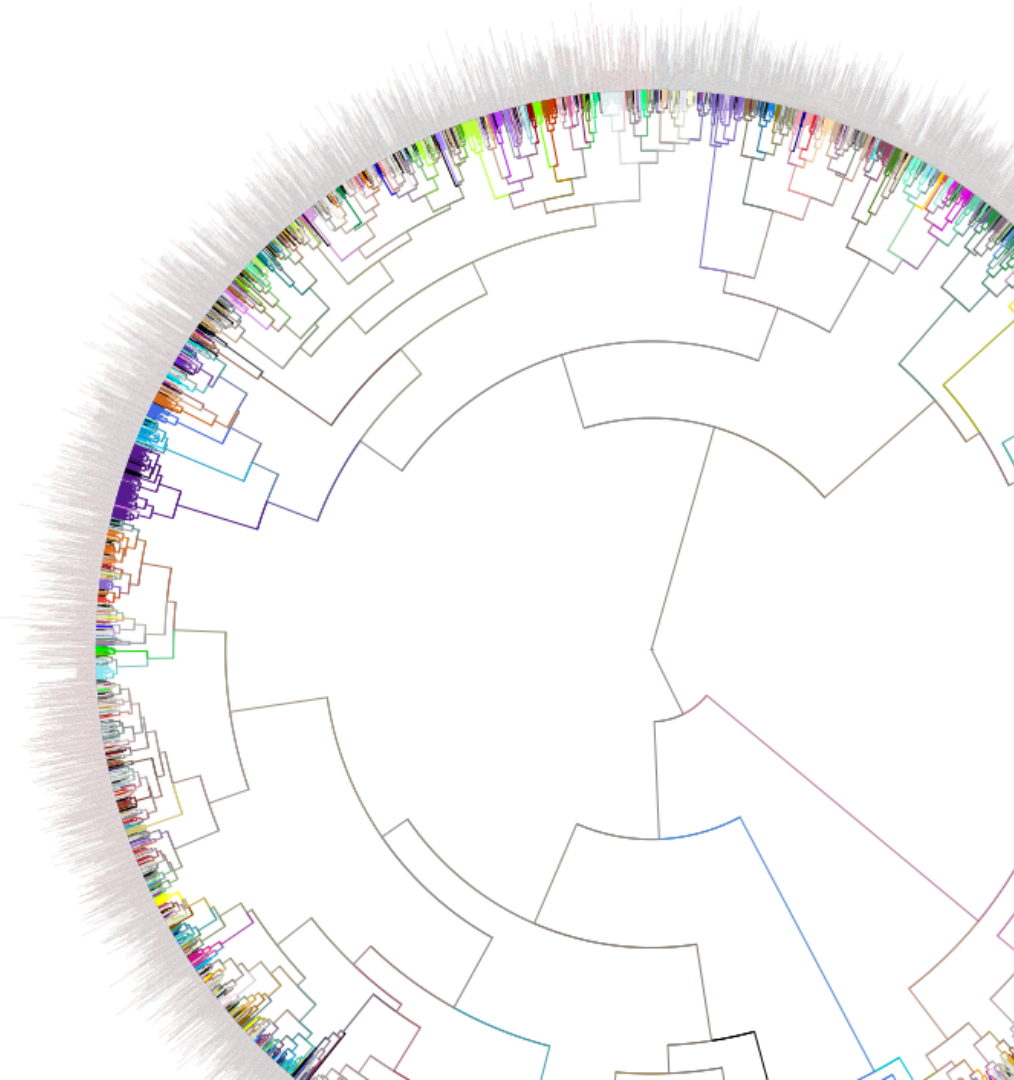


| ******** Parallel Consensus Clustering ********* | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| SampleID | MappedRea( | Unique_Map | Duplicate_fr | Cellularity | Run | SampleNam | IDPub | Mutations | MainFusions | OncoEvent | Tumor_Type |
| 0018;FFPE;F3 | 106 385 296 | NA | NA | NA | 170118_NB5( | NA | CLB_RNA_01 | NA | HEY1.NCOA2 | HEY1.NCOA2 | Mesenchym |
| 0415;FFPE;BI | 114 033 119 | 68 296 488 | 0.4010820 | 0.8 | 190926_NB5( | NA | CLB_RNA_23 | NA | HEY1.NCOA2 | HEY1.NCOA2 | Mesenchym |
| 0132;FFPE;BI | 98 755 994 | 57 292 994 | 0.4198530 | NC | 200709_A003 | NA | CLB_RNA_32 | SETD2.Q1292 | HEY1.NCOA2 | HEY1.NCOA2 | Mesenchym |
| 0305;FFPE;BI | 34 177 103 | 12 852 915 | 0.6239320 | NC | 190110_NB5( | NA | CLB_RNA_17 | OCA2.pN489 | HEY1.NCOA2 | HEY1.NCOA2 | Mesenchym |
| R200215 | 287 678 706 | 130 395 839 | 0.5467310 | NA | NA | NA | CLB_RNA_36 | NA | HEY1.NCOA2 | HEY1.NCOA2 | Mesenchym |
| 0018;FFPE;F3 | 53 022 072 | NA | NA | NA | 170118_NB5( | NA | CLB_RNA_01 | NA | HEY1.NCOA2 | HEY1.NCOA2 | Mesenchym |
| 0047;FFPE;F3 | 29 907 939 | NA | NA | NA | 170516_NB5( | NA | CLB_RNA_02 | NA | HEY1.NCOA2 | HEY1.NCOA2 | Mesenchym |
| ******** Clustering consensus ********* | | | | | | | | | | | |
| SampleID | MappedRea( | Unique_Map | Duplicate_fr | Cellularity | Run | SampleNam | IDPub | Mutations | MainFusions | OncoEvent | Tumor_Type |
| 0132;FFPE;BI | 98 755 994 | 57 292 994 | 0.4198530 | NC | 200709_A003 | NA | CLB_RNA_32 | SETD2.Q1292 | HEY1.NCOA2 | HEY1.NCOA2 | Mesenchym |
| 0415;FFPE;BI | 114 033 119 | 68 296 488 | 0.4010820 | 0.8 | 190926_NB5( | NA | CLB_RNA_23 | NA | HEY1.NCOA2 | HEY1.NCOA2 | Mesenchym |
| 0018;FFPE;F3 | 106 385 296 | NA | NA | NA | 170118_NB5( | NA | CLB_RNA_01 | NA | HEY1.NCOA2 | HEY1.NCOA2 | Mesenchym |
| 0305;FFPE;BI | 34 177 103 | 12 852 915 | 0.6239320 | NC | 190110_NB5( | NA | CLB_RNA_17 | OCA2.pN489 | HEY1.NCOA2 | HEY1.NCOA2 | Mesenchym |
| 0018;FFPE;F3 | 53 022 072 | NA | NA | NA | 170118_NB5( | NA | CLB_RNA_01 | NA | HEY1.NCOA2 | HEY1.NCOA2 | Mesenchym |
| R200215 | 287 678 706 | 130 395 839 | 0.5467310 | NA | NA | NA | CLB_RNA_36 | NA | HEY1.NCOA2 | HEY1.NCOA2 | Mesenchym |
| 0047;FFPE;F3 | 29 907 939 | NA | NA | NA | 170516_NB5( | NA | CLB_RNA_02 | NA | HEY1.NCOA2 | HEY1.NCOA2 | Mesenchym |
| ******** Consensus tSNE (Expressed CDS w/o skin & infla genes) ********* | | | | | | | | | | | |
| SampleID | MappedRea( | Unique_Map | Duplicate_fr | Cellularity | Run | SampleNam | IDPub | Mutations | MainFusions | OncoEvent | Tumor_Type |
| 0132;FFPE;BI | 98 755 994 | 57 292 994 | 0.4198530 | NC | 200709_A003 | NA | CLB_RNA_32 | SETD2.Q1292 | HEY1.NCOA2 | HEY1.NCOA2 | Mesenchym |
| 0415;FFPE;BI | 114 033 119 | 68 296 488 | 0.4010820 | 0.8 | 190926_NB5( | NA | CLB_RNA_23 | NA | HEY1.NCOA2 | HEY1.NCOA2 | Mesenchym |
| 0018;FFPE;F3 | 106 385 296 | NA | NA | NA | 170118_NB5( | NA | CLB_RNA_01 | NA | HEY1.NCOA2 | HEY1.NCOA2 | Mesenchym |
| 0047;FFPE;F3 | 29 907 939 | NA | NA | NA | 170516_NB5( | NA | CLB_RNA_02 | NA | HEY1.NCOA2 | HEY1.NCOA2 | Mesenchym |
| 0305;FFPE;BI | 34 177 103 | 12 852 915 | 0.6239320 | NC | 190110_NB5( | NA | CLB_RNA_17 | OCA2.pN489 | HEY1.NCOA2 | HEY1.NCOA2 | Mesenchym |
| R200215 | 287 678 706 | 130 395 839 | 0.5467310 | NA | NA | NA | CLB_RNA_36 | NA | HEY1.NCOA2 | HEY1.NCOA2 | Mesenchym |
| 0018;FFPE;F3 | 53 022 072 | NA | NA | NA | 170118_NB5( | NA | CLB_RNA_01 | NA | HEY1.NCOA2 | HEY1.NCOA2 | Mesenchym |
| ******** Consensus tSNE (Most Variant Genes) ********* | | | | | | | | | | | |
| SampleID | MappedRea( | Unique_Map | Duplicate_fr | Cellularity | Run | SampleNam | IDPub | Mutations | MainFusions | OncoEvent | Tumor_Type |
| 0132;FFPE;BI | 98 755 994 | 57 292 994 | 0.4198530 | NC | 200709_A003 | NA | CLB_RNA_32 | SETD2.Q1292 | HEY1.NCOA2 | HEY1.NCOA2 | Mesenchym |
| 0018;FFPE;F3 | 106 385 296 | NA | NA | NA | 170118_NB5( | NA | CLB_RNA_01 | NA | HEY1.NCOA2 | HEY1.NCOA2 | Mesenchym |

# Puissance de la cohorte de référence du WERS au CLB

- Taille de la cohorte pour les analyses de types GEP (Août 2023) : 7 343 lésions (/ 8 277 cas séquencés)
- Spectres lésionnels (expertises médicales en Biopathologie) :



# Exemples de mise en difficulté du RNAseq

- Séquences complexes à la jonction

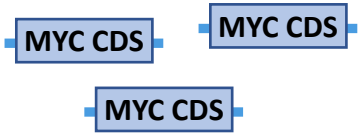
⇒ Séquence non alignées
= perdues par les algorithmes

- Promoter swapping

Ex : Réarrangement IGH::MYC

Cassure ADN

*Transcription et maturation*




ARNm (Ø cassure)

⇒ Difficilement détectable (éventuellement via les ARN pré-messager)

- Faible expression des fusions

Ex : Sarcome à cellules claires (WERS avec 47 M de séquences exploitables sur l'échantillon)

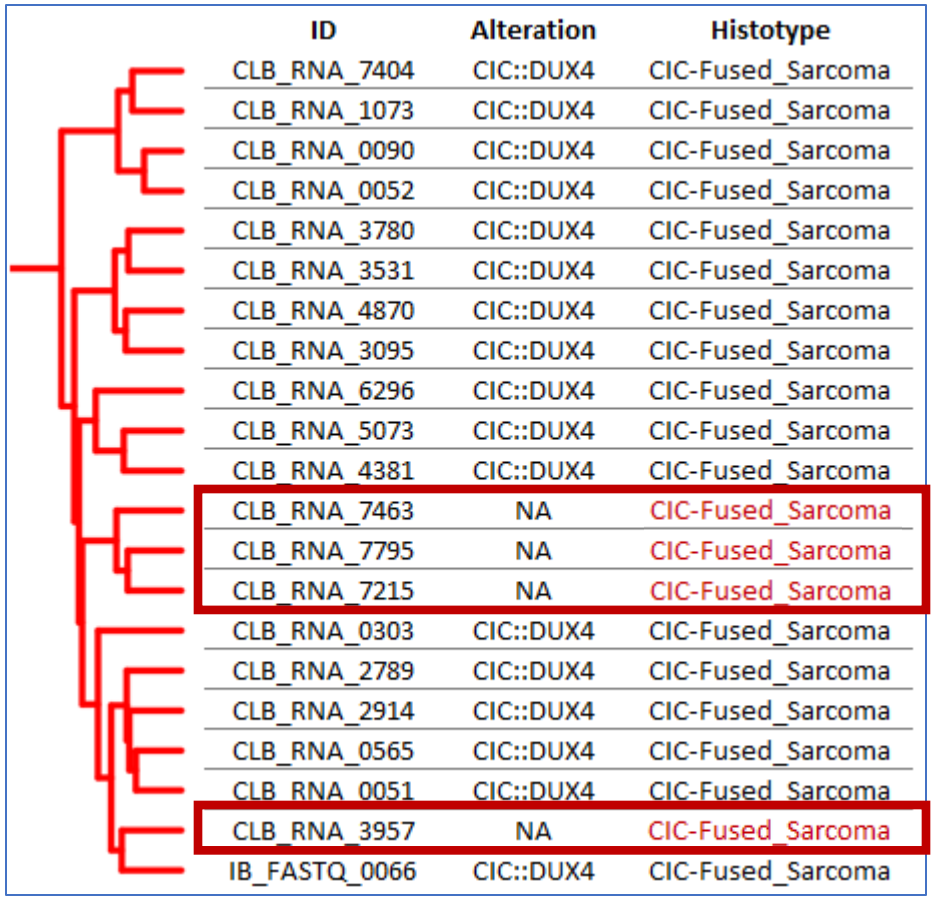
| FusionGene | L_breakpoint | R_breakpoint | Nb_algo | Split_R | Span_R | Frame | Transcripts |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| EWSR1::ATF1 | 22:29287134:+ | 12:50814010:+ | 1 (StarFusion) | 2 | 1 | InFrame | EWSR1_ENST00000332050_(e7)::ATF1_ENST00000262053_(e5) |

⇒ Action oncogénique forte sans forcément de surexpression

# Fusions non détectées en RNAseq : quelles solutions ?

- Les analyses de type clustering (si WERS)

Ex : Sarcomes Ewing-like CIC-fused



| ID | Alteration | Histotype |
|---|---|---|
| CLB_RNA_7404 | CIC::DUX4 | CIC-Fused_Sarcoma |
| CLB_RNA_1073 | CIC::DUX4 | CIC-Fused_Sarcoma |
| CLB_RNA_0090 | CIC::DUX4 | CIC-Fused_Sarcoma |
| CLB_RNA_0052 | CIC::DUX4 | CIC-Fused_Sarcoma |
| CLB_RNA_3780 | CIC::DUX4 | CIC-Fused_Sarcoma |
| CLB_RNA_3531 | CIC::DUX4 | CIC-Fused_Sarcoma |
| CLB_RNA_4870 | CIC::DUX4 | CIC-Fused_Sarcoma |
| CLB_RNA_3095 | CIC::DUX4 | CIC-Fused_Sarcoma |
| CLB_RNA_6296 | CIC::DUX4 | CIC-Fused_Sarcoma |
| CLB_RNA_5073 | CIC::DUX4 | CIC-Fused_Sarcoma |
| CLB_RNA_4381 | CIC::DUX4 | CIC-Fused_Sarcoma |
| CLB_RNA_7463 | NA | CIC-Fused_Sarcoma |
| CLB_RNA_7795 | NA | CIC-Fused_Sarcoma |
| CLB_RNA_7215 | NA | CIC-Fused_Sarcoma |
| CLB_RNA_0303 | CIC::DUX4 | CIC-Fused_Sarcoma |
| CLB_RNA_2789 | CIC::DUX4 | CIC-Fused_Sarcoma |
| CLB_RNA_2914 | CIC::DUX4 | CIC-Fused_Sarcoma |
| CLB_RNA_0565 | CIC::DUX4 | CIC-Fused_Sarcoma |
| CLB_RNA_0051 | CIC::DUX4 | CIC-Fused_Sarcoma |
| CLB_RNA_3957 | NA | CIC-Fused_Sarcoma |
| IB_FASTQ_0066 | CIC::DUX4 | CIC-Fused_Sarcoma |

⇒ Résolution diagnostique malgré l'absence de détection de la fusion pathognomonique de l'entité

⇒ Technique FISH secondaire possible mais non indispensable

# Fusions non détectées en RNAseq : quelles solutions ? (suite)

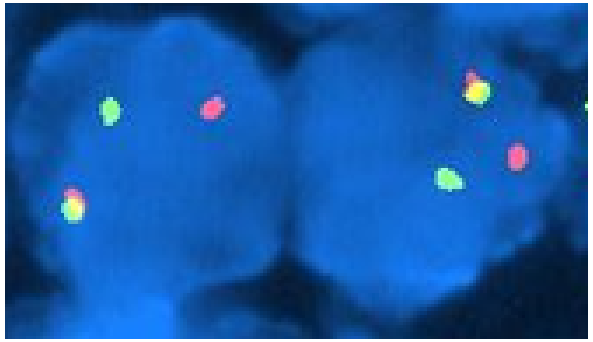
- La technique de FISH (ADN)

Ex : Lymphomes de Burkitt en WERS

| ID | MYC-Fusion | Tumor_Type |
|---|---|---|
| CLB_RNA_1108 | NA | Burkitt_Lymphoma |
| CLB_RNA_1386 | NA | Burkitt_Lymphoma |
| CLB_RNA_1522 | NA | Burkitt_Lymphoma |
| CLB_RNA_2930 | NA | Burkitt_Lymphoma |
| CLB_RNA_4438 | IGH::MYC | Burkitt_Lymphoma |
| CLB_RNA_5434 | NA | Burkitt_Lymphoma |

*Technique WERS*
*(~ 15% de détection)*

*VS*



*Technique FISH*
*(~ 100% de détection)*

⇒ La FISH reste plus efficace en cas de promoter swapping / jonctions complexes

# WERS et fusions non décrites : valeur ajoutée ?

- Savoir trier les fusions significatives vs bruit de fond
  - Artéfacts d'alignement

    Ex : Fusions entre gènes de la même famille type COL1A1::COL6A1, PARG::PARGP1, RPS24::RPS24P13,…

  - Fusions non pathogéniques / non spécifiques

    Ex : Fusions de type « read-through » pour des gènes contigus et dans le même sens

Ex : Fusion très récurrente et d'intérêt limité de type KANSL1::ARL17B (*PMID: 28881586, 2017*)
-> détectée dans 30 à 50 % des tumeurs de la population nord-américaine
(absente pour les populations asiatiques et africaines)
-> supposée être une fusion de prédisposition au cancer pour les populations d'origine européenne

⇒ Importance du tri pour le reporting diagnostique

# WERS et fusions non décrites : valeur ajoutée ? (suite)

- Fusions inactivatrices de TSG : altération secondaires / passenger

Ex : quelques fusions impliquant des TSG dans les mésothéliomes

| SampleID | FusionGene | L_breakpoint | R_breakpoint | nb_tools | Split_R | Span_R | Frame | Tumor_Type |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| CLB_RNA_7887 | NF2::APOL2 | 22:29604112:+ | 22:36239561:- | 5 | 5 | 3 | NoFrame | Sarcomatoid_Mesothelioma |
| CLB_RNA_3914 | CDKN2A::SLC24A2 | 9:21994139:- | 9:19521060:- | 3 | 5 | 5 | FrameShift | Sarcomatoid_Mesothelioma |
| CLB_RNA_4184 | LATS2::RBFOX1 | 13:20987881:- | 16:6316995:+ | 4 | 23 | 7 | InFrame | Sarcomatoid_Mesothelioma |
| CLB_RNA_7884 | BAP1::ARL6 | 3:52405765:- | 3:97780159:+ | 5 | 7 | 29 | FrameShift | Biphasic_Mesothelioma |
| CLB_RNA_4576 | SETD2::GADL1 | 3:47120182:- | 3:30728415:- | 2 | 4 | 1 | FrameShift | Epithelioid_Mesothelioma |

⇒ TSG plus classiquement inactivés par mutation / délétion homozygote

⇒ La translocation est un mécanisme alternatif d'inactivation par cassure

⇒ Cadre de lecture souvent non respecté (Frameshift / NoFrame)

# WERS et fusions non décrites : valeur ajoutée ? (suite)

- Inactivations de TSG : altération secondaires / passenger

Ex : fréquence des fusions impliquant des TSG dans les mésothéliomes *(cohorte CLB 2021)*

| | Histotypes | | |
|---|---|---|---|
| **Gène** | **MMS (107)** | **MME (128)** | **MMB (88)** |
| NF2 | 4 | 2 | 0 |
| BAP1 | 2 | 3 | 1 |
| SETD2 | 0 | 4 | 1 |
| LATS2 | 7 | 0 | 0 |
| PBRM1 | 1 | 3 | 0 |
| CDKN2A | 3 | 0 | 0 |

⇒ L'inactivation de TSG par cassure est un mécanisme peu fréquent mais récurrent dans de très nombreux histotypes

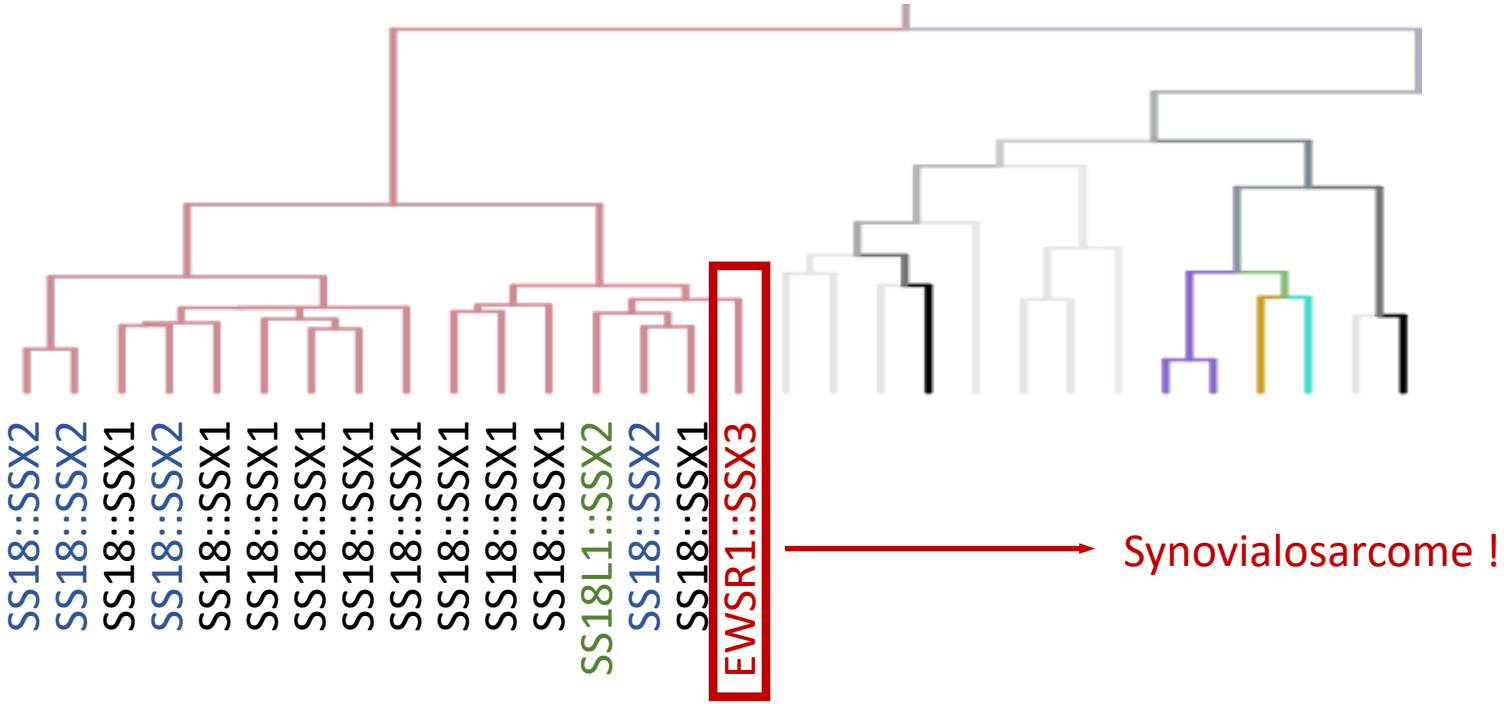
⇒ Peut être utilisé comme biomarqueur diagnostique

# WERS et fusions non décrites : valeur ajoutée ? (suite)

- Fusions non décrites : quel histotype ?

Ex : sarcome inclassé à cellules fusiformes BCOR+,
détection d'un fusion in frame robuste de type EWSR1::SSX3

→ Sarcome d'Ewing / Ewing-like ?
→ Synovialosarcome ?
→ Autre ?



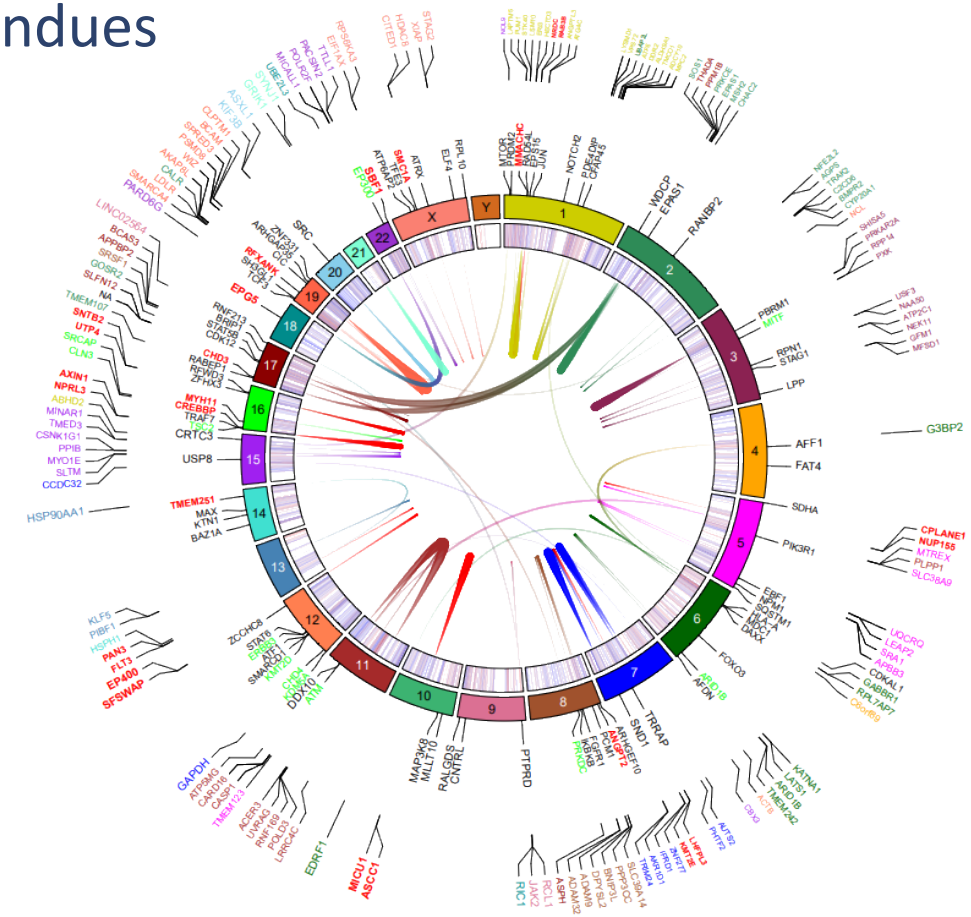

⇒ Limite des techniques de type panel, sans analyse possible de type clustering

# WERS et fusions non décrites : valeur ajoutée ? (suite)

- Savoir repérer indirectement d'autres types d'altération
  - Génomique complexe / Chromothripsies étendues

Ex : sarcome pléomorphe indifférencié (UPS)

| FusionGene | L_breakpoint | R_breakpoint | nb_algo | Split_R | Span_R | Frame |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ASCC1::MICU1 | 10:72196811:- | 10:72408037:- | 5 | 13 | 21 | InFrame |
| NPRL3::AXIN1 | 16:130522:- | 16:314683:- | 5 | 5 | 7 | InFrame |
| CLPTM1::BCAM | 19:44988173:+ | 19:44811225:+ | 5 | 46 | 86 | InFrame |
| ATP5MG::LRRC4C | 11:118401717:+ | 11:40319721:- | 5 | 4 | 48 | InFrame |
| ERI3::HECTD3 | 1:44352850:- | 1:45004377:- | 5 | 11 | 31 | FrameShift |
| SOS1::MSH2 | 2:39120336:- | 2:47512303:+ | 5 | 12 | 18 | InFrame |
| PHTF2::AUTS2 | 7:77840300:+ | 7:70118132:+ | 5 | 7 | 18 | InFrame |
| TMEM107::THADA | 17:8176200:- | 2:43571862:- | 5 | 4 | 8 | InFrame |
| SHISA5::PRKAR2A | 3:48473010:- | 3:48756444:- | 5 | 22 | 24 | FrameShift |
| GOSR2::PPM1B | 17:46938704:+ | 2:44232316:+ | 5 | 7 | 22 | FrameShift |
| SYNJ1::GRIK1 | 21:32670288:- | 21:29598937:- | 5 | 6 | 10 | FrameShift |
| NRDC::RAB3B | 1:51818066:- | 1:51937412:- | 4 | 2 | 2 | FrameShift |
| TRIM24::AKR1D1 | 7:138571003:+ | 7:138105307:+ | 4 | 35 | 92 | InFrame |
| SNTB2::UTP4 | 16:69187746:+ | 16:69139825:+ | 3 | 6 | 6 | InFrame |
| KMT2E::LHFPL3 | 7:105081797:+ | 7:104845382:+ | 3 | 2 | 1 | FrameShift |
| PLPP1::TMEM123 | 5:55534572:- | 11:102448868:- | 3 | 2 | 2 | InFrame |
| SLC38A9::MTREX | 5:55697846:- | 5:55340010:+ | 3 | 1 | 1 | InFrame |
| UBE2L3::PARD6G | 22:21611043:+ | 18:80202932:- | 3 | 12 | 5 | FrameShift |
| ASXL1::KIF3B | 20:32369123:+ | 20:32309713:+ | 3 | 6 | 7 | NoFrame |
| RIC1::LINC02564 | 9:5629453:+ | 18:15617:+ | 3 | 2 | 1 | NoFrame |
| EPAS1::PRKCE | 2:46297937:+ | 2:46184735:+ | 3 | 13 | 24 | FrameShift |
| ABHD2::NOL9 | 15:89116521:+ | 1:6550615:- | 3 | 2 | 2 | FrameShift |

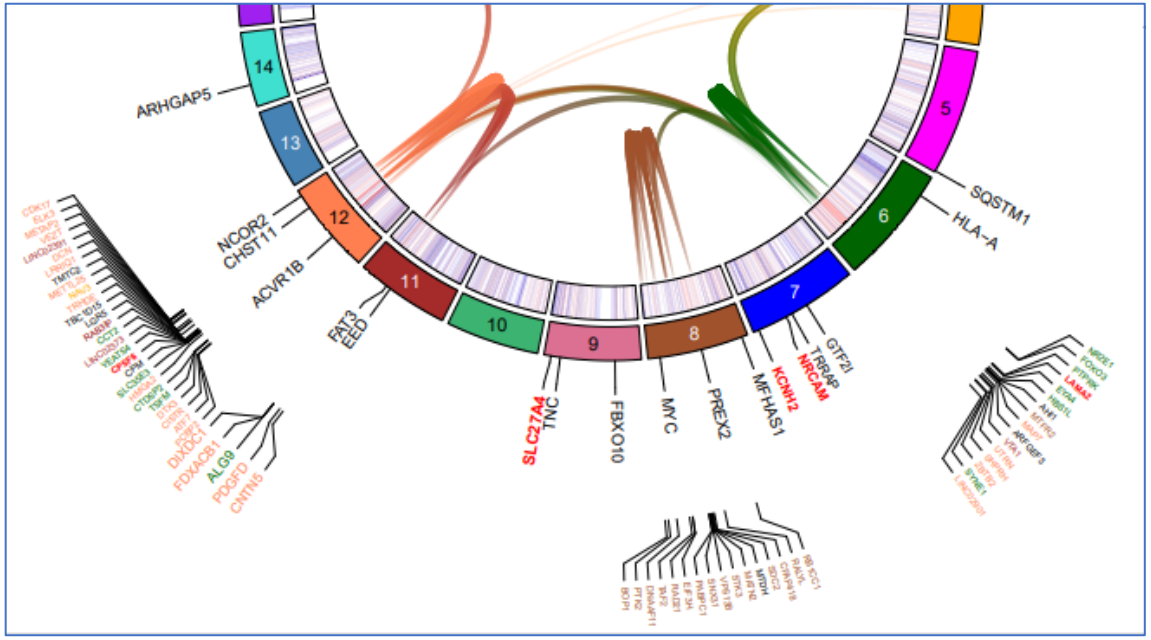


⇒ Valeur pronostique péjorative du génome complexe

# WERS et fusions non décrites : valeur ajoutée ? (suite)

- Savoir repérer indirectement d'autres types d'altération
  - Chromothripsies localisées

Ex : suspicion de liposarcome dédifférencié avec chromothripsies chr6, chr8 et chr12



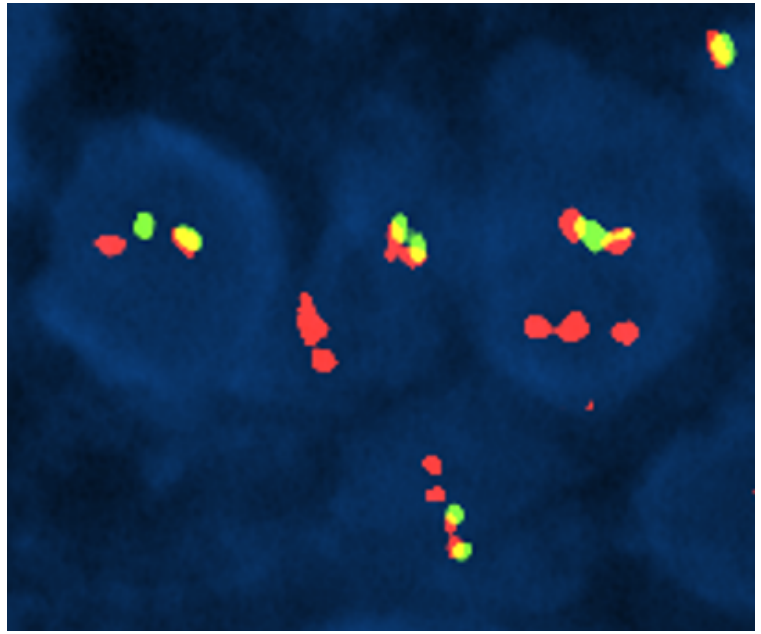

| FusionGene | L_breakpoint | R_breakpoint | Split | Span | Frame |
|---|---|---|---|---|---|
| DCN::HMGA2 | 12:91178342:- | 12:65828001:+ | 90 | 68 | FrameShift |
| HMGA2::LAMA2 | 12:65838569:+ | 6:129049918:+ | 1 | 1 | FrameShift |
| NUAK1::HMGA2 | 12:106138414:- | 12:65685776:+ | 13 | 2 | Unknown |
| MAP2K6::MDM2 | 17:69536128:+ | 12:68839724:+ | 3 | 2 | FrameShift |
| WWP1::MDM2 | 8:86431441:+ | 12:68839274:+ | 5 | 1 | InFrame |
| CPSF6::MDM2 | 12:69262562:+ | 12:68824363:+ | 2 | 5 | InFrame |

⇒ Probables amplifications (ici MDM2 / HMGA2)

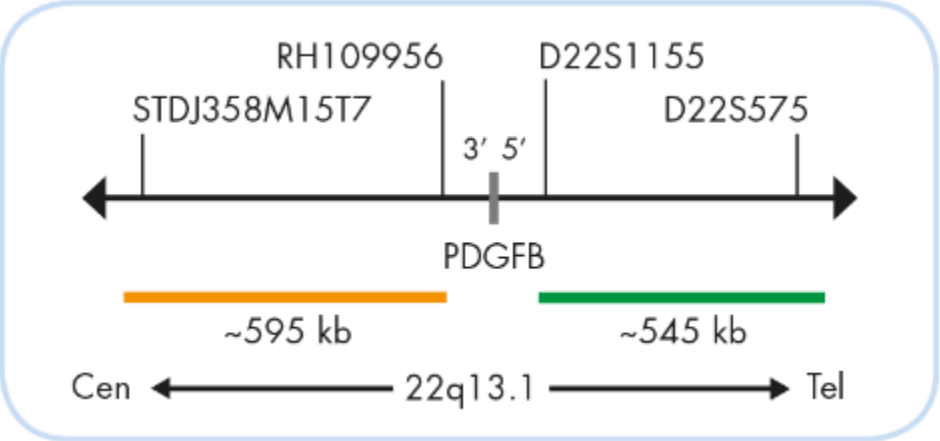
⇒ A confirmer si besoin via les données d'expression / par technique FISH

# L'apport indirect de la CGH pour la détection de fusions

- Détection des translocations lorsqu'elles sont déséquilibrées
  - Ex : cas typique de Dermatofibrosarcomes de Darier-Ferrand en FISH



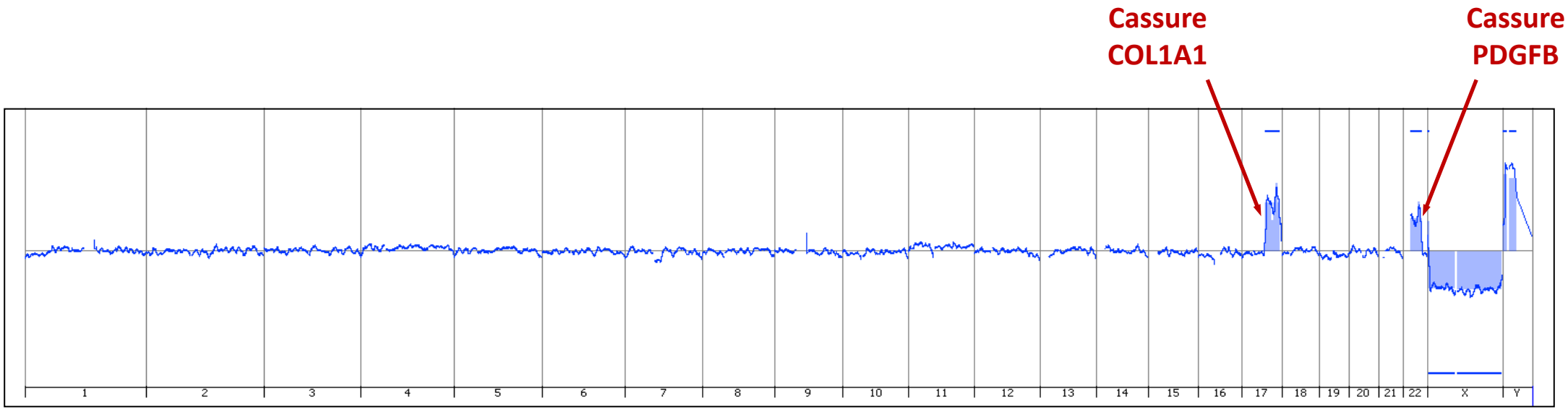
**Sonde ZytoLight SPEC PDGFB Dual Color BA**




⇒ Réarrangement classique COL1A1::PDGFB systématiquement déséquilibré
⇒ Cassures détectables en CGH !

# L'apport indirect de la CGH pour la détection de fusions

- Détection des translocations lorsqu'elles sont déséquilibrées
  - Ex : cas typique de dermatofibrosarcomes de Darier-Ferrand en CGH

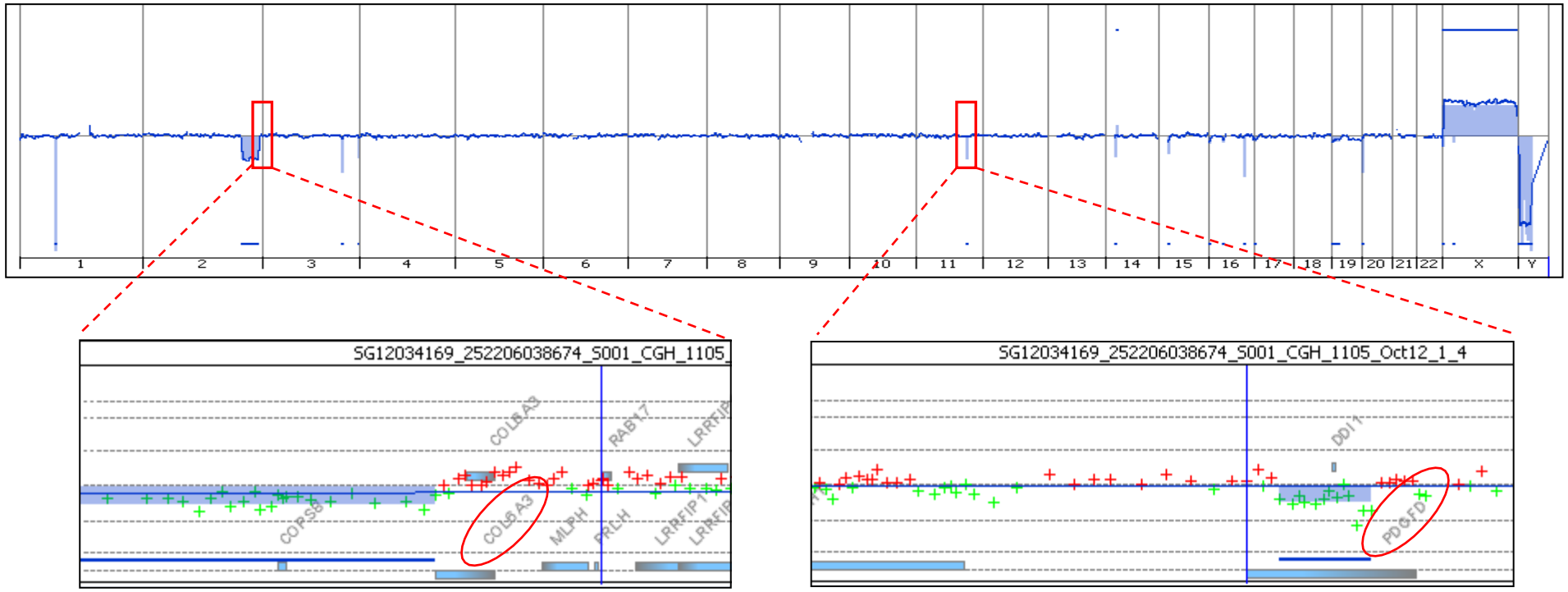



⇒ Avant RNAseq, utilisation de la CGH en cas de FISH difficile ou négative

⇒ Existe-t-il une fusion alternative pour les cas négatifs ?

# L'apport indirect de la CGH pour la détection de fusions

- Détection des translocations uniquement déséquilibrées
  - Ex : dermatofibrosarcomes de Darier-Ferrand COL1A1::PDGFB négatif : résultats en CGH ?




⇒ Découverte en CGH d'un réarrangement alternatif de type COL6A3::PDGFD

⇒ Confirmé secondairement par technique RNAseq avant publication (*PMID: 29955147, 2018*)

# Comment choisir la technique moléculaire la plus adaptée ?

*Visée de la prescription*

## THERANOSTIQUE (Cliniciens)

**RNAseq Panel**
Liste des fusions actionnables limitée
Grande profondeur, sous-clones détectables
En //, détection des mutations actionnables

*résultat ambigu*

**FISH**
Confirmation ou non de la présence d'un transcrit de fusion peu représenté

## DIAGNOSTIQUE (Pathologistes)

*sonde disponible vs diagnostic envisagé*

**FISH**
Ciblée, rapide, in situ
Sondes type break-apart
(éventuellement fusion ou mixte)

*résultat (-) ou ambigu*

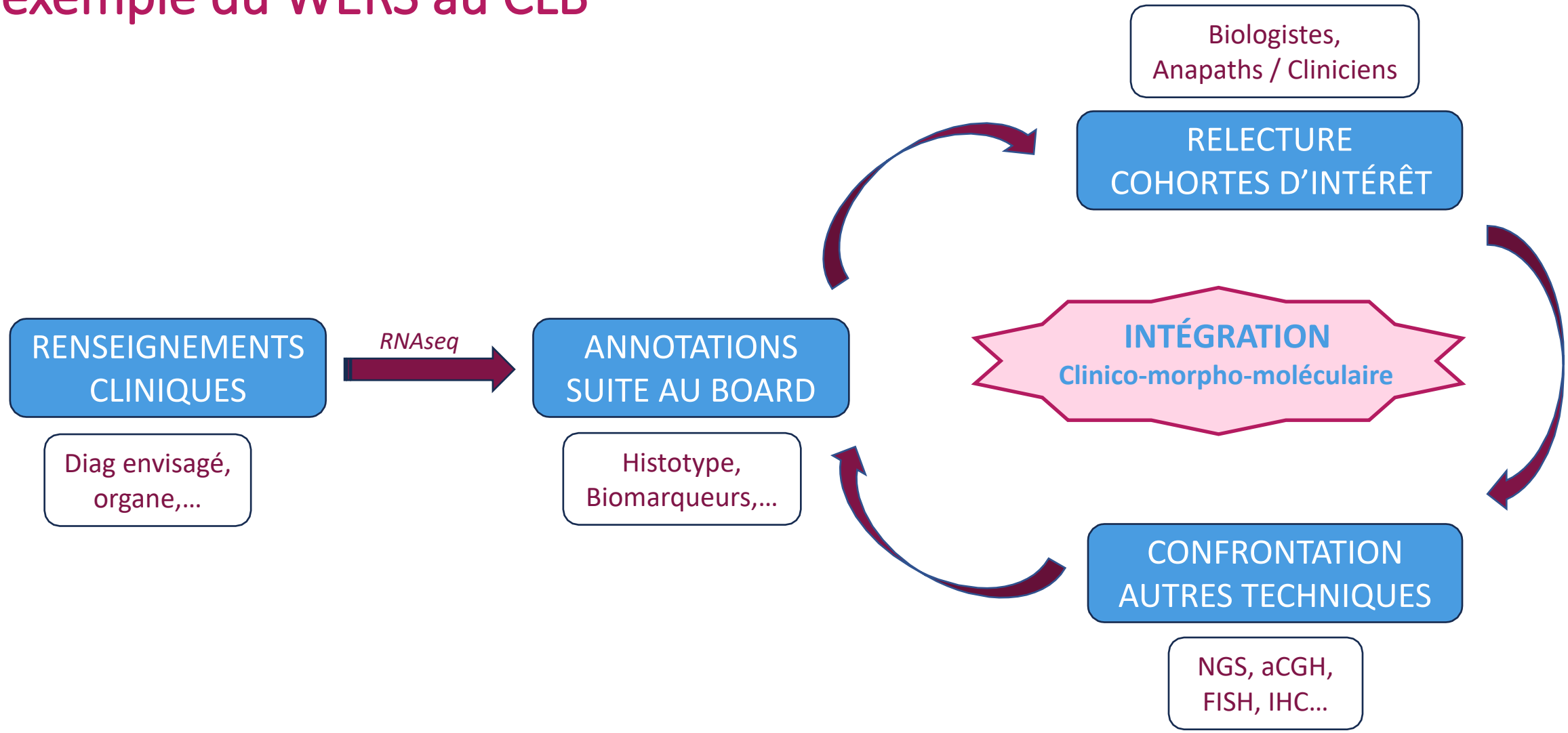
*sondes non disponibles, nombreuses possibilités*

**RNAseq Pan-génome (WERS)**
Fusions connues et inconnues
En //, détection des mutations sur OG (et TSG), données d'expressions robustes (géniques / profiling)

**CGH avec cassures géniques**

**FISH si (-) ou ambigu**

# L'importance des annotations / des discussions : l'exemple du WERS au CLB



# Messages à retenir

- Attention aux postulats dépassés du type une fusion = un histotype
  (la BM seule ne peut pas se substituer aux analyses morphologiques)

- Importance de savoir apprivoiser ses techniques (résolution, sensibilité et spécificité)

- Les techniques les plus résolutives et informatives (NGS) possèdent également leurs limites (bruit de fond / jonctions complexes / promoter swapping)

- Rester ouvert face aux résultats complexes / ambigus, penser à confronter les techniques (se complètent en terme de type d'information, de rapidité et de coût)

- Intégration clinico-morpho-moléculaire fondamentale
  (multiplier les espaces de discussion entre les corps de métier)

# REMERCIEMENTS

## Département de Biopathologie

Cadres Médico-Technique
A. Forestier, J.P. Michot

Responsable du Département
C. Chassagne

Médecins Anapaths
A. De La Fouchardière, M. Karanian, A. Meurgey, S. Lantuejoul, F. Galateau, I. Treilleux

Equipe Technique

UF de Biologie des tumeurs

## UF de Pathologie Moléculaire

Ingénieurs Biologistes
S. Paindavoine, H. Houlier

Techniciens
C. Taillandier, F. Dreux, L. Duperron, E. Legrand, L. Grenier, C. Edoun

## Centre Léon Bérard

Directeur Général
J.Y. Blay

Chercheur équipe GEBS
F. Tirode

Cliniciens
M. Brahmi, N. Corradini, A. Dufresne

## Plateforme de bioinformatique
## Gilles Thomas