

Université de Montréal

**Caractérisation cytogénétique et moléculaire des translocations chromosomiques
dans la phase blastique de la leucémie myéloïde chronique**

par

Sawcène Hazourli

Département de sciences biomédicales

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de Ph.D

en sciences biomédicales

© Sawcène Hazourli, 2012

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Caractérisation cytogénétique et moléculaire des translocations chromosomiques dans la
phase blastique de la leucémie myéloïde chronique

Présentée par :
Sawcène Hazourli

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Éric Milot, président-rapporteur
Dre Josée Hébert, directeur de recherche
Dr Hervé Sartelet, membre du jury
Dre Josée Lavoie, examinateur externe
Dr Ali Ahmad, représentant du doyen de la FES

Résumé

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est un modèle d'évolution tumorale dans les cancers humains. Le processus d'évolution de la LMC de la phase chronique (PC) à la phase blastique (PB) est caractérisé par un arrêt de différenciation et l'acquisition de la capacité d'autorenouvellement incontrôlé d'une cellule souche ou d'un progéniteur hématopoïétique. La LMC en PB est associée à la présence d'anomalies génétiques additionnelles à la fusion *BCR-ABL1* qui résulte de la translocation chromosomique t(9;22). Contrairement aux patients en PC, les patients en PB de la LMC n'obtiennent pas une réponse moléculaire complète à long terme avec l'Imatinib mesylate, un inhibiteur de la tyrosine kinase (ITK) BCR-ABL1. De plus, les ITKs de deuxième et troisième générations sont moins efficaces en PB de la LMC lorsque les cellules leucémiques ont acquis une résistance au traitement indépendante des mutations de *BCR-ABL1*. Les mécanismes moléculaires des voies de signalisation impliquées dans la progression de la LMC en PB ne sont pas entièrement élucidés. Le but de notre travail est de caractériser de nouvelles anomalies génétiques dans la PB de la LMC. Nous avons identifié en cytogénétique, quatre nouvelles translocations chromosomiques : t(1;21)(p36;q22), t(7;17)(p15;q22), t(8;17)(q11;q22) et t(2;12)(q31;p13) dans les cellules leucémiques de patients en PB de la LMC résistants au traitement. En utilisant des techniques d'hybridation in situ en fluorescence, de RT-PCR et de séquençage, nous avons délimité les régions à investiguer au niveau des points de cassure et identifié un réarrangement de plusieurs gènes codant pour des facteurs de transcription importants lors de l'hématopoïèse tels que RUNX1, ETV6, PRDM16 et HOXA. L'altération de ces gènes pourrait expliquer l'arrêt de différenciation et/ou l'acquisition de la capacité d'autorenouvellement caractéristiques de

la LMC en PB. Nous avons identifié les fusions *RUNX1-PRDM16*, *MSI2-HOXA*, *MSI2-SOX17* et *ETV6-HOXD11*, respectivement associées aux translocations chromosomiques t(1;21), t(7;17), t(8;17) et t(2;12). Ces fusions génèrent différents transcrits alternatifs qui maintiennent et altèrent le cadre ouvert de lecture. L'analyse des séquences des transcrits chimériques identifiés dans ce projet, incluant *RUNX1-PRDM16*, *MSI2-HOXA9*, *MSI2-HOXA10*, *MSI2-HOXA11* et *ETV6-HOXD11*, nous a permis de prédire les domaines fonctionnels potentiellement présents au niveau des protéines chimériques prédites. Les transcrits de fusion qui respectent le cadre ouvert de lecture peuvent générer des domaines fonctionnels des deux partenaires. C'est le cas des deux transcrits identifiés pour la fusion *RUNX1-PRDM16* où le domaine de liaison à l'ADN RHD (Runt homology domain) de *RUNX1* est fusionné avec la quasi-totalité des domaines de *PRDM16*. Les transcrits de fusion qui ne respectent pas le cadre ouvert de lecture donnent des formes tronquées des transcrits *RUNX1*, *MSI2* et *ETV6*. La juxtaposition des régions promotrices de ces derniers en 5' de leurs partenaires entraîne l'activation de la forme courte oncogénique de *PRDM16* dans la t(1;21) ou de différents gènes *HOXA/D* dans les t(7;17) et t(2;12), ainsi que l'expression aberrante d'un nouveau transcrit alternatif de *SOX17* dans la t(8;17). Notre étude nous a permis d'identifier de nouveaux gènes de fusion et/ou une activation de gènes qui pourraient coopérer avec la fusion *BCR-ABL1* dans la progression de la LMC et être impliqués dans la résistance au traitement de la LMC en phase avancée. La caractérisation des événements génétiques associés à la transformation blastique de la LMC est essentielle pour l'investigation des voies moléculaires impliquées dans cette phase de la maladie. Investiguer la résistance au traitement de ces patients pourrait aussi contribuer à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans cette leucémie.

Mots-clés : leucémie myéloïde chronique, phase blastique, translocation chromosomique, gène de fusion, autorenewement.

Summary

Chronic myeloid leukemia (CML) is a model of tumor evolution in human cancer. The evolution process of CML from the chronic phase (CP) to the blastic phase (BP) is characterized by a blockade of differentiation and acquisition of uncontrolled self-renewal capacity by hematopoietic stem or progenitor cells. CML-BP is associated with the presence of other genetic abnormalities in addition to the *BCR-ABL1* fusion which results from chromosomal translocation t(9;22). Unlike patients in the CP, patients with CML-BP do not achieve a long-term complete molecular response to Imatinib mesylate, an inhibitor targeting the BCR-ABL1 tyrosine kinase (TK). Moreover, second and third generation TK inhibitors are less effective in CML-BP when leukemic cells have acquired a therapeutic resistance independent of *BCR-ABL1* mutations. The molecular mechanisms of the signaling pathways responsible for CML progression from CP to BP are poorly understood. The aim of our project is to characterize novel genetic alterations in the BP of CML. We have identified by cytogenetics, four novel chromosomal translocations: t(1;21)(p36;q22), t(7;17)(p15;q22), t(8;17)(q11;q22) and t(2;12)(q31;p13) in leukemic cells of patients with CML-BP resistant to therapy. Using fluorescence in situ hybridization, RT-PCR and sequencing techniques, we have mapped chromosomal translocation breakpoints and identified rearranged genes encoding transcription factors which are key regulators of hematopoiesis, such as RUNX1, ETV6, PRDM16 and HOXA. The disruption of these genes could explain the differentiation blockade and/or uncontrolled self-renewal associated with the CML-BP. We identified *RUNX1-PRDM16*, *MSI2-HOXA*, *MSI2-SOX17* and *ETV6-HOXD11* fusions created by chromosomal translocations t(1;21), t(7;17), t(8;17) and t(2;12) respectively. These fusions generate different alternative transcripts that both maintain and alter the open reading frame.

Sequence analysis of chimeric transcripts identified in this project, including *RUNXI-PRDM16*, *MSI2-HOXA9*, *MSI2-HOXA10*, *MSI2-HOXA11* and *ETV6-HOXD11*, allowed us to predict potential functional domains present in putative chimeric proteins. In-frame fusion transcripts can generate functional domains from both fusion partners. For example, in two *RUNXI-PRDM16* transcripts, the RUNX1 DNA binding domain RHD (Runt homology domain) is fused to the majority of PRDM16 domains. Out-of-frame fusion transcripts resulted in truncated forms of *RUNXI*, *MSI2* and *ETV6*. The juxtaposition of promoter regions of these genes to the 5' part of their partners resulted in the activation of the oncogenic short form of *PRDM16* in the t(1;21) or of different *HOXA/D* genes in t(7;17) and t(2;12), and in the aberrant expression of a novel alternative *SOX17* transcript in the t(8;17).

Our study allowed us to identify novel fusion genes and/or activation of genes that potentially cooperate with *BCR-ABL1* fusion in the progression of CML and contribute to treatment resistance of this disease. The characterization of genetic events related to the blastic transformation of CML is an important step in the investigation of molecular pathways involved in this stage of the disease. Understanding treatment resistance of these patients might help to identify new therapeutic targets in this leukemia.

Keywords : Chronic myeloid leukemia, blastic phase, chromosomal translocation, fusion gene, self-renewal.

Table des matières

Résumé.....	i
Summary	iii
Table des matières.....	v
Liste des sigles et des abréviations	xi
Liste des tableaux.....	xvii
Liste des figures	xviii
Dédicace.....	xx
Remerciements.....	xxi
INTRODUCTION	1
Chapitre 1: La leucémie myéloïde chronique	1
1.1.Hématopoïèse normale, leucémie myéloïde chronique et syndromes myéloprolifératifs1	
1.2.Historique, incidence et étiologie de la leucémie myéloïde chronique.....	5
1.3.Facteurs pronostiques, cliniques et biologiques de la leucémie myéloïde chronique.....	6
1.4.Mécanismes moléculaires de la leucémie myéloïde chronique	9
1.4.1.La translocation t(9;22) et la fusion <i>BCR-ABL1</i> dans la leucémie myéloïde chronique.....	9
1.4.2.Effet oncogénique de la fusion <i>BCR-ABL1</i>	14
1.5.Traitement de la leucémie myéloïde chronique	19
1.5.1.Avant l'ère de l'imatinib	19
1.5.2.L'imatinib.....	20
1.5.3.Les inhibiteurs de tyrosine kinase de deuxième génération.....	23
1.5.3.1.1.Le nilotinib.....	23
1.5.3.1.2.Le dasatinib	24
1.5.4.La résistance à l'imatinib et aux inhibiteurs de tyrosine kinase de deuxième génération.....	26
1.5.4.1.La résistance dépendante de la fusion <i>BCR-ABL1</i>	26
1.5.4.2.La résistance indépendante de la fusion <i>BCR-ABL1</i>	29
1.5.4.2.1.La pompe d'efflux ABCB1	29
1.5.4.2.2.La résistance indépendante de la fusion <i>BCR-ABL1</i> : le transporteur hOCT1	30

1.5.4.2.3.La dérégulation des voies de signalisation alternatives indépendantes de la fusion BCR-ABL1	31
Chapitre 2: La cellule souche et la leucémie myéloïde chronique	32
2.1.La cellule souche hématopoïétique normale et leucémique.....	32
2.1.1.La cellule souche hématopoïétique normale	32
2.1.2.La cellule souche leucémique	34
2.2.La cellule souche impliquée dans la leucémie myéloïde chronique	36
2.3.Les voies moléculaires cruciales impliquées dans la résistance de la cellule souche de la leucémie myéloïde chronique.....	37
2.3.1.La quiescence et la migration de la cellule souche de la leucémie myéloïde chronique.....	37
2.3.2.Les principales voies d'autorenouveaulement de la cellule souche de la leucémie myéloïde chronique.....	38
2.3.2.1.La voie de signalisation Wnt/ β -catenin.....	38
2.3.2.2.La voie de signalisation Hedgehog (Hh).....	40
2.3.2.3.La voie de signalisation Notch.....	41
2.3.2.4.La voie de signalisation MSI2/Numb	42
Chapitre 3: La phase blastique de la leucémie myéloïde chronique	45
3.1.L'arrêt de différenciation myéloïde en phase blastique de la leucémie myéloïde chronique.....	46
3.2.Dommage à l'ADN et instabilité génomique en phase blastique de la LMC	47
3.2.1.Les espèces réactives de l'oxygène	47
3.2.2.La réparation de l'ADN et la voie NER.....	49
3.2.3.Contribution du NHEJ à l'instabilité dans la LMC.....	50
3.4.Les anomalies cytogénétiques additionnelles les plus fréquentes dans la phase blastique de la LMC	53
3.4.1.Les translocations chromosomiques récurrentes en phase blastique de la leucémie myéloïde chronique.....	55
3.4.1.1.La translocation t(3;21)/ <i>RUNX1/MECOM</i> et les autres réarrangements du locus <i>MECOM</i> dans la phase blastique de la LMC	55
3.4.1.2.La t(7;11)/ <i>NUP98/HOXA9</i> et les autres réarrangements des gènes <i>HOX</i> dans phase blastique de la leucémie myéloïde chronique	56
3.4.1.3.Les mutations moléculaires les plus fréquentes dans la phase blastique de la leucémie myéloïde chronique	57

LES OBJECTIFS DE NOTRE TRAVAIL	60
1.Objectif principal	60
2.Objectifs spécifiques	60
MATÉRIEL ET MÉTHODES	62
1.Échantillons de lignées et de cellules étudiés dans ce projet	62
2.Caryotype en bandes G obtenu suite à l'action de la Trypsine et du Giemsa	66
3.Caryotype spectral.....	68
4.Hybridation in situ en fluorescence.....	70
5.Préparation des vecteurs BACs et PACs.....	74
6.Marquage des vecteurs BACs/PACs par déplacement de coupures de type « Nick translation ».....	75
7.Extraction des acides ribonucléiques totaux à partir du TRIzol™.....	76
8.Extraction des acides déoxyribonucléiques à partir du TRIzol™.....	77
9.Synthèse des acides déoxyribonucléiques complémentaires	77
10.Réactions en chaîne par polymérisation.....	78
11.Réactions de la transcription inverse - réaction en chaîne par polymérisation	79
12.Amplification rapide des extrémités 3' des acides déoxyribonucléiques complémentaires - réaction en chaîne par polymérisation.....	80
13.Extraction des acides déoxyribonucléiques à partir d'un gel d'agarose	84
14.Séquençage de type Sanger	85
15.La PCR quantitative en temps réel.....	86
RÉSULTATS	89
1.Investigation de la translocation t(1;21)(p36.3;q22.1) en phase blastique de la leucémie myéloïde chronique (cas 02H056)	89
1.1.Présentation clinique et analyses cytogénétiques.....	89
1.2.Caractérisation du point de cassure sur la bande chromosomique 21q22.1 et identification du réarrangement du gène <i>RUNXI</i>	91

1.3.Caractérisation du point de cassure sur la bande chromosomique 1p36.3 et identification du réarrangement du gène <i>PRDM16</i>	91
1.4.Identification des transcrits de fusion <i>RUNX1-PRDM16</i>	96
1.5.Étude d'expression de <i>PRDM16</i> en phase chronique vs en phase blastique de la LMC dans le cas 02-H056	102
1.6.Étude d'expression de <i>PRDM16</i> dans 105 échantillons regroupant des patients avec des leucémies aiguës et chroniques myéloïdes et des syndromes myélodysplasiques.....	104
1.7.Investigation des réarrangements et de l'amplification de <i>PRDM16</i> chez les cas surexprimant <i>PRDM16</i>	111
2.Investigation de la translocation t(7;17)(p15;q22) en phase blastique de la leucémie myéloïde chronique (cas 06H006)	114
2.1.Présentation clinique et analyses cytogénétiques.....	114
2.2.Caractérisation du point de cassure sur la bande chromosomique 7p15 et identification du réarrangement du locus <i>HOXA</i> dans la translocation t(7;17)(p15;q22).....	115
2.3.Caractérisation du point de cassure sur la bande chromosomique 17q22 et identification du réarrangement du gène <i>MSI2</i> dans la t(7;17)(p15;q22).....	117
2.4.Identification des transcrits de fusion <i>MSI2-HOXA9</i> dans la translocation t(7;17)(p15;q22)	118
2.5.Identification de deux nouvelles fusions <i>MSI2-HOXA10</i> et <i>MSI2-HOXA11</i> dans notre cas avec la translocation t(7;17)/ <i>MSI2-HOXA9</i>	121
2.6.Activation des gènes <i>HOXA</i> et épissage alternatif de <i>HOXA9</i> dans la translocation t(7;17)(p15;q22)	125
2.7. Expression des gènes <i>HOXA</i> dans d'autres leucémies.....	130
3.Investigation de la translocation t(8;17)(q11;q22) en phase accélérée de la leucémie myéloïde chronique (cas 02H037)	132
3.1.Présentation clinique et analyses cytogénétiques.....	132
3.2.Identification du point de cassure sur la bande chromosomique 8q11-8q12 et altération du locus <i>SOX17</i> dans la t(8;17).....	133
3.3.Identification du point de cassure sur la bande chromosomique 17q22 et altération du gène <i>MSI2</i> dans la t(8;17)	137
3.4.Activation d'un nouveau transcrit de <i>SOX17</i> dans le cas avec la translocation t(8;17)	
141	
4.Investigation de la translocation t(2;12) dans la phase blastique de la leucémie myéloïde chronique (cas 02H052).....	144
4.1.Présentation clinique et analyses cytogénétiques.....	144

4.2.Réarrangement du gène <i>ETV6</i> au niveau de la bande chromosomique 12p13	145
4.3.Identification du point de cassure sur la bande chromosomique 2q31 et altération du locus <i>HOXD</i> dans la t(2;12)	146
4.4.Formation d'une forme tronquée de <i>ETV6</i> suite à la fusion <i>ETV6-HOXD11</i>	148
4.5.Activation de <i>HOXD9</i> au niveau du locus <i>HOXD</i> dans la t(2;12)	153
DISCUSSION	156
1.Caractérisation de la translocation t(1;21) et identification des fusions <i>RUNX1-PRDM16</i> , des formes tronquées de <i>RUNX1</i> et activation de <i>PRMD16</i>	156
2.Caractérisation de la translocation t(7;17) et identification des fusions <i>MSI2-HOXA</i> , des formes tronquées de <i>MSI2</i> et activation de plusieurs gènes du cluster HOXA	166
3.Caractérisation de la translocation t(2;12) et identification de la fusion <i>ETV6-HOXD11</i> , d'une forme tronquée de <i>ETV6</i> et activation de <i>HOXD9</i>	174
4.Caractérisation de la translocation t(8;17) et identification de l'altération des gènes <i>MSI2</i> et <i>SOX17</i>	180
5. Les mécanismes communs pouvant être altérés suite à ces quatre translocations détectées dans la progression de la leucémie myéloïde chronique	185
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	188
RÉFÉRENCES	191
ANNEXE	219
Article publié: Hazourli et al., Genes, Chromosomes and Cancer 2006	219

Liste des sigles et des abréviations

5-FU	5-fluorouracil
ABI	Applied Biosystems
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN codant
AP	Adapter primer
ara-C	Cytosine Arabinoside
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	adenosine triphosphate
AUAP	Abridged Universal Amplification Primer
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BCLQ	Banque de Cellules Leucémiques du Québec
BrDU	Bromodeoxyuridine
CCyR	réponse cytogénétique complète
CDB	cassures double brin de l'ADN
CFC	colony-forming cell
CFU	Colony Forming Unit
CHR	réponse hématologique complète
CIC	cellules initiatrices de cancer
CIL	cellule initiatrice de la leucémie
CLP	common lymphoid progenitor
CMN	cellules mononuclées
CMP	common myeloid progenitor
CN	caryotype normal
CRU	competitive repopulating unit
CS	cellule souche

CSC	cellule souche cancéreuse
CSH	cellule souche hématopoïétique
CSHd	cellule souche hématopoïétique dormantes
CSL	cellule souche leucémique
CS-LMC	cellule souche de la LMC
CT	Threshold Cycle
Cy5	Cyanine 5
CyR	réponse cytogénétique
DAPI	4',6'-diamidino-2-phenylindole
DD	domaine de dimérisation
DK	domaine kinase
DMSO	diméthyl sulfoxyde
DOP-PCR	Degenerate Oligonucleotide Primed-PCR
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
EFS	event-free survival
ENESTn	Evaluating Nilotinib Efficacy and Safety in Clinical Trials–Newly Diagnosed Patients
EPO	érythropoïétine
ETS	E-twenty six
FAB	French–American–British Cooperative group
FDA	Food and Drug Administration
FISH	fluorescence in situ hybridization
FT	facteur de transcription
FPD	familial platelet disorder
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor
GMP	progéniteurs granulocytes/macrophages
GSP	gene-specific primer
GTG	bandes G obtenues suite à l'action de la Trypsine et du Giemsa
GVL	greffon <i>versus</i> leucémie

HD	domaine homéobox
HDAC	histone désacétylase
HRR	homologous recombination repair
HMG	High Mobility Group
HMT	histone méthyl transférase
HMR	Hôpital Maisonneuve-Rosemont
HSR	homogeneous staining region
IC50	concentration inhibitrice médiane
IL1	interleukine 1
IL6	Interleukine 6
IFN-alpha	interféron alpha
IM	Imatinib
IRIS	International Randomised Study of Interferon versus STI571
IS	score International Scale
ISCN 2009	International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2009
ITK	inhibiteur de la tyrosine kinase
ITRC-HSC	intermediate reconstitution HSC
Kb	kilobases
LA	leucémie aiguë
LAL	leucémie aiguë lymphoïde
LAM	leucémie aiguë myéloïde
LMC	leucémie myéloïde chronique
LMC-PB	leucémie myéloïde chronique en phase blastique
LSKs	Lin- Sca1+ cKit+
LT-HSC	Long Term-Hematopoietic Stem Cells
LT-CIC	long-term bone marrow culture-initiating cell
Log	logarithm
M-bcr	major breakpoint cluster region

m-bcr	minor breakpoint cluster region
M-CSF	myeloid-colony stimulating factor
MCyR	réponse cytogénétique majeure
MF	Myélofibrose primaire
MGG	May Grünwald Giemsa
MEG	mégacaryocytes
MEP	progéniteurs mégacaryocytes/érythrocytes
MO	Moelle osseuse
MPP	multipotent primitive progenitor
MSCV	murine stem cell virus
NER	Nucleotide excision repair
NHEJ	non homologous end joining
NLS	Nuclear Localisation Signal
NMP	néoplasies myéloprolifératives
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OS	overall survival
PA	phase accélérée
PAC	Phage P1-derived artificial chromosome
PB	phase blastique
PC	phase chronique
PCM	progéniteurs communs myéloïdes
PCR	polymerase chain reaction
Ph	chromosome Philadelphie
PFS	Progression-free survival
PGM	progéniteurs granulocytes/macrophages
PME	progéniteurs mégacaryocytes/érythrocytes
PR	PRDI-BF1 and RIZ homology
PTN	pointed

PV	polycythaemia vera
qPCR	PCR quantitative en temps réel
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RBC	red blood cells
RBD	RNA binding domain
RHC	rémission hématologique complète
RHD	Runt homology domain
RMM	réponse moléculaire majeure
RNP	ribonucleoprotein domain
RRM	RNA Recognition Motif
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
ROS	espèces réactives de l'oxygène
RQ	Relative Quantity
SCID	severe combined immunodeficiency
SCF	stem cell factor
SET	Su(var), Enhancer of zeste, Trithorax
SKY	spectral karyotyping
SH1, 2, 3	SRC-homology regions 1, 2, 3
shRNA	Short hairpin RNA
SMD	Syndromes Myélodysplasiques
SMP	Syndromes Myéloprolifératifs
SSA	single-strand annealing
ST-HSC	Short Term-Hematopoietic Stem Cells
STI571	signal transduction inhibitor number 571
SWOG	Southwest Oncology Group
TAD	transactivation domain
TE	thrombocytémie essentielle
TFS	transformation-free survival

TK	tyrosine kinase
TKI	tyrosine kinase inhibitor
Tyr	Tyrosine
UAP	Universal Amplification Primer
UV	ultraviolet
WHO	World Health Organization

Liste des tableaux

Tableau I. Définition des réponses hématologique, cytogénétique et moléculaire.....	22
Tableau II. Liste des échantillons étudiés dans ce projet et technique utilisée.....	63
Tableau III. Liste des sondes Abbott utilisées dans ce projet.....	71
Tableau IV. Liste des BACs utilisés dans ce projet.....	72
Tableau V. Liste des amorces utilisées dans ce projet.....	82
Tableau VI. Résultats de la PCR quantitative de <i>PRDM16</i> en fonction des caractéristiques morphologiques et cytogénétiques des spécimens étudiés.....	107
Tableau VII. Caryotypes et résultats des FISH ciblant <i>PRDM16</i> chez les patients surexprimant <i>PRDM16</i>	111
Tableau VIII. Liste des échantillons utilisés pour l'étude de l'expression des gènes <i>HOXA6</i> , <i>HOXA7</i> et <i>HOXA9</i> par RT-PCR.....	130
Tableau IX. Patients leucémiques avec une fusion <i>RUNX1-PRDM16</i> rapportés dans la littérature.....	162

Liste des figures

Figure 1. Le développement de la leucémie myéloïde chronique en phase chronique et en phase blastique.	4
Figure 2. La morphologie de la leucémie myéloïde chronique en phase chronique et en phase blastique.	8
Figure 3. La translocation chromosomique t(9;22)(q34.1;q11.2) et ses différents produits de fusion.	13
Figure 4. Les principales voies de signalisation activées dans la leucémie myéloïde chronique.	18
Figure 5. Structure d'ABL1 liée à l'imatinib, au nilotinib et au dasatinib.	25
Figure 6. Activité de l'imatinib et des inhibiteurs de tyrosine kinase de deuxième génération, le nilotinib et le dasatinib, sur BCR-ABL1 sauvage et sur différents mutants BCR-ABL1 chez des patients porteurs de LMC et représentation du complexe Imatinib-ABL1.	28
Figure 7. Les différentes voies de signalisation impliquées dans l'autorenouvellement de la cellule souche de la leucémie myéloïde chronique.	43
Figure 8. Caryotypes en bandes GTG et caryotype spectral révélant la présence des translocations chromosomiques t(9;22) et t(1;21) chez la patiente 02H056.	90
Figure 9. Identification du réarrangement du gène <i>RUNX1</i> par hybridation in situ en fluorescence dans la t(1;21)(p36.3;q11.2).	93
Figure 10. Délimitation de la région chromosomique 1p36.3 impliquée dans la translocation t(1;21)(p36.3;q22.1) par hybridation in situ en fluorescence.	94
Figure 11. Identification du réarrangement du gène <i>PRDM16</i> par hybridation in situ en fluorescence dans la t(1;21)(p36.3;q11.2).	95
Figure 12. Identification des transcrits de fusions <i>RUNX1-PRDM16</i> dans la translocation t(1;21).	98
Figure 13. Transcrit de fusion <i>RUNX1-PRDM16</i> qui respecte le cadre de lecture vs transcrit de fusion qui ne respecte pas le cadre de lecture et domaines probables présents au niveau des protéines de fusion.	100
Figure 14. Expression de <i>PRDM16</i> chez la patiente 02H056 en phase chronique vs en phase blastique de la leucémie myéloïde chronique.	102
Figure 15. Étude de l'expression de <i>PRDM16</i> dans 105 échantillons.	105
Figure 16. Étude du réarrangement et de l'amplification du gène <i>PRDM16</i> dans les cas surexprimant <i>PRDM16</i>	112
Figure 17. Caryotype en bandes GTG révélant la présence des translocations chromosomiques t(9;22) et t(7;17) chez le patient 06H006.	115
Figure 18. Identification du réarrangement du locus <i>HOXA</i> par hybridation in situ en fluorescence dans la translocation t(7;17)(p15;q22).	116
Figure 19. Identification du réarrangement du gène <i>MSI2</i> dans la translocation t(7;17)(p15;q22) par hybridation in situ en fluorescence.	117
Figure 20. Identification des transcrits de fusion <i>MSI2-HOXA9</i> dans la translocation t(7;17).	120
Figure 21. Identification des transcrits de fusions <i>MSI2-HOXA10</i> et <i>MSI2-HOXA11</i> dans la translocation t(7;17).	124
Figure 22. Expression des gènes <i>HOXA</i> dans notre cas avec la translocation t(7;17).	127

Figure 23. Épissage alternatif identifié au niveau de <i>HOXA9</i> .	128
Figure 24. Expression des gènes <i>HOXA6</i> , <i>HOXA7</i> et <i>HOXA9</i> dans la phase blastique de la leucémie myéloïde chronique et dans la leucémie aiguë myéloïde.	131
Figure 25. Caryotype en bandes GTG révélant la présence des translocations chromosomiques t(9;22) et t(8;17) chez le patient 02H037.	133
Figure 26. Délimitation de la région chromosomique 8q11-8q12 impliquée dans la translocation t(8;17)(q1?1;q2?2) par hybridation in situ en fluorescence.	135
Figure 27. Identification du réarrangement du locus <i>SOX17</i> dans la translocation t(8;17) par hybridation in situ en fluorescence.	136
Figure 28. Délimitation de la région chromosomique au niveau des bras longs du chromosome 17, impliquée dans la translocation t(8;17) par hybridation in situ en fluorescence.	138
Figure 29. Identification du réarrangement du gène <i>MSI2</i> dans la translocation t(8;17) par hybridation in situ en fluorescence.	139
Figure 30. Identification de la fusion <i>MSI2-SOX17</i> dans la translocation t(8;17) par hybridation in situ en fluorescence.	140
Figure 31. Activation d'un nouveau transcrite de <i>SOX17</i> dans la translocation t(8;17) détectée par RT-PCR et analysé par séquençage.	142
Figure 32. Caryotype en bandes GTG révélant la présence des translocations chromosomiques t(9;22) et t(2;12) chez le patient 02H052.	144
Figure 33. Identification d'un réarrangement du gène <i>ETV6</i> par hybridation in situ en fluorescence dans la t(2;12)(q31;p13) chez le patient 02H052.	146
Figure 34. Délimitation de la région impliquée dans la translocation t(2;12) au niveau de la bande chromosomique 2q31 par hybridation in situ en fluorescence.	147
Figure 35. Identification d'un réarrangement du locus <i>HOXD</i> dans la translocation t(2;12).	148
Figure 36. Identification d'une forme tronquée de <i>ETV6</i> et d'une fusion <i>ETV6-HOXD11</i> par amplification rapide des extrémités 3' des acides désoxyribonucléiques complémentaires - Réactions en chaîne par polymérisation.	150
Figure 37. Identification d'une forme tronquée de <i>ETV6</i> et d'un site d'épissage alternatif commun aux translocations chromosomiques impliquant <i>ETV6</i> .	152
Figure 38. Activation de <i>HOXD9</i> dans les cellules du patient 02H052 avec la translocation t(2;12).	154
Figure 39. Modèle proposé du rôle oncogénique de la t(1;21) dans la progression de la leucémie myéloïde chronique.	164
Figure 40. Modèle proposé du rôle oncogénique de la t(7;17) dans la progression de la leucémie myéloïde chronique.	173
Figure 41. Modèle proposé du rôle oncogénique de la t(2;12) dans la progression de la leucémie myéloïde chronique.	179
Figure 42. Modèle proposé du rôle oncogénique de la t(8;17) dans la progression de la leucémie myéloïde chronique.	183
Figure 43. Modèle commun proposé pour les quatre translocations chromosomiques t(1;21), t(7;17), t(8;17) et t(2;12) dans la progression de la leucémie myéloïde chronique.	186

Dédicace

*Je dédie mon travail à mes chers parents et mon mari pour qui
aucune dédicace ne saurait exprimer mon profond amour et ma gratitude.*

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier ma directrice de recherche, Dr Josée Hébert, de m'avoir accueilli comme première étudiante à la Banque de cellules leucémiques du Québec (BCLQ). Je tiens à exprimer ma plus sincère reconnaissance pour son soutien et ses encouragements. Travailler auprès de vous et de votre équipe a été une expérience des plus enrichissantes qui me guidera incontestablement dans le reste de mon cheminement.

Je remercie les deux équipes des laboratoires de cytogénétique à l'hôpital Maisonneuve-Rosemont, le laboratoire clinique et la BCLQ. Un grand merci à Lorraine Forest, Claude Rondeau, Sylvie Lavallée, Marie-Claude Frenette et Annie S. Bilodeau avec qui j'ai passé mes années de formation et qui ne cessaient de m'encourager. Je remercie mes collègues de laboratoire Amélie Giguère, Hend Chaker et Marie-Noëlle Séguin-Grignon, pour l'échange scientifique et leur compagnie.

Merci à mes enfants, Raoul et Ryan, de m'avoir soutenu et supporté. Merci à mes parents qui ne cessent de m'encourager de l'autre côté de l'Atlantique. Merci à toute ma famille pour leur patience.

Je tiens à souligner que ces travaux ont été réalisés grâce à une bourse de formation du Fonds de recherche du Québec en Santé (FRQS), des bourses d'excellence de l'Université de Montréal et des fonds de recherche de ma directrice.

Et finalement, merci aux membres du jury d'avoir donné de leur temps pour évaluer ce travail.

INTRODUCTION

Chapitre 1: La leucémie myéloïde chronique

1.1.Hématopoïèse normale, leucémie myéloïde chronique et syndromes myéloprolifératifs

L'étude de l'hématopoïèse a débuté lorsque Till et McCulloch ont découvert que les cellules de la moelle osseuse (MO) injectées dans des souris irradiées donnaient naissance à des colonies mixtes dans la rate (Till and Mc, 1961). D'autre part, Bradley et Metcalf ont démontré que dans un milieu semi-solide, ces cellules formaient des colonies hétérogènes (Bradley and Metcalf, 1966). Sous l'action de facteurs de croissance, ce processus dynamique assure le remplacement continu des différentes cellules sanguines. Il repose sur deux caractéristiques importantes de la cellule souche hématopoïétique (CSH) : l'autorenouvellement et la différenciation. L'autorenouvellement est la capacité d'une cellule souche de se diviser pour donner deux cellules souches identiques (division symétrique). La différenciation des CSHs est la capacité de produire toutes les cellules médullaires de morphologie et de fonction différentes. Dans ce cas une CSH produit deux cellules différentes (division asymétrique), une cellule fille identique à la cellule mère et une cellule (progéniteur) qui va se différencier en une cellule spécialisée du sang. On distingue quatre compartiments soit les CSHs, les progéniteurs, les précurseurs et les cellules matures fonctionnelles qui peuvent passer dans le sang. En se différenciant, la CSH donne toutes les lignées hématopoïétiques qui vont constituer les lignées myéloïdes et lymphoïdes : les neutrophiles, éosinophiles et basophiles, les monocytes et macrophages, les plaquettes, les érythrocytes et les lymphocytes B et T (Zhu and Emerson, 2002). Le maintien et le fonctionnement de ces différentes cellules hématopoïétiques, des progéniteurs et des cellules souches, implique la coordination des voies de signalisation qui répondent à des stimuli extracellulaires et des facteurs de croissance. Ainsi le maintien et le

destin du pool de CSHs dépendent de plusieurs facteurs de transcription importants dans la différenciation des cellules hématopoïétiques. La dérégulation de ces facteurs de transcription et d'autres gènes impliqués dans les différentes voies liées à l'hématopoïèse peut causer un état préneoplasique ou néoplasique induisant des syndromes myélodysplasiques (SMD), des syndromes myéloprolifératifs (SMP), des leucémies ou des lymphomes. Ce dysfonctionnement peut être consécutif à une expression aberrante de ces gènes. Plusieurs causes peuvent être à l'origine de ce dérèglement incluant des mutations ponctuelles, des anomalies de structure telles que les translocations chromosomiques, ou des effets épigénétiques qui peuvent être en *cis* ou en *trans* au niveau du locus où se trouve le gène altéré affectant l'hématopoïèse.

La leucémie est caractérisée par un blocage de maturation qui va favoriser l'expansion d'une population immature et l'extinction de la population mature normale qui a un rôle fonctionnel au niveau du sang. En effet la leucémie est caractérisée par l'accumulation et/ou la prolifération non contrôlée des cellules hématopoïétiques destinées à se différencier. Ces cellules immatures envahissent la moelle osseuse et empêchent la production normale des cellules sanguines. Parmi les leucémies, on distingue les leucémies aiguës et les leucémies chroniques selon la rapidité d'évolution.

La leucémie aiguë myéloïde (LAM) et la leucémie myéloïde chronique (LMC) diffèrent au niveau de leurs caractéristiques cliniques et hématologiques. La LAM peut survenir à n'importe quel âge, tandis que la LMC est très rare chez les enfants. Dans la LAM, l'évolution de la maladie sans traitement est rapide et fatale en-dedans de 6 mois et moins, alors que la LMC peut évoluer sur plusieurs années avec des signes cliniques plus indolents. Une augmentation de volume de la rate est plus souvent notée dans la LMC que dans la LAM. D'autre part, les paramètres hématologiques des deux leucémies sont différents. En général, lors du diagnostic initial, la perte des fonctions normales des cellules sanguines est beaucoup plus marquée dans la LAM. Le décompte des globules blancs est variable dans la LAM mais il est élevé dans la LMC, tandis que le décompte plaquettaire souvent abaissé dans la LAM, est fréquemment augmenté dans la LMC (Swerdlow et al., 2008).

La LMC fait partie des syndromes myéloprolifératifs. Le terme syndrome myéloprolifératif a été proposé en 1951 par William Damashek pour souligner la similarité entre la LMC, la polycythaemia vera (PV) ou maladie de Vaquez, la thrombocytémie essentielle (TE) et la

myélofibrose primaire (MF) (Damashek, 1951). Ce terme est proposé pour décrire un groupe hétérogène d'hémopathies malignes clonales acquises de la MO caractérisé par une hyperplasie avec prolifération excessive d'une ou de plusieurs lignées cellulaires myéloïdes représentées dans le sang périphérique par la surproduction des cellules correspondantes. Compte tenu des difficultés à distinguer la PV, la MF, et d'autres SMP, Damashek proposa de les considérer comme "étroitement liées" (Damashek, 1951). Cette idée s'est révélée remarquablement prémonitoire en ce qui concerne les fondements génétiques de la maladie et l'identification du rôle central des tyrosines kinases dans la pathogenèse de ces hémopathies. Dans cette entité, des découvertes importantes incluant le gène de fusion *BCR-ABL1* et la mutation de la kinase *JAK2* ont mené au développement de traitements ciblant spécifiquement l'anomalie moléculaire.

Les SMP classiques comprennent quatre entités cliniques distinctes: la LMC, la PV, la TE et la MF. Dans la LMC, la MO présente une hyperplasie granulocytaire (Figure 1) avec augmentation prédominante des granulocytes neutrophiles, éosinophiles et basophiles dans le sang périphérique (SP). Dans la PV, une hyperplasie érythroïde dans la MO est accompagnée par une augmentation des érythrocytes dans le sang, alors que la TE est caractérisée par une prédominance des mégacaryocytes médullaires avec une augmentation des plaquettes dans le sang (Wang et al., 1996). La MF est caractérisée par la diminution de toutes les cellules sanguines (pancytopenie) surtout dans la dernière phase de la maladie. Toutefois, dans les premiers stades de la MF on peut observer l'augmentation de toutes les cellules de la lignée myéloïde. Il est important de noter que malgré l'augmentation dominante d'un type cellulaire particulier pour chaque entité, tous les types de cellules myéloïdes peuvent être augmentés dans les SMPs. La splénomégalie est la caractéristique physique la plus fréquemment observée dans les SMPs, alors que la présence d'hématopoïèse extramédullaire est souvent notée sur le plan pathologique (Randolph, 2005). En plus des transitions fréquentes entre ces syndromes, certaines caractéristiques peuvent aussi se chevaucher ce qui peut rendre difficile la classification d'un cas de SMP.

Dans la classification French–American–British Cooperative group (FAB), basée principalement sur les caractéristiques morphologiques des hémopathies malignes (Bennett et al., 1976), la LMC est classée dans les SMPs, se distinguant des autres types par la

présence du chromosome Philadelphie (Ph). La nouvelle classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) « World Health Organization, WHO » révisée en 2008 (Swerdlow et al., 2008), a intégré des données génétiques aux données morphologiques, immunophénotypiques et cliniques (Vardiman JW, 2002). En plus des SMPs classiques, elle inclut les maladies des mastocytes, la leucémie chronique neutrophilique et la leucémie chronique éosinophilique dans le groupe des SMPs, dorénavant nommés néoplasies myéloprolifératives (NMP). Les syndromes éosinophiliques sont inclus dans une catégorie caractérisée par des anomalies génétiques de *PDGFRA*, *PDGFRB* ou *FGFR1*. Le diagnostic de la PV et la TE intègre les mutations de *JAK2* (V617F) et de *MPL* (W515K/L).

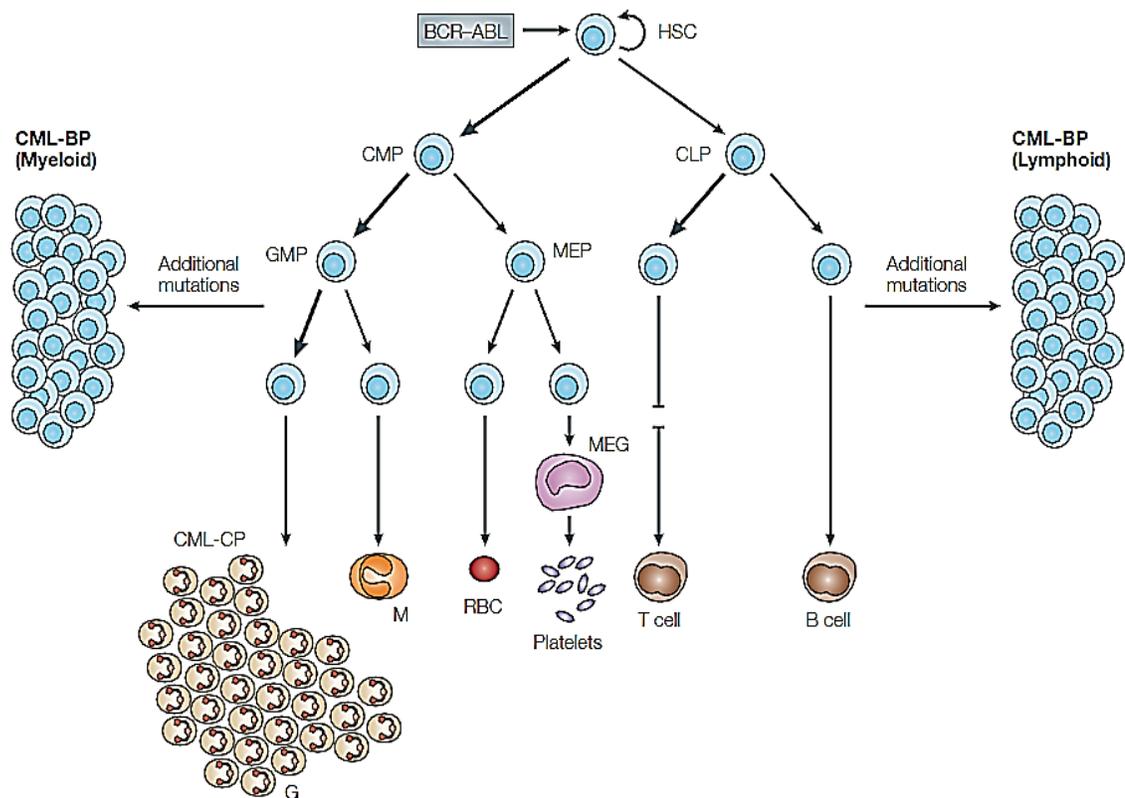


Figure 1. Le développement de la leucémie myéloïde chronique en phase chronique et en phase blastique.

La leucémie myéloïde chronique (LMC) est initiée par l'expression de la fusion *BCR-ABL1* dans la cellule souche hématopoïétique (CSH). Ces CSHs avec la fusion *BCR-ABL1* peuvent se différencier en progéniteurs communs myéloïdes (CMP) qui se différencient à leur tour en progéniteurs granulocytes/macrophages (GMP; progéniteurs des granulocytes (G) et des macrophages (M)) et des progéniteurs mégacaryocytes/érythrocytes (MEP; les progéniteurs des globules rouges (RBC) et des mégacaryocytes (MEG) qui produisent les

plaquettes. Les CSHs se différencient également en progéniteurs lymphoïdes communs (CLP) qui vont donner les cellules T et B. La phase initiale chronique de la LMC est caractérisée par une expansion massive des cellules granulocytaires. L'acquisition de mutations additionnelles cause la progression de la LMC de la phase chronique à la phase blastique caractérisée par l'accumulation de blastes myéloïdes ou lymphoïdes (Ren, 2005). Figure reproduite avec permission de Nature publishing groupe (npg): Nature Review Cancer, Ren R et al., Nat Rev Cancer. 2005 Feb; 5(3) 172-83., copyright 2010.

1.2. Historique, incidence et étiologie de la leucémie myéloïde chronique

La LMC a été décrite pour la première fois en 1845, simultanément par Rudolf Virchow à Berlin et John Hughes Bennett à Édimbourg (Rowley, 1973b; Virchow, 1847). Ce dernier a rapporté un cas "d'hypertrophie de la rate et du foie où la mort a eu lieu de suppuration du sang" dans le journal médical d'Édimbourg. Quelques semaines plus tard, Virchow à Berlin a publié un cas très semblable. Bien que Bennett pensa que le patient avait eu une infection, Virchow soupçonna un trouble néoplasique qu'il appela « maladie du sang blanc » et inventât le mot « leukämie » (leucémie) en 1887 (Virchow, 1847). Ceci représente les premières descriptions de ce qui devint plus tard connu sous le nom de leucémie myéloïde chronique (LMC). En 1872 Ernst Neumann a observé que les cellules leucémiques originaient de la moelle osseuse. Dans les décennies suivantes les notions de leucémie à différenciation myéloïde versus lymphoïde et de leucémie aiguë versus chronique ont été décrites. En 1960, la découverte des chercheurs Peter Nowell et David Hungerford fut une grande étape dans la recherche scientifique, car leur observation a révélé sans équivoque que le cancer était causé par une anomalie génétique (Nowell and Hungerford, 1960). En effet, Nowell et Hungerford ont découvert la présence d'un chromosome anormalement petit, toujours présent dans les cellules leucémiques de la LMC, appelé le chromosome de Philadelphie (Ph). L'origine de ce chromosome n'a été identifiée que treize ans plus tard par Janet Rowley comme étant le produit d'une translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22 (Rowley, 1973b).

L'incidence annuelle de la LMC est de 1 à 2 cas par 100,000 personnes (Swerdlow et al., 2008). La maladie peut survenir à n'importe quel âge mais l'âge moyen au diagnostic se situe dans les 5^{ème} et 6^{ème} décades de vie. Les hommes sont affectés plus que les femmes

avec un ratio de 3:2, et cette maladie est très rare chez les enfants (Wang et al., 1996). Son incidence augmente avec l'âge et est maximale à 53 ans.

Les facteurs prédisposant à la LMC sont inconnus dans la plupart des cas. Par contre, la LMC a été associée à l'exposition à la radiation (Preston et al., 1994) et à l'exposition prolongée au benzène à hautes doses (Lichtman, 2008). Cependant, aucune étude épidémiologique n'a confirmé une association statistiquement significative entre la LMC et l'exposition aux produits chimiques comme le benzène, les agents alkylants, les inhibiteurs de la topoisomérase II et autres agents de chimiothérapie (Lichtman, 2008).

1.3. Facteurs pronostiques, cliniques et biologiques de la leucémie myéloïde chronique

La plupart des patients porteurs de LMC sont diagnostiqués dans la phase chronique de la maladie. Environ 20 à 40% des patients sont asymptomatiques au diagnostic et se présentent seulement avec un taux élevé de globules blancs. La symptomatologie commune comprend des sueurs nocturnes, une perte de poids, une splénomégalie et de l'anémie (Cotta and Bueso-Ramos, 2007; Savage et al., 1997). Des présentations atypiques sont aussi possibles, incluant une thrombocytose marquée non accompagnée par une augmentation des globules blancs. Certains patients peuvent aussi se présenter en phase avancée (LMC en phase accélérée ou blastique) (Anastasi et al., 1998; Cotta and Bueso-Ramos, 2007; Savage et al., 1997). En absence de traitement la plupart des patients progressent de la phase chronique (PC) à la phase blastique (PB), soit directement ou en passant par une phase d'accélération (PA). La phase avancée de la maladie est généralement caractérisée par des symptômes cliniques plus agressifs et une anémie sévère, une thrombocytopénie ou une hypertrophie marquée de la rate (Garcia-Manero et al., 2003). En phase chronique, le sang périphérique présente une leucocytose ($12-1000 \times 10^9/L$, médiane : $\sim 100 \times 10^9/L$) avec présence de cellules myéloïdes à différents stades de maturation (Swerdlow et al., 2008). Dans cette phase toutes les lignées sont représentées (Figures 1 et 2) sans signe significatif de dysplasie et en général le pourcentage des blastes sanguins est moins de 2% (Bennett et al., 1994; Spiers et al., 1977). Une basophilie absolue est souvent présente et l'éosinophilie est commune (Bennett et al., 1994; Spiers et al., 1977). Une monocytose absolue peut être observée mais la fraction est de moins de 3% (Bennett et al., 1994). Le décompte des plaquettes peut être

normal ou élevé (Savage et al., 1997). La cellularité de la MO est augmentée à cause de la prolifération des cellules de la lignée granulocytaire, qui ont un profil de maturation similaire à celui décrit dans le sang (Cotta and Bueso-Ramos, 2007; Muehleck et al., 1984). Le pourcentage des blastes est de moins de 5% des cellules de la MO dans la PC, un pourcentage de 10% et plus étant un signe de progression (Cortes et al., 2006). Les mégacaryocytes peuvent être normaux mais souvent plus petits que la normale avec des noyaux hypolobulés (Swerdlow et al., 2008).

Les critères de la PA de la LMC (Swerdlow et al., 2008) sont : (1) persistance ou augmentation du nombre de globules blancs ($>10 \times 10^9/L$) et/ou persistance ou augmentation de la splénomégalie qui ne répond pas au traitement, (2) persistance d'une thrombocytose ($>1000 \times 10^9/L$) non contrôlée par la thérapie, (3) persistance d'une thrombocytopenie ($<100 \times 10^9/L$) non reliée à la thérapie, (4) évolution cytogénétique clonale, (5) présence de 20% ou plus de basophiles dans le sang périphérique, et (6) présence de 10 à 19% de myéloblastes dans le sang ou la moelle. La présence de lymphoblastes dans le sang ou la moelle en PA est inhabituelle et indique une évolution vers une PB lymphoblastique (Derderian et al., 1993). Les critères 1 à 4 sont associés à une transition de la phase chronique à la PA, alors que les paramètres 5 et 6 sont plutôt associés à une transition de la PA à la PB. La PB est diagnostiquée lorsque le pourcentage de blastes est supérieur ou égal à 20% dans le sang ou la moelle ou s'il y a prolifération blastique extramédullaire. Dans environ 70% des cas les blastes sont d'origine myéloïde et dans approximativement 30% des cas ils sont de type lymphoïde. Les sites de prolifération blastique extramédullaires les plus communs sont la peau, les ganglions, le foie et le système nerveux central (Swerdlow et al., 2008).

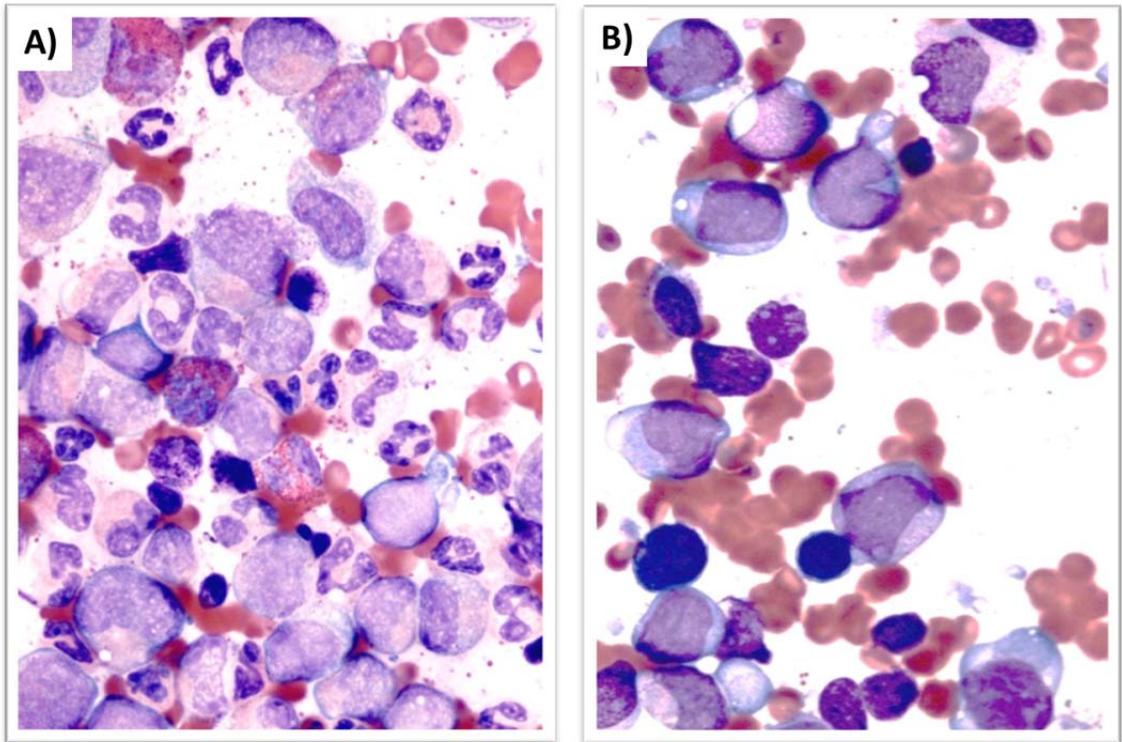


Figure 2. La morphologie de la leucémie myéloïde chronique en phase chronique et en phase blastique.

A) Frottis sanguin périphérique prélevé chez un patient en phase chronique de la leucémie myéloïde chronique (LMC) après coloration au May Grünwald Giemsa (MGG) en microscopie optique pour analyse cytologique révélant la présence de toutes les lignées cellulaires incluant les neutrophiles. B) Frottis sanguin périphérique prélevé chez un patient en phase blastique de la LMC après coloration au MGG révélant l'arrêt de différenciation hématopoïétique et l'excès de blastes. Les deux images sont extraites de la banque de données morphologiques de la Banque de cellules leucémiques du Québec (BCLQ).

1.4. Mécanismes moléculaires de la leucémie myéloïde chronique

1.4.1. La translocation t(9;22) et la fusion *BCR-ABL1* dans la leucémie myéloïde chronique

La translocation chromosomique t(9;22)(q34.1;q11.2) génère un gène de fusion impliquant le gène *ABL1* (c-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase) localisé sur la bande chromosomique 9q34 et le gène *BCR* (breakpoint cluster region) localisé sur la bande chromosomique 22q11.2 (Shtivelman et al., 1985). *ABL1* code pour une tyrosine kinase de type « non récepteur » exprimée dans tous les tissus et ayant deux isoformes, 1a et 1b. L'isoforme 1a ne contient pas en N-terminal le site de myristoylation présent dans l'isoforme 1b. Les protéines Abl ont une organisation similaire à celle des membres de la famille Src, caractérisée par une région N-terminale unique suivie des domaines d'interaction SH3 (Src homology 3) et SH2, ainsi que du domaine catalytique SH1 qui présente l'activité tyrosine kinase. La protéine c-Abl contient aussi un domaine central riche en prolines qui permet des interactions avec des protéines possédant des domaines SH3. La région C-terminale présente un domaine de liaison à l'ADN, important pour les fonctions nucléaires, trois signaux de localisation nucléaire (NLS: Nuclear Localisation Signal) ainsi qu'un site de liaison à l'actine (Pendergast, 2002). Le gène *ABL1* exprime des ARNs messagers de 6 ou 7 kilobases (kb) selon l'épissage alternatif des premiers exons. Ces deux exons alternatifs d'*ABL1*, nommés exon 1a et 1b, sont localisés en position 5' par rapport à la région commune (exons 2-11) (Figure 3). Lorsque la protéine est traduite à partir de l'exon 1a (*ABL1A*), elle est nucléaire. Par contre, si elle est exprimée à partir de l'exon 1b (*ABL1B*), elle est cytoplasmique. Au niveau de la cellule, la protéine est présente dans le noyau et le cytoplasme et peut se déplacer entre ces deux compartiments (Sirvent et al., 2008). La localisation cytoplasmique est due à la myristoylation au niveau de la glycine présente en N-terminal, qui permet à la protéine de se fixer sur la membrane cytoplasmique. La capacité de c-Abl à phosphoryler les substrats cibles est considérablement plus faible que celle de Bcr-Abl et v-Abl viral. En situation normale, la protéine c-Abl est inactive (autoinhibition) grâce à une conformation ne permettant pas à l'ATP d'avoir accès au site de phosphorylation d'Abl (Pluk et al., 2002). Cette autoinhibition est assurée par le groupement myristoyl rattaché au domaine SH3 dans la

partie N-terminale de la kinase. La conservation de l'état inactif de la kinase est essentielle, et son activation de façon constitutive dans les cellules hématopoïétiques peut entraîner une LMC (Hantschel and Superti-Furga, 2004). D'autres kinases peuvent s'associer avec Abl, changer sa conformation et compromettre son état inactif. c-Abl est impliquée dans plusieurs processus cellulaires, incluant la différenciation, le cycle et la division cellulaire, la mort cellulaire, la réponse au stress (en stabilisant p73 et p53), l'adhésion et la transmission de l'information via les intégrines (Sawyers et al., 1994; Sirvent et al., 2008; Van Etten, 1999; Wang, 2000; Yuan et al., 1999). L'activation de c-Abl cytoplasmique joue un rôle important dans les réponses cellulaires induites par les facteurs de croissance, incluant la synthèse d'ADN et l'assemblage de la F-actin. c-Abl a aussi des fonctions négatives sur la prolifération cellulaire (Sawyers et al., 1994; Wen et al., 1996). En effet, c-Abl a des fonctions antagonistes selon sa localisation cellulaire. Dans les noyaux, c-Abl est activée en réponse aux dommages à l'ADN et contribue à l'apoptose (Wang et al., 2000). La protéine c-Abl nucléaire induit un blocage en G1 dans le cycle cellulaire, tandis que c-Abl cytoplasmique va activer la mitogenèse (Vigneri and Wang, 2001). La protéine nucléaire affecte également la mobilité et l'adhésion cellulaire (Taagepera et al., 1998). Le rôle positif mitogénique d'Abl a été révélé par des études fonctionnelles dans des cellules Abl-déficientes. Ces cellules montrent un retard dans la synthèse de l'ADN suite à l'induction en présence de sérum et du facteur de croissance PDGF (Furstoss et al., 2002; Plattner et al., 1999).

Le rôle oncogénique et le réarrangement d'*ABL1* ne se limite pas à la LMC et la *t(9;22)/BCR-ABL1*. À ce jour, quatre autres gènes fusionnés à *ABL1* ont été décrits: *ETV6*, *ZMIZ1*, *EML1* et *NUP214* (De Braekeleer et al., 2011b). Dans ces fusions, le domaine kinase de *ABL1* est toujours présent avec soit le domaine hélice-boucle-hélice ou le domaine « coiled-coil » du partenaire en N-terminal. Citons comme exemple, la présence du domaine hélice-boucle-hélice de *ETV6* dans la fusion *ETV6-ABL1* associée à la translocation *t(9;12)(q34;p13)* retrouvée dans la leucémie aiguë lymphoïde (LAL), la LMC et la LAM où les conséquences de la fusion sont semblables à ceux de la fusion *BCR-ABL1*, soit une activation constitutive de la kinase (Andreasson et al., 1997; Hannemann et al., 1998; Papadopoulos et al., 1995).

Le gène *BCR* contient 23 exons et occupe une région de 135 kb sur le chromosome 22. Il code pour deux protéines de 160 et 130 kDa issues respectivement des ARNm de 6,7 et 4,5

kb. L'expression de *BCR* est ubiquitaire dans les cellules humaines (Collins et al., 1987; Hariharan and Adams, 1987; Heisterkamp et al., 1985). Dans les tissus murins et humains le niveau de l'ARNm est plus élevé dans le cerveau et les cellules hématopoïétiques (Collins et al., 1987; Zhu et al., 1990). La protéine Bcr est exprimée plus fortement dans les premiers stades de la différenciation myéloïde avec un niveau d'expression plus faible dans les neutrophiles matures (Wetzler et al., 1993). Elle est essentiellement cytoplasmique mais aussi détectable dans le noyau où elle pourrait se lier à l'ADN (Wetzler et al., 1995). La perturbation des fonctions de Bcr est importante dans la pathogénèse de la LMC. Seulement la partie N-terminale de Bcr est présente dans la fusion Bcr-Abl. Elle comprend un domaine d'oligomérisation et un domaine sérine/thréonine kinase, nécessaires au potentiel transformant de la fusion BCR-ABL1 dans les cellules lymphoïdes et les fibroblastes transformés (McWhirter et al., 1993). Ce dernier domaine comprend trois sites de liaison SH2 capables d'interagir avec des protéines ayant des domaines SH2 et inclut un résidu TYR177 nécessaire pour la liaison à Grb2 (« growth factor receptor-bound protein 2 ») et pour l'activation de la voie de signalisation RAS (Ma et al., 1997; Reuther et al., 1994). Le centre de la protéine Bcr est composé de séquences DBL-like stimulant l'échange GTP-GDP par les Rho-GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) (Denhardt, 1996; Goldman and Melo, 2003). Ce domaine GEF peut lier la protéine ERCC3 impliquée dans la réparation de l'ADN (Maru et al., 1999). La région COOH terminale de Bcr contient le domaine RAC-GAP composé de séquences homologues aux domaines catalytiques des protéines GAP (GTPases-activating protein) qui agissent sur Rac et régulent la polymérisation de l'actine ainsi que l'activité NADPH oxydase des macrophages et des neutrophiles. En effet, une augmentation du métabolisme oxydatif des neutrophiles a été démontrée dans un modèle de souris « Bcr-null » ce qui suggère un rôle de Bcr dans la régulation de la production de radicaux superoxydes (Voncken et al., 1995b).

Dans la t(9;22), le point de cassure au niveau d'*ABL1* est localisé soit en amont de l'exon 1b ou en aval de l'exon 1a (Figure 3), ou plus fréquemment entre l'exon 1b et l'exon 1a (Melo, 1996). Chez la plupart des patients porteurs de LMC ainsi qu'un tiers des patients avec LAL pré-B Ph positif, le point de cassure au niveau de *BCR* est situé dans une région de 5.8 kb qui couvre les exons e12-e16 (anciennement nommés b1-b5) appelée « major breakpoint cluster region » M-bcr. L'épissage alternatif donne les transcrits de fusion e13a2 (ou b2a2) et e14a2 (ou b3a2) qui génèrent une protéine de 210 kDa p210BCR-ABL1

(Faderl et al., 1999). Chez deux tiers des patients LAL-B Ph positif ainsi que dans de rares cas de LMC, le point de cassure est localisé dans une région de 54.4 kb entre les exons e2 et e2' (minor breakpoint cluster region ou m-bcr), qui génère le transcrit e1a2 se traduisant en protéine p190BCR-ABL1. Le troisième point de cassure est le μ -bcr qui donne une protéine de fusion de 230 kDa (p230BCR-ABL1), retrouvée dans les leucémies chroniques neutrophiliques (Pane et al., 1996) (Figure 3).

La fusion BCR-ABL1 contient plusieurs domaines fonctionnels distincts de ABL1 excluant son domaine N-terminal absent de la fusion, lui permettant de se libérer de son autoinhibition. Les autres domaines d'ABL1 sont tous présents, soit les domaines SH3, SH2, le domaine tyrosine kinase SH1, le domaine de fixation à l'ADN et les domaines de liaison à l'actine (Figure 3). À l'extrémité N-terminale de la fusion, le domaine d'oligomérisation de BCR assure l'activation constitutive de la fonction tyrosine kinase d'ABL1 et la localisation majoritairement cytoplasmique de la protéine BCR-ABL1 (Goldman and Melo, 2003). La protéine de fusion BCR-ABL1 étant exprimée à partir de la région promotrice de BCR, démontre un profil d'expression similaire à BCR au niveau de la différenciation myéloïde (Wetzler et al., 1993). La fonction principale de l'oncoprotéine p210BCR/ABL1 est enzymatique. En effet, l'activité tyrosine kinase intrinsèque de la protéine ABL1 est amplifiée par la juxtaposition de la protéine BCR avec son domaine de dimérisation (DD) (Lugo et al., 1990). Cette tyrosine kinase ainsi activée de façon constitutive entraîne la phosphorylation de nombreux substrats impliqués majoritairement dans des voies de signalisation intracellulaires. Ces substrats sont eux-mêmes activés en permanence et entraînent la prolifération cellulaire, la résistance à l'apoptose, et les phénomènes d'adhésion. Plusieurs modèles expérimentaux ont été utilisés pour démontrer l'effet oncogénique de la fusion BCR-ABL1 et la spécificité de cette fusion dans l'induction de la LMC. La fusion Bcr-Abl1 s'est avéré transformante dans des lignées cellulaires de fibroblastes murins, des lignées cellulaires hématopoïétiques facteur dépendantes et dans des cellules primaires de la moelle osseuse (Ren, 2002; Schuster et al., 2003). Dans un modèle murin, la transplantation de cellules souches hématopoïétiques exprimant Bcr-Abl1 induit la leucémie et des syndromes myéloprolifératifs, indiquant un rôle direct de la fusion dans la LMC (Daley et al., 1990; Elefanty et al., 1990; Voncken et al., 1995a). Cependant, plusieurs modèles expérimentaux ont étudié la fusion BCR-ABL1 *in vivo* sous l'effet de promoteurs puissants, ce qui laisse plusieurs questions non

répondues sur les effets réels de la fusion BCR-ABL1 dans les cellules hématopoïétiques primaires humaines. Par contre, ces modèles ont aussi été importants pour l'identification de cibles thérapeutiques potentielles.

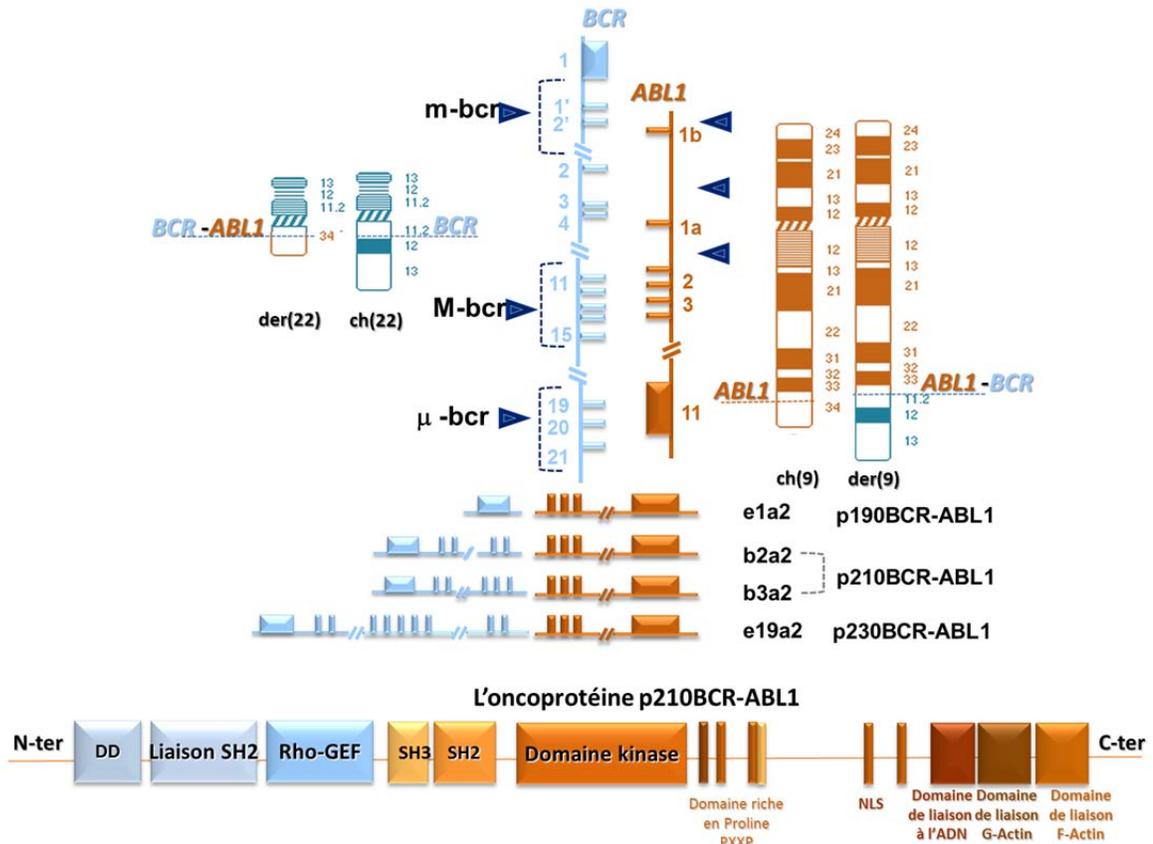


Figure 3. La translocation chromosomique $t(9;22)(q34.1;q11.2)$ et ses différents produits de fusion.

Suite à la translocation $t(9;22)$ et l'échange entre les bras longs des chromosomes 9 et 22, le chromosome Philadelphie (Ph) porteur de l'oncogène de fusion BCR-ABL1, est produit. Trois points de cassure principaux sont décrits au niveau du gène *BCR*. M-bcr (major breakpoint cluster region), m-bcr (minor breakpoint cluster region) et μ -bcr. Les points de cassure au niveau d'*ABL1* sont en amont de l'exon 2. Les différents transcrits de fusion e13a2 (b2a2) et e14a2 (b3a2) (point de cassure M-bcr) traduits en oncoprotéine p210BCR-ABL1, le transcrit e1a2 (point de cassure m-bcr) traduit en p190BCR-ABL1 et le transcrit e19a2 (point de cassure μ -bcr) traduit en p230BCR-ABL1. Dans la LMC classique, l'oncoprotéine de fusion BCR-ABL1 est la p210BCR-ABL1 qui contient en N-terminal, les domaines de la protéine BCR, soit le domaine de dimérisation (DD), le domaine de liaison SRC-homology 2 [SH2], et les domaines Rho GTP-GDP exchange-factor [GEF]. La partie C-terminale de l'oncoprotéine contient la majorité des domaines fonctionnels d'ABL1. Les SRC-homology regions 3, 2, 1 (SH3, SH2, SH1 : domaine kinase) et les domaines de liaison à l'ADN et à l'actine.

1.4.2. Effet oncogénique de la fusion BCR-ABL1

La localisation de l'oncoprotéine p210BCR-ABL1 de façon prédominante dans le cytoplasme (Ren, 2002), lui permet de phosphoryler plusieurs protéines qui vont se rassembler dans des complexes protéiques transmettant des signaux mitogéniques et antiapoptotiques (Cortez et al., 1996). La fusion BCR-ABL1 déclenche dans les cellules hématopoïétiques, l'activation de plusieurs voies de signalisation intéressant la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'adhésion et la migration, ainsi que des anomalies de réparation de l'ADN, sujets qui seront discutés dans les sections suivantes.

1.4.2.1. Activation des voies de signalisation RAS et MAPK

Dans la leucémogénèse, la voie de signalisation RAS activant la prolifération cellulaire est impliquée dans la LMC induite par la fusion BCR-ABL1. Elle est aussi activée suite à l'altération d'autres gènes comme *FLT3* et *KIT* (Steelman et al., 2008). Dans la LMC, l'activation de la voie RAS débute par l'interaction de la fusion Bcr-Abl1 avec le complexe Grb2. Ceci se fait via son site de liaison avec la portion Bcr de la fusion ainsi que le recrutement et la phosphorylation de l'adaptateur Shc (Puil et al., 1994) (Figure 4). L'autophosphorylation du résidu tyrosyl 177 de BCR procure un site d'ancrage au domaine SH2 de GRB2 (Pendergast et al., 1993). L'équipe de Bhatia (Modi et al., 2011) a récemment démontré que le « knockdown » de *Grb2* inhibe de façon significative la prolifération et la survie des cellules humaines CD34+ exprimant la fusion (Modi et al., 2011). Grâce à son domaine SH3, Grb2 recrute la protéine Sos « Son Of Sevenless » qui favorise l'échange d'un GDP contre un GTP au niveau de Ras, induisant la stabilisation et l'accumulation de la forme active de Ras (Goga et al., 1995; Pendergast et al., 1993; Puil et al., 1994; Tauchi et al., 1994). Suite à l'activation de la voie RAS et la cascade des MAPKinases (MAPK/ERK1/2), des cibles nucléaires sont activées tel que Fos, Jun et Myc impliquées au niveau de la prolifération cellulaire et la tumorigénèse (Burgess et al., 1998; Hess et al., 2002; Raitano et al., 1995; Sawyers et al., 1992) (Figure 4: axe vert). Ainsi l'interruption de l'activité de Myc par l'inhibiteur chimique 10058-F4 exerce un effet anti-leucémique ainsi qu'une interaction synergique avec l'imatinib (Fang et al., 2009). Une autre cible de la voie MAPK/ERK1/2 est le gène *PCBP2* qui est un inhibiteur de l'ARNm de *CEBPA*, un gène important pour la différenciation hématopoïétique (Chang et al., 2007;

Eiring et al., 2010). En conclusion, une des conséquences de l'activation de la voie RAS est l'expression anormalement élevée de différents gènes impliqués de façon directe ou indirecte au niveau de la transcription et de la réplication de l'ADN, affectant ainsi la prolifération cellulaire hématopoïétique [67].

1.4.2.2. Activation de la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR

La voie PI3K/AKT/mTOR (Figure 4: axes orange et jaune) est une voie de signalisation intracellulaire importante jouant un rôle clé dans la régulation de l'apoptose, le cycle cellulaire, ainsi que dans l'angiogenèse et l'homéostasie cellulaire. Elle participe ainsi à l'équilibre entre la survie et la mort cellulaire, et la rupture de cet équilibre dans les cellules cancéreuses induit une prolifération cellulaire non contrôlée. Dans la LMC, la voie PI3K est une voie de signalisation très importante activée par l'expression des protéines oncogéniques Abl1 affectant la prolifération, le cycle cellulaire et la survie [86-89]. BCR-ABL1 interagit indirectement avec la sous-unité régulatrice p85 de PI3K33 (Jain et al., 1996), via plusieurs autres protéines incluant Gab2 et Cbl (Jain et al., 1996; Sattler et al., 2002). L'activation de PI3K via son interaction avec Gab2 est importante dans la pathogenèse de la LMC. En effet, les cellules de la moelle osseuse déficientes en Gab2 sont résistantes à la transformation induite par la fusion BCR-ABL1 (Sattler et al., 2002). L'activation de la voie PI3K active ensuite la cascade Akt dépendante, qui joue un rôle important dans la transformation et la survie cellulaire induite par BCR/ABL1 (Skorski et al., 1997). En effet, Akt phosphoryle plusieurs cibles dont la protéine BAD. BAD est un membre proapoptotique de la famille Bcl2. Le déséquilibre ou la séquestration des membres proapoptotiques peut conférer un avantage anti-apoptotique à la cellule (Salomoni et al., 2000). Le ratio et la distribution pro- vs anti-apoptotique des membres de la famille Bcl2 localisés dans la mitochondrie sont importants dans l'apoptose. La protéine BAD phosphorylée est délocalisée de la mitochondrie vers le cytoplasme par la protéine 14-3-3. L'apoptose est ainsi inhibée via BAD (Datta et al., 1997) (Figure 4: axe orange). Un autre exemple de gènes cibles de Akt est *FOXO3*, dont la forme activée inhibe la transcription de la protéine anti-apoptotique Bim (Stahl et al., 2002). Les protéines mTOR « Mammalian target of rapamycin » sont aussi impliquées dans la voie PI3K/Akt. Ces

cibles thérapeutiques intéressantes sont catégorisées selon leur sensibilité à la rapamycine. Les protéines mTOR activent les protéines kinases qui sont impliquées dans la biosynthèse des ribosomes et la traduction de protéines ayant un rôle dans la transition G1-S (Benjamin et al., 2011). Récemment, il a été démontré que le complexe rapamycin-insensible (RI)-mTORC1 joue un rôle important dans la traduction des ARNm des gènes impliqués dans les réponses aux mitogènes dans les cellules BCR-ABL1 positives. Par ailleurs, mTORC2 aurait un rôle dans la survie et la prolifération de ces cellules. Dans la LMC résistante à l'Imatinib (IM) l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR a été impliquée dans la survie des cellules leucémiques (Burchert et al., 2005). Burchert et al., ont démontré que le traitement à l'IM active cette voie dans les cellules primaires leucémiques BCR-ABL1 positives *in vitro*, ainsi que chez les patients en phase chronique de LMC *in vivo*. Les inhibiteurs chimiques ainsi que des ARNs d'interférence ciblant mTor antagonisent le développement de la résistance à l'IM. Lorsque l'on cible les deux complexes mTORC2 et mTORC1 par un inhibiteur chimique qui induit l'inhibition de l'assemblage des polysomes (OSI-027) chez des patients atteints de LMC, cela réprime la prolifération des progéniteurs leucémiques et induit l'apoptose, même dans les cellules résistantes exprimant la mutation T315I-BCR-ABL1 (Carayol et al., 2010).

Cependant l'inhibition de mTor contourne la résistance à l'IM seulement quand la voie Akt est fortement activée. Malheureusement, les patients porteurs de LMC résistants à l'IM avec des mutations de la kinase BCR-ABL1 et les patients porteurs de LAL avec fusion BCR-ABL1 réfractaires au traitement, ont des mutations de la kinase indépendante de l'activation de la voie Akt (Burchert et al., 2005). Enfin notons aussi que l'activation de la voie PI3K/mTOR contribue à la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) via l'augmentation du métabolisme du glucose et de l'activité de la chaîne mitochondriale de transport des électrons (Kim et al., 2005).

1.4.2.3. Activation de la voie de signalisation JAK/STAT

L'activation de STAT5 (Figure 4, axe bleu) est particulièrement liée à la transformation myéloïde incluant les lignées granulocytaires, monocytaires, érythroïdes et mégacaryocytaires. L'activation constitutive de cette voie a été décrite dans la LMC, les érythroleucémies, les LAL, les SMPs et dans différents types de cancer (Kotecha et al., 2008). La voie STAT5 est une des premières voies identifiées comme activées

constitutivement par les fusions p210BCR-ABL1 et p190BCR-ABL1 (Carlesso et al., 1996; Ilaria and Van Etten, 1996; Shuai et al., 1996). BCR-ABL1 induit directement la phosphorylation et la dimérisation de STAT5, entraînant sa translocation nucléaire pour se lier à l'ADN, induisant ainsi l'activation de gènes cibles. Dans plusieurs systèmes expérimentaux, la protéine STAT5 a été démontrée comme étant essentielle pour la survie des cellules leucémiques. La signalisation JAK-STAT est normalement activée par les cytokines. L'activation de JAK2 et de STAT5 dans les cellules BCR-ABL1 transformées dépend de l'activité de la kinase ABL1. En effet, le traitement à l'IM inhibe la phosphorylation de JAK2 et de STAT5 (Fernandez de Mattos et al., 2004; Xie et al., 2001). De plus, le traitement des cellules *BCR-ABL1* positives avec des inhibiteurs de JAK2 ou la délétion de STAT5, induit l'apoptose même dans des cellules résistantes à l'IM (Hoelbl et al., 2010; Samanta et al., 2009; Samanta et al., 2006). Il a été démontré que la voie STAT5 est indépendante de JAK2 dans les cellules BCR-ABL1 positives (Xie et al., 2001). Récemment, Hantschel et collaborateurs (Hantschel et al., 2012) ont démontré dans des modèles de leucémie chez la souris, que JAK2 est essentielle pour la transformation lymphoïde initiale. Toutefois, la transformation myéloïde initiale et le maintien de la LMC ne requièrent pas JAK2 mais sont dépendantes de STAT5. Les études biochimiques et pharmacologiques présentées par ces auteurs suggèrent aussi que la fusion BCR-ABL1 phosphoryle directement STAT5. STAT5 active plusieurs voies anti-apoptotiques en aval de BCR-ABL1 (Carlesso et al., 1996; Ilaria and Van Etten, 1996; Shuai et al., 1996) et est essentielle pour la transformation oncogénique de BCR-ABL1 (Hoelbl et al., 2006). Récemment, la protéine Stat3 a aussi été démontrée comme étant nécessaire pour initier la transformation. Par contre, la délétion de Stat5 mais pas de Stat3 induit un arrêt du cycle cellulaire en G0/G1 et l'apoptose des cellules Bcr-Ab11 transformées, sensibles ou résistantes à l'IM *in vitro* (Hoelbl et al., 2010). En plus de l'activation de Bcl2l par Stat5 (de Groot et al., 2000; Gesbert and Griffin, 2000), Rad51 est aussi activée et est associée à la résistance aux traitements (Slupianek et al., 2001). Stat5 et Stat3 induisent aussi l'expression de Myc ainsi que des cyclines D1 et D2 (Horita et al., 2000; Steelman et al., 2008).

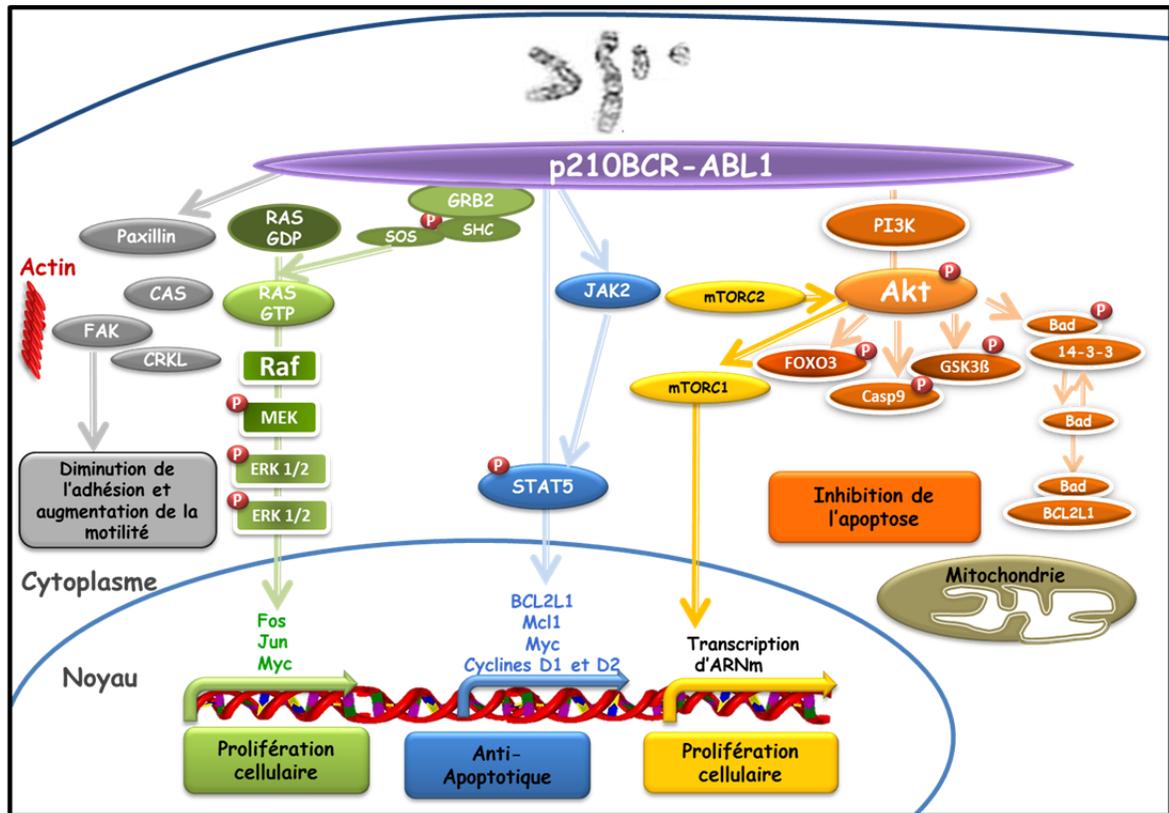


Figure 4. Les principales voies de signalisation activées dans la leucémie myéloïde chronique.

Axe vert: La voie de signalisation RAS (Rat sarcoma) débute par l'interaction de l'oncoprotéine de fusion BCR-ABL1 avec le complexe GRB2/Gab2 (growth factor receptor-bound protein 2) ainsi que le recrutement et la phosphorylation de l'adaptateur SHC (SRC-homology-containing protein). Le recrutement de la protéine SOS (Son of Sevenless), qui favorise l'échange d'un GDP contre un GTP au niveau de la protéine RAS et va induire la stabilisation et l'accumulation de la forme active de RAS. La cascade des MAPKinases (Raf1, MEK, ERK) est ensuite activée, entraînant l'activation des cibles nucléaires Fos, Jun et Myc impliquées au niveau de la prolifération cellulaire. **Axe orange:** La voie de signalisation PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase) réprime le programme de mort cellulaire et augmente la survie cellulaire. **Axe bleu:** La voie de signalisation STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5) est activée par BCR-ABL1 directement et/ou indirectement suite à l'activation de JAK2 (Janus kinase 2) ce qui entraîne l'activation des gènes de transcription comme le gène *BCL2L1*), induisant ainsi un signal anti-apoptotique. **Axe gris:** L'adhésion et la motilité cellulaire. BCR-ABL1 est associée avec les composants de l'adhésion et de la motilité cellulaire (actine, paxillin, FAK (Focal adhesion kinase) et CAS) ce qui va augmenter la motilité cellulaire et diminuer l'adhésion cellulaire.

1.5. Traitement de la leucémie myéloïde chronique

La progression du traitement de la LMC d'une thérapie non spécifique à une thérapie ciblée à l'anomalie moléculaire représente un exemple de réussite dans l'histoire du traitement des cancers.

1.5.1. Avant l'ère de l'imatinib

Avant la mise au point d'un traitement moléculaire ciblé, deux options thérapeutiques dominaient la prise en charge des patients atteints de LMC. La première option était l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, seul traitement curatif, qui permet l'élimination des cellules tumorales grâce au régime de conditionnement et à l'effet GVL (greffon *versus* leucémie). Dans la littérature, la survie sans récurrence à quatre ou cinq ans chez les patients en PA de la LMC traités par allogreffe, est de 18% à 49% selon les études (Gratwohl et al., 2006; Jiang et al., 2011; Kantarjian et al., 2005; Martin et al., 1988). En raison des développements récents dans le traitement de la LMC, la transplantation est actuellement indiquée dans les cas où les patients ne répondent pas au traitement avec des inhibiteurs de la tyrosine kinase (ITK) ou dans la phase avancée de la maladie. La deuxième option était l'utilisation de l'interféron alpha (IFN-alpha), susceptible d'induire des réponses cytogénétiques complètes et durables dans 10 à 30%, avec une survie atteignant plus de 10 ans chez les patients avec une réponse cytogénétique complète (Bonifazi et al., 2001). L'IFN prolonge la survie des patients comparativement à la chimiothérapie conventionnelle, avec une survie à 3 ans de 76% vs 53% (Kantarjian et al., 1985). L'interféron a été incorporé dans le traitement des cancers en raison de ses propriétés immuno-modulatrices et antiprolifératives. Led Verma et al. ont étudié l'influence de l'interféron sur les leucocytes humains. En présence d'interféron, un déclin dans la formation des colonies myéloïdes est observé, avec blocage de différenciation des précurseurs myéloïdes de la moelle osseuse et augmentation du pourcentage des progéniteurs granulocytaires immatures (Verma et al., 1979).

La première étude clinique utilisant l'IFN-alpha chez des patients atteints de LMC a démontré une rémission hématologique chez 5 des 7 patients étudiés, avec une dose plus élevée que celle utilisée dans d'autres types de cancers, soit 9 millions U/jour, suggérant un effet dose-réponse dans la LMC (Talpa et al., 1983). Par la suite d'autres études chez des

patients en phase chronique de la LMC utilisant les mêmes doses d'IFN, ont montré que 80% des patients atteignent une réponse hématologique, dont 70% avec une rémission hématologique complète (CHR) et disparition des signes cliniques (Talpaz et al., 1987). L'IFN-alpha est devenue la première thérapie liée non seulement à une réponse hématologique complète, mais aussi à une rémission cytogénétique durable associée à une meilleure survie. Cependant de nombreux effets secondaires de l'IFN ont été décrits, nécessitant l'interruption du traitement dans près de 20% des cas. Le mécanisme d'action de l'interféron demeure mal compris. Il possède surtout des propriétés antiprolifératives reliées à son effet sur le cycle cellulaire, principalement sur l'arrêt en G1 (Roos et al., 1984). Il a été démontré que l'arrêt du cycle cellulaire est associé à la surexpression des inhibiteurs des cdks (cyclin-dependent kinases) p15, p19, p21 et p27 induisant l'arrêt en G1 (Matsuoka et al., 1998; Sangfelt et al., 1999; Sangfelt et al., 1997). L'arrêt du cycle cellulaire est aussi associé à la diminution de l'expression du facteur de transcription MYC (Einat et al., 1985; Jonak and Knight, 1984; Sarkar et al., 2006) et à l'inhibition de la phosphorylation du suppresseur de tumeur RB1. La forme non phosphorylée de RB1 se lie à l'activateur transcriptionnel E2F, induisant ainsi un arrêt en G1 (Burke et al., 1992; Kumar and Atlas, 1992; Thomas et al., 1998). D'autres voies cellulaires sont activées suite au traitement à l'IFN type I incluant l'interféron α . En effet, une cascade de signalisation cellulaire est activée suite à l'hétérodimérisation des IFN type I avec les sous-unités des récepteurs transmembranaires IFNAR1 et IFNAR2, activant les kinases associées aux récepteurs Jak1 et Tyk2. Plusieurs protéines cellulaires sont phosphorylées suite à la liaison de l'IFN à ces récepteurs, dont Stat1, Stat2, Stat5, ISGF3 (Interferon stimulated gene factor 3), p38 MAPK, Akt, Crk, ainsi que les voies de signalisation en aval de PI3K, impliquant Akt et mTOR (Bekisz et al., 2010). Ces protéines affectées par l'IFN activent l'apoptose et donne un avantage antiprolifératif aux cellules traitées (Bekisz et al., 2010).

1.5.2. L'imatinib

Les travaux de Brian Druker, Nicholas Lydon et Charles Sawyers ont permis de transformer la LMC en une maladie chronique avec une survie de plusieurs années, sans nécessiter de traitement de chimiothérapie ou de greffe de cellules souches hématopoïétiques pour la majorité des patients atteints de cette maladie. Les trois lauréats du prix Lasker 2009 pour la recherche médicale clinique sont ainsi devenus les inventeurs

de la première thérapie ciblée antitumorale. En 1996, Druker a identifié une molécule capable d'inhiber la prolifération des cellules de LMC en ciblant l'oncogène BCR-ABL1. Découverte en collaboration avec Nicholas Lydon, la molécule a été nommée « imatinib ». Le STI571 (signal transduction inhibitor number 571), Imatinib ou Glivec® est un dérivé 2-phényl-amino-pyrimidine, de la famille des tyrphostines qui cible spécifiquement l'activité tyrosine kinase de l'oncoprotéine ABL1 et des récepteurs KIT et PDGFR « platelet-derived growth factor receptor ». Il agit par inhibition compétitive de l'ATP au niveau du site catalytique de la protéine kinase (Figure 6). Une analyse structurale a permis d'expliquer sa spécificité. Une étude du complexe ABL1-inhibiteur en cristallographie, a montré qu'il existait au sein du domaine catalytique d'ABL1, une poche constituée d'acides aminés, dont certains, relativement conservés, sont impliqués dans les interactions avec l'ATP, tandis que d'autres, moins conservés se lient à l'inhibiteur. La formation du complexe kinase-inhibiteur n'est possible que dans une conformation active avec phosphorylation d'un résidu tyrosine situé au sein d'une boucle d'activation (Schindler et al., 2000). Il en résulte un blocage des cascades des protéines kinases (MAP, JAK,... etc.) qui sont activées par l'oncoprotéine BCR-ABL1. Ainsi, le STI571 provoque la mort des cellules avec la translocation t(9;22). Cette molécule peut induire une rémission complète dans plus de 80% des patients (Druker et al., 2001; O'Brien et al., 2003). Le STI571 a été étudié dans une importante étude randomisée de phase III, l'étude IRIS « International Randomised Study of Interferon versus STI571 » dont l'objectif était de comparer le STI571 à une dose de 400 mg par jour avec le traitement standard (IFN- α et ara-C) chez 1106 patients en phase chronique de la LMC (Hughes et al., 2010; O'Brien et al., 2008; O'Brien et al., 2003). Selon l'étude IRIS, 98% des patients traités par le STI571 ont une réponse hématologique complète à 5 ans (tableau I). Un autre critère de réponse étudié était la réponse cytogénétique qui évalue le pourcentage de cellules avec la translocation t(9;22) dans 20 métaphases analysées au niveau de la moelle osseuse. La réponse cytogénétique complète correspond à l'absence du chromosome Philadelphie dans les 20 mitoses analysées (tableau I). Dans l'étude IRIS, comparativement aux patients traités avec l'IFN, les patients traités avec le STI571 avaient une réponse cytogénétique majeure (MCyR) (87% vs 35%) et une réponse cytogénétique complète (CCyR) (76% vs 15%) significativement plus importante. Après 60 mois, la survie sans événement ou EFS « event-free survival » des patients traités avec le STI571 était de 80% et la survie sans transformation ou TFS « transformation-free survival », de 93% (Druker et al., 2006). Le

suivi des patients de l'étude randomisée IRIS après 7 ans, continue de montrer des réponses cytogénétiques et hématologiques durables et a révélé un taux de CCyR à 82%, avec un EFS de 81%, un TFS de 93%, ainsi qu'une survie globale ou OS «overall survival» de 86% (Hughes et al., 2010).

Une diminution de 3 logs a été retenue pour définir la RMM (réponse moléculaire majeure) car les patients ayant atteint ce niveau dans les 18 premiers mois de traitement ont survécu sans progression de la LMC durant au moins 5 ans. Une RMM est donc définie comme étant la réduction des transcrits *BCR-ABL1* d'au moins 3 logs, déterminée à partir d'une valeur médiane établie (Druker et al., 2006).

Récemment un autre paramètre a été défini pour décrire la réponse moléculaire, le score International Scale (IS). Cette échelle a été suggérée par Hughes et coll. afin de standardiser la détection quantitative des transcrits *BCR-ABL1* dans les laboratoires cliniques (Hughes et al., 2006). Un score IS de 0.1% détermine une RMM (Branford et al., 2008; Hughes et al., 2006).

Tableau I. Définition des réponses hématologique, cytogénétique et moléculaire d'après Baccarani et al.

(Baccarani et al., 2009a):

Type de réponse	Définition
Réponse hématologique complète	Leucocytes < 10 000/mm ³ et absence de myélémie Basophiles < 5% Plaquettes < 450 000/mm ³ Rate non palpable et absence d'atteinte extra-médullaire
Réponse cytogénétique	Complète: métaphases Ph+ : 0% Partielle: métaphases Ph+ : 1-34% Mineure: métaphases Ph+ : 35- 65% Minimale: métaphases Ph+ : 66-95% Aucune: métaphases Ph+ > 95%
Réponse moléculaire	Majeure: BCR-ABL1/gène contrôle IS % ≤ 0.1% Complète: BCR-ABL1 indétectable (sensibilité ≥ 0.0001)

Des effets secondaires peuvent être observés lors d'un traitement à l'IM, les plus fréquents étant des nausées (65% des patients), des vomissements (49%), des diarrhées (37%), de l'œdème périorbitaire (60%), des crampes musculaires (32%), des arthralgies (12%) et une rétention liquidienne (11%). L'anémie, la thrombopénie, et la neutropénie sont aussi rapportées comme effets secondaires hématologiques (Druker et al., 2001).

1.5.3. Les inhibiteurs de tyrosine kinase de deuxième génération

1.5.3.1.1. Le nilotinib

Produit aussi par Novartis (Tasigna, AMN107; Novartis, Basel, Switzerland) le nilotinib, un analogue de l'IM inhibe également l'ATP de façon compétitive, mais il est approximativement 30 fois plus efficace que l'IM (concentration inhibitrice médiane ou IC50 <30 nM versus IC50 de 90 nM pour l'IM (Cowan-Jacob et al., 2007). Il inhibe également KIT (IC50 = 90 nM), PDGFR (IC50 = 72 nM) (Manley et al., 2005; Weisberg et al., 2005) et la kinase reliée à ABL1, ARG ainsi que le récepteur ephrin EPHB4 (Weisberg et al., 2005). L'analyse cristallographique du complexe nilotinib/Bcr-Abl1 démontre que cet inhibiteur est capable de se lier aux conformations actives et inactives de Bcr-Abl1 fournissant ainsi une explication au gain d'efficacité du nilotinib noté dans les cellules leucémiques résistantes à l'IM. Le nilotinib prolonge la survie des souris transplantées avec des lignées cellulaires hématopoïétiques ou des cellules primaires Bcr-Abl1 positives. Il prolonge aussi la survie des modèles de souris avec une LMC résistante à l'IM (Weisberg et al., 2005).

Plusieurs des mutations de BCR-ABL1 induisant une résistance à l'IM sont contournées par le nilotinib. En effet, 32 des 33 mutations de BCR-ABL1 qui induisent une résistance à l'IM sont inhibées *in vitro* à différentes concentrations par le nilotinib. La plupart des patients qui présentent des mutations dans le domaine kinase répondent au nilotinib alors qu'aucune réponse n'est observée chez les patients qui ont la mutation T315I (O'Hare et al., 2005a; Weisberg et al., 2006). L'efficacité du nilotinib a été confirmée dans l'étude de phase III ENESTn («Evaluating Nilotinib Efficacy and Safety in Clinical Trials–Newly Diagnosed Patients»), où le nilotinib était utilisé deux fois par jour à 300mg ou 400mg chez des patients en phase chronique de la LMC. Par la suite, une étude avec un suivi de 24 mois sur le traitement de patients avec LMC résistants à l'IM, traités avec le nilotinib,

montre que 124 des 321 patients (39%) ont continué le traitement au nilotinib, 59% des patients ont obtenu une CyR (réponse cytogénétique), dont 44% avaient une CCyR et 56% avaient une MCyR. Par ailleurs, 84% des patients avec CCyR maintenaient cette réponse à 24 mois avec une survie à 24 mois de 87%. Cette étude a démontré l'efficacité du nilotinib chez les patients résistants à l'IM en phase chronique de la LMC (Kantarjian et al., 2011).

1.5.3.1.2. Le dasatinib

Dasatinib (SPRYCEL®, BMS-354825; Bristol-Myers Squibb) est le premier inhibiteur de Src et Bcr-Abl1 approuvé par la FDA « Food and Drug Administration » pour le traitement de la LMC chez les patients résistants ou intolérants à l'IM dans la phase chronique de la LMC mais aussi dans les phases accélérée et blastique, et dans les LAL avec t(9;22). En plus d'inhiber ABL1, dasatinib inhibe les récepteurs KIT, PDGFR, ephrin EPHB4 ainsi que plusieurs membres de la famille des tyrosines kinases Src impliqués dans différentes voies de signalisation intracellulaire ayant un rôle dans la prolifération, la différenciation, la migration, la survie cellulaire, et l'angiogenèse. Cette famille inclut *SRC*, *FYN*, *YES1*, *HCK*, *LYN*, *FGR*, *LCK* et *BLK*. L'expression des 3 premiers membres est ubiquitaire, alors que l'expression des autres est restreinte au système hématopoïétique (Abram and Courtneidge, 2000). En plus d'agir sur la forme inactive d'ABL1, le dasatinib agit aussi sur sa forme active, qui est similaire à la conformation des protéines Src (Tokarski et al., 2006). Il a été démontré que le dasatinib bloque la transition G1/S et inhibe la croissance cellulaire normale et néoplasique (Fabarius et al., 2008). Comparativement à l'IM, le dasatinib a une plus grande affinité pour ABL1 avec une activité 325 fois plus forte. Son ancrage se fait au niveau du site de fixation de l'ATP, mais de façon opposée à celle de l'IM (Figure 5). Ceci expliquerait son efficacité dans les cas de LMC avec présence de mutations causant une résistance à l'IM car il ne se lie pas aux résidus mutés. Le dasatinib semble être avantageux dans la maladie résistante à l'IM avec une inhibition directe de 21 des 22 mutations BCR-ABL1 résistantes à l'IM (Burgess et al., 2005; O'Hare et al., 2005b; Shah et al., 2004). Une étude récente de phase III (DASISION), a comparé le dasatinib (100 mg une fois par jour) avec l'IM (400 mg par jour) pendant 12 mois chez 547 patients en phase chronique de la LMC. Avec un suivi de 12 mois, les réponses au dasatinib vs l'IM étaient de 83% pour la CCyR (vs 72%) et 46% pour la RMM (vs 28%). Le taux de

progression en phase blastique était de 1.9% pour le dasatinib et 3.5% pour l'IM (Kantarjian et al., 2010). Récemment, l'efficacité du dasatinib a été confirmée avec un suivi de 24 mois où 2.3% des patients traités au dasatinib progressent en phase accélérée et blastique comparativement à 5% des patients traités à l'IM (Kantarjian et al., 2012).

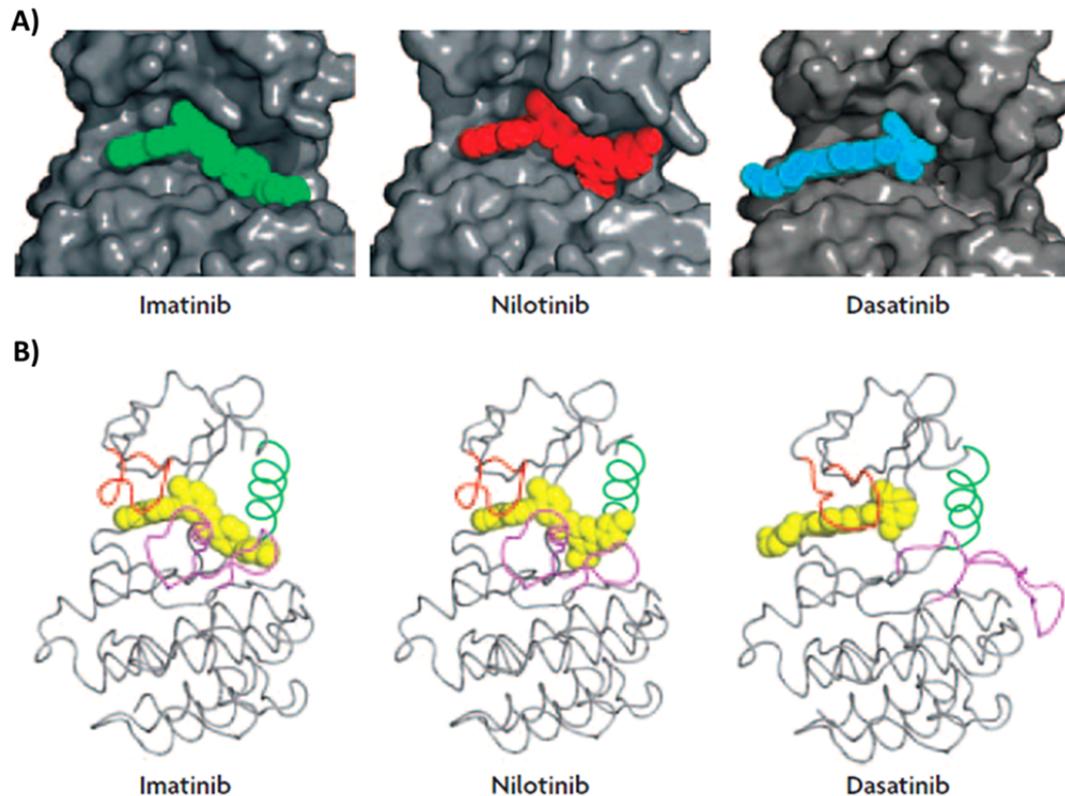


Figure 5. Structure d'ABL1 liée à l'imatinib, au nilotinib et au dasatinib.

A) Représentation des structures cristallographiques de la kinase ABL1 liée à l'imatinib (IM) (vert), au nilotinib (rouge) et au dasatinib (bleu) et comparaison des différents modes de liaison des trois inhibiteurs d'ABL1. **B)** La position de la P-loop (rouge) et de la A-loop (violette) varie selon la conformation de la kinase. Si la kinase est activée, la P-loop adopte une conformation étendue et l'extrémité N-terminale de la loop d'activation adopte une conformation active (dasatinib, à droite). Si la kinase est inactive, la P-loop est courbée sur l'inhibiteur (en jaune) alors que l'extrémité N-terminale de la loop d'activation adopte une conformation inactive (à gauche et au milieu). L'IM et le nilotinib bloquent la kinase dans une conformation inactive. L'hélice verte est l'hélice C, qui bouge selon l'état actif ou inactif des kinases (Weisberg et al., 2007). Figure reproduite de Nature Reviews Cancer, 7(5), Weisberg E et al., « Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukemia », 345-56, copyright 2007, avec permission de nature publishing group.

1.5.4. La résistance à l'imatinib et aux inhibiteurs de tyrosine kinase de deuxième génération

1.5.4.1. La résistance dépendante de la fusion BCR-ABL1

La réponse des patients atteints de LMC traités avec l'IM est variable. Certains patients ne répondent pas à l'IM et ce, dès le début du traitement. C'est ce que l'on appelle une résistance primaire. Selon l'étude IRIS, les patients avec une résistance primaire n'obtiennent pas de RHC en-dedans de 3 mois. Les patients qui n'ont pas de réponse cytogénétique partielle en-dedans de 12 mois ou de CCyR en-dedans de 18 mois ont aussi une résistance primaire à l'IM (Alvarado et al., 2009; Baccarani et al., 2006). D'autres patients perdent leur réponse initiale à l'IM et développent une résistance secondaire. Avec un suivi de 5 ans, 17% des patients traités avec l'IM ont rechuté après avoir eu une réponse initiale (Druker et al., 2006).

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer la résistance à l'IM et sont catégorisés en deux groupes : la résistance liée à la fusion BCR-ABL1 et la résistance indépendante de la fusion. Le premier groupe est le mieux caractérisé. Les lignées cellulaires générées à partir de cellules de patients résistants à l'IM, ainsi que les cellules murines Bcr-Ab11 positives ont été utilisées comme modèles expérimentaux pour étudier les mécanismes de résistance. Ces études ont ensuite été validées chez des patients avec LMC résistants à l'IM (Hochhaus, 2003). La fréquence des mutations au niveau de BCR-ABL1 varie de 40% à 90% dépendamment de la définition de la résistance, du type de résistance et de la phase de la LMC (Barnes et al., 2005; Corbin et al., 2003; Hochhaus and La Rosee, 2004; Hughes and Branford, 2006; Lowenberg, 2003; Shah et al., 2002). Une des stratégies pour contourner la résistance au traitement chez les patients en phase chronique de la LMC, consiste à intensifier le traitement et à augmenter la dose d'IM à 600 ou 800mg par jour. Cette dose est généralement tolérée, mais certains patients développent une toxicité qui peut être sévère nécessitant une diminution de la dose. En plus, malgré une réponse hématologique et cytogénétique obtenue en début de traitement, ces réponses ne semblent pas être durables dans certains cas (Baccarani et al., 2009b; Kantarjian et al., 2009; Kantarjian et al., 2003). Les mutations dans le DK peuvent induire des changements de conformation au niveau de Bcr-Ab11, ce qui peut affecter la capacité de l'IM à s'ancrer et à inhiber l'activité de Bcr-Ab11 (O'Hare et al., 2005a). Le séquençage moléculaire a révélé plus d'une centaine de mutations différentes dans les spécimens de patients avec LMC qui

ne répondent pas au traitement à l'IM (Branford, 2007; Ernst et al., 2009; Hughes et al., 2009). Certains patients peuvent avoir plus d'une mutation au niveau de la fusion, ce qui confère une résistance accrue (Quintas-Cardama et al., 2009; Shah et al., 2007).

Les études réalisées en cristallographie ont montré que des acides aminés bien définis, situés dans le domaine tyrosine kinase et sa poche de liaison à l'ATP, sont essentiels pour la fixation spécifique de l'IM. Le résidu Tyr 1294 de la fusion BCR-ABL1, (correspondant au résidu Tyr 242 de ABL1) localisé dans la boucle d'activation du domaine kinase, doit être déphosphorylé et la kinase doit être préférentiellement en configuration inactive pour pouvoir lier l'IM. Tout ce qui modifie ceci peut entraîner une diminution de la liaison de l'IM à BCR-ABL1 (Schindler et al., 2000). La première mutation qui a été décrite est une mutation d'un nucléotide qui entraîne la modification d'un acide aminé, la thréonine, situé au cœur de la liaison entre BCR-ABL1 et l'IM, pour une isoleucine au niveau du codon 315 de la protéine ABL1 (T315I) (Gorre and Sawyers, 2002). La thréonine en position 315 forme un pont hydrogène avec l'IM dans le site actif de ABL1, et une mutation de ce résidu conduit à la perte de cette liaison hydrogène. Cette mutation ne semble pas conférer un avantage prolifératif aux cellules lorsque comparé à des cellules Bcr-Abl1 positives sauvages non traitées à l'IM et n'induit pas une phosphorylation importante des substrats cibles. Par contre, le traitement à l'IM sélectionne clairement les cellules leucémiques exprimant cette forme mutante de Bcr-Abl1 *in vivo* et *in vitro* (Miething et al., 2006). L'effet de la mutation T315I reste liaison spécifique et représente une des causes majeures de résistance acquise à l'IM (Corbin et al., 2003; Gorre and Sawyers, 2002).

Plusieurs autres mutations ont ensuite été caractérisées par séquençage du gène *ABL1*, incluant des mutations au niveau des séquences codant pour la P-loop, l'hélice C, le domaine SH2, le site de liaison du substrat, la A-loop et dans le lobe NH₂-terminal (O'Hare et al., 2007; Roche-Lestienne et al., 2002; Shah et al., 2002). Toutefois, la majorité des études publiées concernent des mutations localisées dans le domaine kinase de BCR-ABL1. Tel que démontré dans la figure 6, les mutations au niveau de BCR-ABL1 qui confèrent plus de résistance, sont localisées dans le domaine de liaison à l'ATP et au niveau de la P-loop (résidus 244 à 255) du domaine de la kinase. Les tyrosines kinases (TK) mutées dans cette région sont dix fois moins sensibles aux tests d'inhibition de la prolifération *in vitro* en présence d'IM, et modifient la conformation inactive d'ABL1 en une conformation active inadaptée à la fixation de l'IM (Branford et al., 2003; Roumiantsev et al., 2002). D'autres régions d'ABL1 sont affectées par les mutations,

incluant l'activation de la A-loop (résidus 381-402). La conformation de cette structure flexible qui régule l'activité de la TK, dépend de l'état de phosphorylation du résidu tyrosine 393. Lorsque celui-ci est phosphorylé, la conformation ouverte de la A-loop permet une grande accessibilité du site catalytique aux molécules d'ATP. Les mutations dans cette région affectent la conformation de la A-loop en stabilisant sa conformation active, inadaptée à la liaison de l'IM. En général, les mutations dans la A-loop sont associées à une faible résistance à l'IM *in vitro*, suggérant un bénéfice probable d'une augmentation de dose de l'IM chez les patients porteurs de mutations dans cette région. Une série de mutations est détectée plus fréquemment dans la phase avancée de la LMC (mutations Gln253, Tyr253, Glu255, Thr315, Glu459 et Phe486) (Apperley, 2007). Les mutations qui touchent les résidus Tyr253, Glu255, Thr315, Met351, et Phe359 représentent 60%-70% de toutes les mutations décrites (Weisberg et al., 2007).

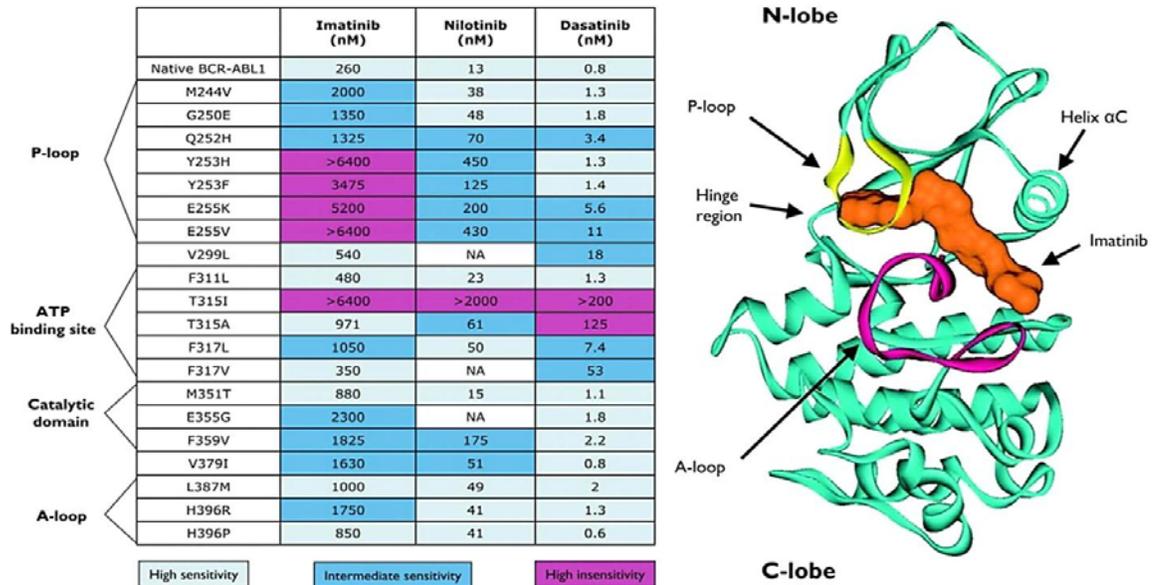


Figure 6. Activité de l'imatinib et des inhibiteurs de tyrosine kinase de deuxième génération, le nilotinib et le dasatinib, sur BCR-ABL1 sauvage et sur différents mutants BCR-ABL1 chez des patients porteurs de LMC et représentation du complexe Imatinib-ABL1.

Dans le tableau, les concentrations (valeurs de la concentration inhibitrice médiane ou IC50) des inhibiteurs de tyrosine kinase sont représentées en nanomoles par millilitre. Les concentrations les plus élevées sont notées en violet suivies par les concentrations notées en bleu foncé et ensuite en bleu pâle. La représentation tridimensionnelle de la structure du domaine kinase d'ABL1 (turquoise) liée à l'imatinib (orange) est illustrée à droite. Le site de liaison à l'ATP est localisé entre la boucle d'activation (A-loop, violet) et la boucle de liaison au phosphate (P-loop, jaune). La A-loop contrôle l'activité catalytique d'ABL1 en

changeant entre différents états dépendamment de la phosphorylation. L'imatinib insère son groupement pyridinyl sous l'hélice α C dans le lobe NH₂-terminal de la kinase ABL1, gardant la kinase dans sa conformation inactive car l'ATP ne peut plus se fixer (Quintas-Cardama and Cortes, 2009).

Figure reproduite de Blood, 113(8), Quintas-Cardama A, et Cortes J. « Molecular biology of *bcr-abl1*-positive chronic myeloid leukemia », p.1619-1630, copyright 2009, avec permission de Copyright Clearance Center.

Un autre mécanisme de résistance à l'IM est l'amplification de la fusion *BCR-ABL1* soit au niveau génomique ou au niveau des transcrits. Plusieurs chercheurs ont généré des clones résistants à l'IM suite à plusieurs passages des cellules dans des milieux de culture qui contiennent de l'IM. Ils ont démontré une activité élevée de la kinase ABL1 reliée à l'amplification génétique des séquences *BCR-ABL1* (le Coutre et al., 2000; Mahon et al., 2000; Weisberg and Griffin, 2000). Cependant tous ces clones sont produits *in vitro* et peuvent ne pas être représentatifs des mécanismes de résistance *in vivo*. L'étude de l'équipe de Gorre (Gorre et al., 2001) a démontré une résistance à l'IM dans des spécimens de patients avec duplication génique de *BCR-ABL1*. Plusieurs cas ont ensuite été décrits mais sans preuve formelle que l'amplification *BCR-ABL1* est la cause primaire de la résistance au traitement (Bixby and Talpaz, 2011; Campbell et al., 2002; Morel et al., 2003).

1.5.4.2. La résistance indépendante de la fusion BCR-ABL1

1.5.4.2.1. La pompe d'efflux ABCB1

Comme dans d'autres modèles en oncogénèse, une augmentation de l'expression du transporteur ABCB1 « ATP binding cassette, sub-family B member 1 », aussi connu sous le terme Pgp « P-glycoprotein 1 » ou MDR1 « multidrug resistance protein 1 » qui détermine la synthèse de la pompe d'efflux Pgp, a été décrite initialement dans la lignée cellulaire LAMA84R résistante à l'IM (Mahon et al., 2003).

Le rôle d'ABCB1 *in vitro* et *in vivo* dans la résistance à l'IM est un sujet controversé. Il a été relativement bien établi que l'IM est un substrat de la pompe d'efflux Pgp (Hegedus et al., 2002). En utilisant des lignées cellulaires résistantes à l'IM, Mahon et al. (Mahon et al., 2000) ont démontré une augmentation de l'expression de Pgp. Dans une de ces lignées,

Bcr-Abl1 était amplifié et il n'a pas été déterminé si la résistance à l'IM était reliée à une amplification de *Abl1* ou à une expression augmentée de *Pgp*. En utilisant deux inhibiteurs de *Pgp* différents, Che et Kotaki (Che et al., 2002; Kotaki et al., 2003) ont pu restaurer la susceptibilité à l'IM durant la phase blastique de la LMC. L'inhibition de *ABCB1* par ARN interférence rétablissait une réponse à l'IM dans les lignées cellulaires, associée à une augmentation dans la concentration intracellulaire de l'IM (Rumpold et al., 2005; Widmer et al., 2007). Récemment, Dulucq et collègues ont étudié des polymorphismes dans le gène *ABCB1* et ont décrit trois nucléotides polymorphiques, suggérant que différentes séquences pourraient altérer l'efficacité de la pompe d'efflux entraînant des réponses thérapeutiques différentes (Dulucq et al., 2008). Cependant, il n'y a pas de corrélation bien documentée entre différents polymorphismes de *ABCB1* et les niveaux intracellulaires de l'IM. Par ailleurs, des études suggèrent un rôle du nilotinib, soit comme substrat, ou comme inhibiteur des protéines d'efflux (Davies et al., 2009; Hiwase et al., 2010; Mahon et al., 2008).

1.5.4.2.2. La résistance indépendante de la fusion BCR-ABL1 : le transporteur hOCT1

Récemment, le transporteur hOCT1 ou OCT1 « organic cation transporter, member 1 » codée par le gène *SLC22A1* « solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 1 », a été évalué comme cause potentielle de résistance à l'IM. Il a été démontré que l'IM mais pas le nilotinib, est importé dans les cellules de patients atteints de LMC via hOCT1 (White et al., 2006). En utilisant différents inhibiteurs ciblant hOCT1 dans plusieurs lignées cellulaires, l'absorption de l'IM via ce transporteur est réduite. Toutefois aucune corrélation n'a été clairement établie entre la réduction des niveaux de la drogue et la diminution d'efficacité de l'IM. En comparant les niveaux d'expression de hOCT1 chez des patients en phase chronique et des patients en phase blastique de la LMC, une différence statistiquement significative a été rapportée pour la CCyR à 6 mois ainsi que pour la survie globale et la PFS (Progression-free survival) contrairement aux autres transporteurs tels que *ABCB1*, *ABCG2* et *ABCC1* qui ne corrélaient pas avec ces paramètres. Les patients ayant une faible expression de hOCT1 déterminée par RT-PCR quantitative ont une réduction dans les taux de RMM à 12 mois quand l'IM est donnée à une dose standard (Bixby and Talpaz, 2011; White et al., 2008).

1.5.4.2.3. La dérégulation des voies de signalisation alternatives indépendantes de la fusion BCR-ABL1

De nombreuses cascades de signalisation en amont et en aval de BCR-ABL1 sont dérégulées avant l'aboutissement en une phase blastique résistante. Le rôle de chacune de ces voies et les interactions entre elles sont complexes et il devient alors difficile d'établir si la résistance à la maladie est dépendante ou indépendante de la fusion *BCR-ABL1*.

La cellule souche qui initie la LMC ainsi que les cellules de LMC en phase blastique sont résistantes aux traitements avec les inhibiteurs de tyrosine kinase. Étant donné l'importance des notions de cellule souche hématopoïétique (CSH), de cellule souche leucémique (CSL) et des voies qui y sont associées dans la pathogénèse et la thérapie de la LMC, ainsi que l'identification dans nos travaux de plusieurs gènes liés à ces voies, nous discuterons de ces notions dans les sections suivantes.

Chapitre 2: La cellule souche et la leucémie myéloïde chronique

2.1. La cellule souche hématopoïétique normale et leucémique

2.1.1. La cellule souche hématopoïétique normale

Toutes les lignées hématopoïétiques peuvent être reconstituées à partir d'une seule cellule dérivée de la moelle osseuse, appelée cellule souche. Le système hématopoïétique est le premier système pour lequel les cellules souches ont été identifiées (Till and Mc, 1961). L'expérience qui a mis en évidence l'appartenance des cellules différenciées à une cellule hématopoïétique primitive a été réalisée dans le laboratoire de Till et McCulloch (Becker et al., 1963). Ces chercheurs ont démontré que suite à une irradiation des souris à une dose pouvant entraîner une aplasie médullaire létale, l'injection de cellules de la moelle osseuse de souris immunologiquement compatibles, est capable de reconstituer les différentes lignées hématopoïétiques. Ils ont aussi démontré, grâce à l'induction d'anomalies cytogénétiques par irradiation dans les cellules injectées, qu'un nodule splénique originait d'une même cellule. En effet, toutes les cellules en mitose, incluant les cellules érythroïdes, myéloïdes matures, lymphocytaires B et mégacaryocytaires d'un même nodule, possédaient une anomalie cytogénétique identique. Le modèle humain équivalent où l'on retrouve une même anomalie chromosomique dans toutes les lignées hématopoïétiques et où l'anomalie est aussi présente dans la cellule souche est la LMC avec la translocation chromosomique t(9;22).

Le test CFU « Colony Forming Unit » évalue une population primitive qui comprend les cellules souches ainsi que des populations cellulaires plus matures associées à une reconstitution *in vivo* à court terme chez la souris (Purton and Scadden, 2007). Les tests de reconstitution à long terme présentent une meilleure information qualitative et semi-quantitative sur les CSHs. Ils sont utilisés pour mesurer la capacité des cellules hématopoïétiques à reconstituer l'hématopoïèse des souris rendues aplasiques par

irradiation (Domen and Weissman, 1999; Morrison et al., 1995). L'essai de reconstitution fonctionnel qui définit le mieux la CSH est le CRU ou « competitive repopulating unit ». Ce test de repopulation compétitive mesure la capacité d'une source inconnue de cellules souches (cellules testées) à repeupler le système hématopoïétique suite à une transplantation chez des souris irradiées, comparé à une source connue de cellules souches marquées. L'essai CRU donne une meilleure évaluation de la population de CSH en utilisant différentes dilutions de cellules transplantées chez des souris receveuses irradiées, avec un nombre fixe de cellules appelées « helper » de la même souche que la souris receveuse. La mesure du nombre de souris receveuses ayant une reconstitution myéloïde et lymphoïde adéquate, dépend du nombre initial de cellules souches dans les populations cellulaires transplantées (Purton and Scadden, 2007). Une méthode statistique basée sur la distribution de Poisson est ensuite appliquée pour calculer la fréquence de cellules souches en CRU, des cellules testées (Purton and Scadden, 2007). Ces études ont permis de distinguer deux principaux sous-types de CSH : les LT-HSCs « Long Term Hematopoietic Stem Cells » et les ST-HSCs « Short Term Hematopoietic Stem Cells ». Les LT-HSCs ont la capacité de reconstituer l'hématopoïèse plus de 16 semaines, tandis que les ST-HSCs ont cette capacité pour 3 à 6 semaines seulement (Morrison et al., 1995). La population multipotente est ainsi constituée de LT-HSCs capables de donner naissance aux ST-HSCs donnant eux-mêmes naissance aux progéniteurs multipotents qui ne possèdent plus de capacité d'auto-renouvellement (Morrison et al., 1997). Récemment une sous-population de CSHs, appelée intermediate-term HSCs (IT-HSCs) a été identifiée dans la fraction LT-HSCs sur la base d'une expression différente du marqueur CD49b (Benveniste et al., 2010; Schroeder, 2010). Il a été déterminé, à l'aide d'études utilisant le 5-fluorouracil (5-FU), que les cellules les plus primitives (LT-HSCs) sont largement quiescentes (ou dormantes), alors que les cellules impliquées dans la reconstitution à plus court terme (ST-HSCs) sont actives dans le cycle cellulaire et sont dépendantes des cyclines (Hodgson et al., 1982; Lerner and Harrison, 1990). Une deuxième injection de 5-FU va éliminer toutes les LT-HSCs (Harrison and Lerner, 1991), indiquant que le pool des CSHs entre dans le cycle cellulaire après l'épuisement des progéniteurs qui sont en cycle cellulaire suite à la première injection de 5-FU (Randall and Weissman, 1997). Malgré une certaine controverse sur ce sujet dans la littérature, une étude récente effectuée chez la souris en utilisant des techniques d'immunophénotypage combinées à un essai avec le BrdU « Bromodeoxyuridine », a démontré que les CSHs (lineage-negative : Lin⁻ Sca1⁺, cKit⁺;

LSK) peuvent être séparées en CSHs actives et en CSH dormantes (CSHd), les CSHd étant capables d'être recrutées dans un état actif quand elles subissent un stress (Wilson et al., 2008).

2.1.2. La cellule souche leucémique

Deux études initiales ont contribué à appuyer l'hypothèse de l'existence d'une cellule souche à l'origine du cancer (CSC), et plus spécifiquement de la CSL et de la cellule initiatrice de leucémie (CIL). Dans la première étude, Lapidot et al. ont identifié une sous-population de cellules leucémiques myéloïdes primaires CD34+/CD38- ayant le potentiel de produire un grand nombre de progéniteurs formant des colonies lorsque transplantées chez les souris SCIDs « severe combined immunodeficiency » (Lapidot et al., 1994). Ces expériences ont confirmé que seulement une fraction des cellules malignes est capable de générer une nouvelle leucémie après transplantation. Une deuxième étude effectuée par Bonnet et Dick (Bonnet and Dick, 1997), a démontré que les cellules humaines de LAM transplantées chez la souris SCID, possédaient deux caractéristiques importantes soit la différenciation et la prolifération, avec un potentiel d'autorenouvellement des cellules souches. Ces travaux ont décrit le modèle hiérarchique pour expliquer la prolifération tumorale. Contrairement au modèle stochastique qui appuie l'existence d'une seule cellule d'origine qui va subir des modifications, la sélectionnant et la transformant en cellule leucémique, le modèle hiérarchique propose qu'une tumeur est constituée de cellules hétérogènes et que seulement les cellules initiatrices de cancer (CICs) ou CSCs ont la capacité de s'autorenouveler (Visvader and Lindeman, 2008).

À cause des similitudes phénotypiques entre les CSHs normales et les CSLs, il a été postulé que la CSL provienne de la CSH (Sato and Ogata, 2006). En raison de ses propriétés d'autorenouvellement lui conférant une plus grande viabilité, la CSH est une cible idéale pour l'acquisition de mutations la transformant en cellule leucémique. Cependant, des expériences subséquentes ont démontré que les CSLs de LAM, contrairement aux CSHs, n'expriment pas le marqueur CD90 (Thy1) (Blair et al., 1997). Deux hypothèses découlent de cette observation : les CSLs pourraient originer des CSHs

mais perdent l'expression du CD90 durant la transformation, ou originer de cellules plus différenciées tel que les progéniteurs communs.

D'une façon intéressante, dans les cellules Lin-CD34+CD38-CD90- représentant la fraction de CSLs, la fusion *RUNXI-RUNXITI* était présente chez des patients ayant développé une LAM suite au bombardement de Hiroshima. Cependant, dans la MO des patients sans la maladie, la fusion était aussi présente dans les CSHs Lin-CD34+CD38-CD90+ ayant une différenciation hématopoïétique normale *in vitro*. Ceci suggère que la fusion *RUNXI-RUNXITI* serait présente dans une cellule préleucémique avec un phénotype de CSH et qu'elle est nécessaire mais non suffisante pour induire une leucémie (Miyamoto et al., 2000). En effet, l'induction d'une leucémie par la fusion *RUNXI-RUNXITI* nécessite un évènement mutationnel additionnel et ceci a aussi été documenté dans un modèle murin transgénique (Yuan et al., 2001).

Plusieurs protéines de fusion ont été étudiées afin de répondre à la question de l'origine de la CSL (CSH vs progéniteurs communs). Les fusions MLL-MLLT1/ENL et MLL-GAS7, générées par les translocations chromosomiques t(11;19)(q23;p13.3) et t(11;17)(q23;p13) respectivement, peuvent transformer les CSHs ainsi que les progéniteurs myéloïdes dépourvus de la capacité d'autorenouvellement (Cozzio et al., 2003; So et al., 2003). Lorsqu'introduite dans les progéniteurs communs, une autre fusion, MLL-MLLT3/AF9 associée à la t(9;11)(p22;q23), transforme ces progéniteurs en CSLs avec réactivation du programme d'autorenouvellement (Krivtsov et al., 2006). En comparant l'effet des fusions BCR-ABL1 et MOZ-TIF2 au niveau des progéniteurs, Huntly et al. ont démontré que seule la fusion MOZ-TIF2 avait la capacité de réactiver le programme d'autorenouvellement associé à la transformation des progéniteurs en CSLs (Huntly et al., 2004).

Ces études suggèrent qu'il y a possiblement au moins deux types d'évènements pouvant induire une leucémie. Le premier évènement est que la CSH normale acquiert des mutations qui vont altérer les mécanismes impliqués dans le contrôle de la croissance cellulaire et la résistance à l'apoptose et vont interférer avec la capacité de différenciation des progéniteurs. Le deuxième est que les progéniteurs partiellement différenciés vont réacquérir les propriétés d'autorenouvellement des CSHs, ce qui interfère avec leur capacité à se différencier.

2.2. La cellule souche impliquée dans la leucémie myéloïde chronique

Avant l'ère de l'IM, la greffe de cellules souches hématopoïétiques était le traitement optimal pour les patients atteints de LMC éligibles à la greffe. Chez ces patients greffés, la majorité ont une longue survie. Toutefois, certains patients rechutent, ce qui suggère la persistance d'une CSL qui n'a pas été éliminée par ce traitement. Par ailleurs, la plupart des patients traités avec l'IM auront une CCyR mais les transcrits *BCR-ABL1* seront encore détectés par RT-PCR, le traitement à l'IM induisant une réponse moléculaire complète chez une minorité de patients. Dans le cas où les transcrits *BCR-ABL1* ne sont plus détectés par RT-PCR, l'arrêt subséquent de l'IM entraîne à nouveau la détection des transcrits chez ces patients, indiquant la persistance de cellules leucémiques (Merante et al., 2005; Rousselot et al., 2007). Il a été démontré par *Bhatia et al.* (Bhatia et al., 2003) que des progéniteurs hématopoïétiques *BCR-ABL1* positifs résiduels sont présents chez les patients avec CCyR traités à l'IM. Dans cette étude, les cellules CD34⁺ ont été sélectionnées à partir des cellules mononuclées (CMNs) de la moelle osseuse et analysées par FISH pour la détection de la fusion génique *BCR-ABL1*. Les cellules CD34⁺ ont aussi été mises en culture pour effectuer les tests de CFC « colony-forming cell » et LTC-IC « long-term bone marrow culture-initiating cell » pour évaluer les progéniteurs communs et les cellules souches. Les colonies formées dans les deux cas ont démontré la présence de la fusion *BCR/ABL1* détectée par technique FISH, chez tous les patients. La RT-PCR quantitative a démontré un taux plus élevé d'ARNm *BCR-ABL1* dans les cellules CD34⁺ comparé aux CMNs. De plus, l'évaluation des échantillons à différents temps a démontré la persistance des progéniteurs *BCR-ABL1* positifs malgré un traitement continu à l'IM. Ceci suggère que l'IM n'élimine pas les progéniteurs primitifs anormaux chez les patients atteints de LMC. La maladie résiduelle semble être présente particulièrement au niveau de la cellule souche et persiste au-delà de 5 ans malgré des réponses cytogénétiques complètes. L'étude des cellules CD34⁺ de patients avec LMC en CCyR traités à l'IM a révélé la présence de mutations au niveau de la kinase ABL1 (Chu et al., 2005). Il semble que l'effet de l'IM est dépendant du cycle cellulaire et que les cellules souches quiescentes sont résistantes à ce traitement (Graham et al., 2002). Jiang et al. ont comparé la toxicité de l'IM dans les compartiments CD38⁻ et CD38⁺ des cellules lin-CD34⁺ de LMC en phase chronique. Ils ont démontré que la portion la plus primitive lin-CD34⁺CD38⁻ était caractérisée par une expression élevée de *BCR-ABL1*, ainsi que de *IL-3* et *G-CSF*, avec une expression

diminuée d'*OCT1* et une expression élevée d'*ABCG2* (Jiang et al., 2007). Cette combinaison d'altérations pourrait refléter une plus grande résistance de ces cellules primitives à l'IM.

2.3. Les voies moléculaires cruciales impliquées dans la résistance de la cellule souche de la leucémie myéloïde chronique

À ce jour, la majorité des études ont été orientées sur l'étude des propriétés spécifiques des CSLs dans la LMC. Bien que cette approche a contribué à une meilleure compréhension de la nature de ces cellules, elle n'a pas fourni de preuves sur le rôle causal de ces propriétés dans la résistance aux traitements (Chu et al., 2005; Graham et al., 2002; Holyoake et al., 1999; Jiang et al., 2007; Konopleva and Andreeff, 2007; Sorel et al., 2004). Les mécanismes de résistance de la cellule souche de la LMC (CS-LMC) aux traitements demeurent inconnus. Des facteurs comme la quiescence, le taux élevé de l'expression de *BCR-ABL1*, l'acquisition de mutations au niveau des oncogènes, la surexpression des protéines qui sont des transporteurs dans ces cellules, peuvent expliquer cette résistance.

2.3.1. La quiescence et la migration de la cellule souche de la leucémie myéloïde chronique

La CS-LMC étant une cellule souche, elle doit survivre et se protéger du stress extérieur, et pour se faire, elle réside dans un microenvironnement protecteur ou « niche ». Les CS cultivées à partir de la moelle osseuse ou du sang peuvent ne représenter qu'une fraction de toute la population de cellules souches. Selon certaines études, cibler la niche pourrait aussi être une des stratégies adoptées pour éradiquer la CS-LMC (Raaijmakers and Scadden, 2008). En effet, des évidences démontrent que l'utilisation des ITKs augmente la migration des CS primitives vers les niches (Jin et al., 2008). Jin L et al. (Jin et al., 2008) ont démontré dans les lignées cellulaires KBM5 et K562, que les ITKs (IM ou INNO-406), augmentent l'expression du récepteur membranaire CXCR4 ainsi que la migration. Cette augmentation dans l'expression de CXCR4 est aussi observée chez les patients avec LMC traités à l'IM ou l'IFN. De plus, l'IM induit un arrêt des cellules de LMC en phase G0-G1 au niveau du cycle cellulaire. En présence de cellules souches mésenchymateuses présentes dans un système de co-culture, les cellules de LMC peuvent être protégées de la mort

induite par l'IM (Jin et al., 2008). En ciblant le CXCR4 avec des antagonistes tel que AMD3465, l'effet anti-apoptotique est aboli. Ceci suggère que l'augmentation de l'expression de CXCR4 par l'IM stimule la migration des cellules de LMCs vers le stroma médullaire, et cause un arrêt en phase G0-G1 du cycle cellulaire, assurant ainsi la survie et la quiescence des cellules leucémiques (Jin et al., 2008).

2.3.2. Les principales voies d'autorenouvellement de la cellule souche de la leucémie myéloïde chronique

L'autorenouvellement est une propriété normalement attribuée à la CSH. Des études ont démontré que dans la leucémie myéloïde chronique en phase blasique (LMC-PB), les progéniteurs engagés vont acquérir cette propriété des cellules souches. Des mécanismes dépendants (Coluccia et al., 2007; Jamieson et al., 2004) et indépendants (Corbin et al., 2011) de BCR-ABL1 contribuent à l'acquisition de l'autorenouvellement par les GMPs de la LMC-PB (CD34+CD38+CD45RA+CD123+Lin-). Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans l'autorenouvellement, et de nombreux gènes essentiels pour le maintien du pool de CSHs ont été identifiés. Ces mêmes voies/gènes peuvent être activés au niveau des CSLs incluant la CSL de la LMC-PB.

2.3.2.1. La voie de signalisation Wnt/ β -catenin

La voie Wnt/ β -catenin (Figure 7, axe orange) est une des voies les plus citées pour l'autorenouvellement de la cellule souche. Durant l'embryogenèse, les protéines Wnt sont impliquées directement dans la détermination du destin cellulaire à divers stades de développement de plusieurs organes ou systèmes, incluant le système cardiovasculaire, le système nerveux central, les reins et les poumons (Grigoryan et al., 2008). Au total, 19 différentes protéines Wnt ont été identifiées dans le génome humain et de souris (Staal and Luis, 2010) et leur mode d'expression peut se chevaucher temporellement au cours du développement, soulevant la possibilité de redondance fonctionnelle entre les protéines Wnt (Nusse and Varmus, 1992). Au moins trois différentes voies de signalisation Wnt sont actuellement reconnues: la voie canonique Wnt médiée par les facteurs Catenin beta-1 (CTNNB1) et TCF/LEF, la voie PCP « planar cell polarity », et la voie Wnt-Ca²⁺ (Staal et

al., 2008). Plusieurs études démontrent que la signalisation Wnt canonique est essentielle pour la prolifération des thymocytes, le développement des cellules T ainsi que pour la biologie de la CSH (Malhotra and Kincade, 2009; Staal and Clevers, 2003, 2005). La majorité des études en hématopoïèse et en cancer se limitent à l'étude de la voie de signalisation Wnt/Catenin beta-1 qui a été démontrée importante pour le développement des CSHs (Reya et al., 2003).

En absence de Wnt, CTNNB1 est inclus dans un complexe protéique comprenant l'Axine, l'APC et la kinase GSK-3 β « glycogen synthase kinase-3 beta ». Suite à sa phosphorylation, la CTNNB1 est dégradée par le protéasome, empêchant ainsi sa translocation dans le noyau. Par contre, en présence des protéines Wnt qui se lient à leur récepteur Frizzled (Fz), il n'y a pas de dégradation du médiateur Wnt/Catenin beta-1, et ceci grâce à la dissociation de la Catenin beta-1 du complexe APC/Axine/GSK-3 β . La Catenin beta-1 n'est donc pas phosphorylée et peut migrer dans le noyau où elle se lie aux facteurs de transcription TCF « T-cell factor » et LEF « lymphoid enhancer factor » et initie la transcription de plusieurs gènes incluant *MYC* et *CCND1* (Figure 7). La Catenin beta-1 peut aussi être liée à la cadhérine et contrôler l'adhérence intercellulaire (Adesina et al., 2009; Staal and Luis, 2010).

Dans un modèle expérimental de LMC chez la souris, la perte de la Catenin beta-1 retarde le développement de la LMC et il y a diminution de la croissance à long terme et du maintien des CSHs après la transplantation (Zhao et al., 2007). Les résultats de cette étude suggèrent que *Ctnnb1* requiert préférentiellement une cellule souche pour induire une leucémie dépendante de BCR-ABL1 (Zhao et al., 2007).

Chez les patients en phase blastique de la LMC, Jamieson et al. ont rapporté que la protéine Catenin beta-1 est activée au niveau des progéniteurs myéloïdes et est transloquée dans le noyau suite à cette activation (Jamieson et al., 2004). Ceci pourrait s'expliquer du moins en partie, par le fait que ces progéniteurs myéloïdes leucémiques acquièrent des propriétés de cellules souches, dont l'autorenouvellement impliquant *CTNNB1*. Dans la LMC-PB, un défaut au niveau de l'épissage de la *GSK-3 β* a aussi été associé à l'activation de *CTNNB1* (Abrahamsson et al., 2009).

D'une façon intéressante dans les translocations chromosomiques t(8;21) et t(15;17) générant respectivement les fusions *RUNX1-RUNX1T1* et *PML-RARA*, il y a activation de la voie Wnt et augmentation de l'expression de la *CTNNB1* et de la *CTNNA3* induisant l'expression des gènes cibles de *TCF* et *LEF*, tels que *MYC* et *CCND1* (Muller-Tidow et

al., 2004). L'activation de *JUP* (gamma-catenin, Plakoglobin) dans ces translocations induit aussi une augmentation de la prolifération et de la croissance cellulaire. Plusieurs molécules chimiques sont présentement en évaluation en raison de leur potentiel d'inhibition de la voie de signalisation Wnt (Takebe et al., 2011).

Des évidences suggèrent aussi que *CTNNB1* est impliquée dans la prolifération des cellules de LMA, ainsi que dans l'adhésion et la progression du cycle cellulaire et que la progression des leucémies est dépendante d'une voie Wnt fonctionnelle (Siapati et al., 2011).

Récemment, l'inactivation génétique et pharmacologique de *Ctnnb1* associée à l'IM s'est avérée un succès pour éradiquer la CS-LMC dans un modèle murin. En effet, Heidel et al., ont démontré que l'inactivation de *Ctnnb1* après transplantation des CSLs BCR-ABL1 positives dans un modèle murin, réduit la fréquence des CSLs en affectant l'autorenouvellement. En utilisant des inhibiteurs de COX-2, les auteurs ont aussi démontré une inhibition pharmacologique de *Ctnnb1*. De plus, lorsque combinés avec l'IM une réduction significative des cellules LSK+ était notée comparativement à l'IM utilisé en agent seul. Cette étude souligne la nécessité de combiner les stratégies afin d'optimiser la thérapie de cette maladie (Heidel et al., 2012).

2.3.2.2. La voie de signalisation Hedgehog (Hh)

La voie Hedgehog (Figure 7, axe bleu) est une autre voie d'auto-renouvellement de la cellule souche qui est impliquée dans plusieurs cancers, incluant la LMC (Taipale and Beachy, 2001). Cette voie est très importante particulièrement au niveau de l'embryogenèse. La voie Hh est impliquée dans la réponse au stress et la régénération hématopoïétique (Beachy et al., 2004; Ingham and Placzek, 2006; te Welscher et al., 2002; Trowbridge et al., 2006). Trois isoformes du ligand HH ont été décrites à ce jour, soit Sonic (SHH) qui joue un rôle dans le développement tissulaire embryonnaire, Indian (IHH) qui a un rôle dans le développement hématopoïétique précoce et Desert (DHH) qui est exprimée dans les testicules et le tissu nerveux (Irvine and Copland, 2012). Le récepteur transmembranaire PTCH1 (patched) de ces ligands peut aussi inhiber cette voie et cela en leur absence. L'inhibition du récepteur PTCH1 se fait grâce à sa liaison à la protéine SMO (smoothened) bloquant la voie de signalisation Hh. En présence du ligand

HH, PTCH1 libère SMO qui va activer les facteurs de transcription GLI1, GLI2 et GLI3 ainsi que les gènes en aval, qui sont des régulateurs de la prolifération cellulaire (Irvine and Copland, 2012). Dans la LMC, la voie Hh est activée dans les progéniteurs et les cellules souches et devient plus active avec la progression de la maladie (Dierks et al., 2008; Radich et al., 2006; Zhao et al., 2009). Deux groupes ont étudié l'implication de la voie Hh dans la LMC (Dierks et al., 2008; Zhao et al., 2009) en délétant Smo et en exprimant la fusion Bcr-Abl1 dans un modèle murin. L'absence de Smo réduit le nombre des CSLs ainsi que la propagation de la leucémie. Une réduction de la population de CSLs et un prolongement de la survie sont aussi obtenus suite à un traitement inhibant la voie Hh, la cyclopamine. (Irvine and Copland, 2012).

2.3.2.3. La voie de signalisation Notch

La voie Notch (Figure 7, axe vert) est aussi impliquée dans l'autorenouvellement de la cellule souche. Les protéines Notch sont des récepteurs de surface cellulaire très conservés, qui régulent plusieurs processus cellulaires incluant la détermination du destin de la cellule, la différenciation, la prolifération et la mort cellulaire (Yin et al., 2010). La voie Notch est normalement activée dans les CSHs (Duncan et al., 2005). L'expression constitutive de Notch1 conduit à l'immortalisation des progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes *in vivo* et *in vitro* (Varnum-Finney et al., 2000). *In vitro*, l'inhibition de la voie de signalisation Notch conduit à une différenciation accélérée plutôt qu'à l'autorenouvellement, ce qui explique probablement l'épuisement des CSHs observé *in vivo* (Duncan et al., 2005). Il existe un lien entre les voies Wnt et Notch et il a été démontré que pour que les protéines Wnt affectent l'autorenouvellement de la CSH, la voie Notch doit être intacte (Duncan et al., 2005). Des mutations du gène *NOTCH1* ont été décrites dans plusieurs types de cancers, dont le cancer du sein et les leucémies. Des mutations activatrices du gène *NOTCH1* sont détectées dans 56% des LAL-T et de rares patients avec LAL-T sont porteurs d'une t(7;9)(q34;q34) où *NOTCH1* est réarrangé et forme un gène de fusion avec le gène *TRB@* (Palomero et al., 2006; Weng et al., 2004). La voie de signalisation Notch est aussi importante pour la phase blastique de la LMC. *Hes1* « Hairy and enhancer of split 1 » est une cible importante de la voie NOTCH (Nakahara et al.,

2010). Le gène *HES1* a été décrit surexprimé chez 8 des 20 patients étudiés en LMC-PB dans l'étude de Nakahara et collaborateurs (Nakahara et al., 2010). De plus, il a été démontré dans un modèle murin, que la coexpression de *BCR-ABL1* et *Hes1* dans des progéniteurs GMPs et CMPs immortalise les progéniteurs et induit une LAM qui ressemble à la phase blastique de la LMC (Nakahara et al., 2010). Récemment, une activation des cibles de la voie Notch, *Hes1* et *Trib2*, a été rapportée dans la LMC-PB suite à l'inactivation de *Numb* par *Msi2* (Figure 7) (Ito et al., 2010).

2.3.2.4. La voie de signalisation MSI2/Numb

La voie MSI2/Numb (Figure 7, axe violet) a récemment été identifiée comme étant une voie cruciale pour l'autorenouvellement de la CSH. En utilisant une stratégie d'ARN interférence, *Msi2* a été identifié comme un régulateur positif de l'activité de la CSH chez la souris (Hope et al., 2010). MSI2 module la régulation des voies et des gènes impliqués dans l'autorenouvellement et la prolifération des CSHs (voies Ras-MAPK, Hedgehog et Notch, gènes *MEIS1*, *HOXA9* et *HOXA10*) (Hope et al., 2010; Hope and Sauvageau, 2011; Moore, 2010). Dans la CSH normale, *Msi2* est fortement exprimé et il a été démontré que *HoxA9* augmenterait son expression en s'attachant à un site de liaison qui reconnaît *HoxA9* localisé en position -5.7 kb du gène murin *Msi2* (Ito et al., 2010).

Pour tester la coopération de *MSI2* avec *BCR-ABL1* dans la progression de la LMC, Kharas et al, ont démontré dans un système d'expression inductible par la doxycycline, que la surexpression de *MSI2* induit l'accumulation de colonies myéloïdes plus immatures *in vitro* ainsi que l'expansion des CSHs et des progéniteurs (cellules LSK) (Kharas et al., 2010). D'autre part, afin d'avoir un modèle de LMC en phase blastique, Ito et al. ont coexprimé les fusions *BCR-ABL1* et *NUP98-HOXA9* et ont démontré une activation importante de *Msi2*. L'inhibition de *Msi2* par ARN interférant au niveau des cellules blastiques diminue la propagation de la leucémie et induit une augmentation dans l'expression de *Numb*. Ceci a aussi été confirmé dans des spécimens de patients en LMC-PB où l'expression de *MSI2* est augmentée, accompagnée d'une diminution dans l'expression de *NUMB* dans deux études (Ito et al., 2010; Kharas et al., 2010).

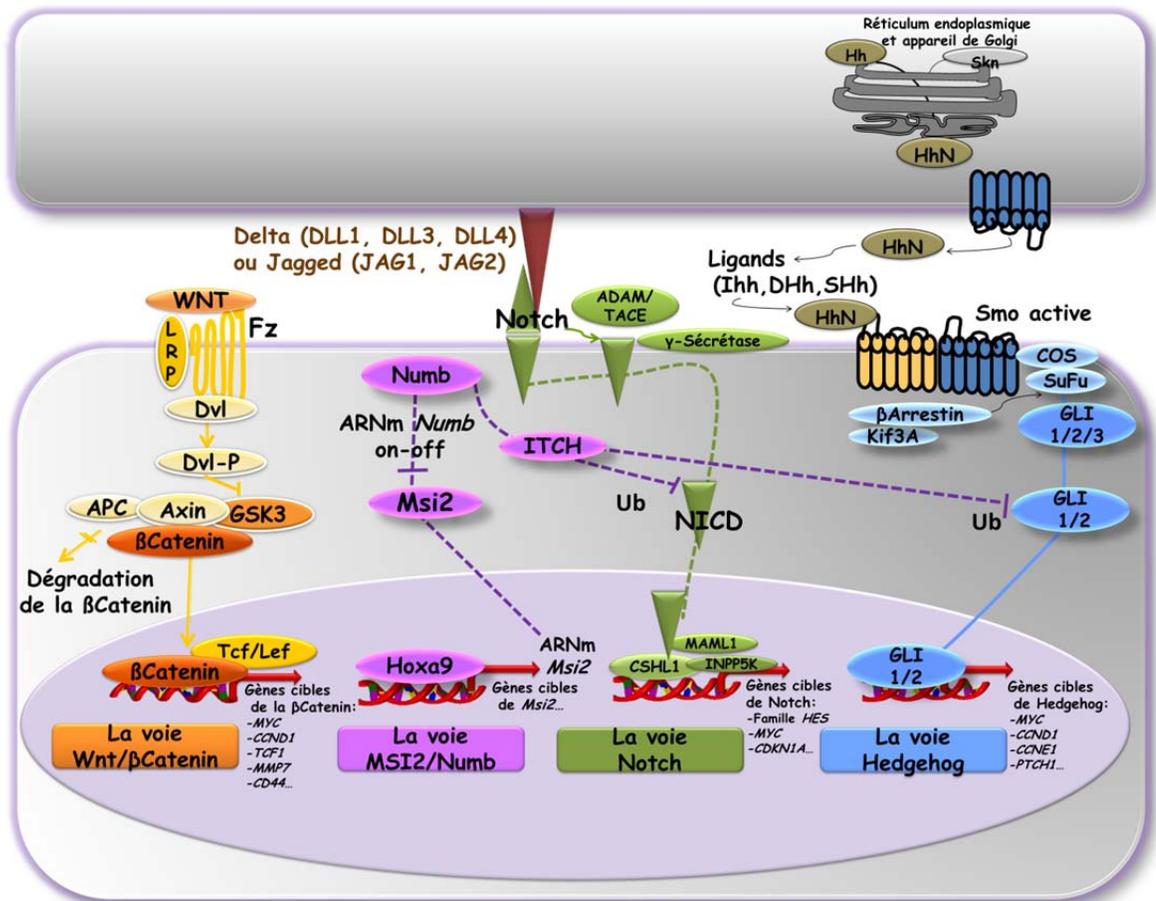


Figure 7. Les différentes voies de signalisation impliquées dans l'autorenouvellement de la cellule souche de la leucémie myéloïde chronique.

A) Axe orange: La voie Wnt/ β -caténine. Les protéines Wnt se lient à leur récepteur Frizzled (Fz), ce qui va prévenir la dégradation protéosomale de la β -caténine. Cette dernière se dissocie du complexe APC/Axine/GSK-3 β et migre dans le noyau où elle se lie aux facteurs de transcription LEF/TCF pour déclencher la transcription de gènes cibles incluant *MYC*, *CCND1*, *TCF1*, etc. **B) Axe violet : La voie MSI2/Numb.** Le facteur de transcription Hoxa9, se lie au niveau du site de liaison en 5' de *Msi2* pour activer sa transcription, ce qui va promouvoir l'autorenouvellement et l'expansion de la CSH et de la CSL. Suite à l'activation de *Msi2*, *Numb* est inhibé. Normalement, quand il est exprimé, *Numb* va inhiber les voies de signalisation Notch et Hedgehog via l'ubiquitination (Ub) E3 de ITCH, par dégradation protéosomale de NICD (Notch intracellular domain) et du facteur de transcription en doigt de zinc GLI de la voie de signalisation Hedgehog. Donc l'inhibition de *Numb* via *Msi2*, induit l'activation des gènes cibles des voies de signalisation Notch et Hedgehog. **C) Axe vert: La voie Notch.** Les protéines Notch sont

des récepteurs transmembranaires qui sont activés suite à la liaison à la membrane des ligands Delta ou Jagged. Au niveau membranaire, le récepteur NOTCH est reconnu par des ligands DLL d'une autre cellule ce qui entraîne le démasquage d'un site de clivage S2 par le complexe protéosomal ADAM/TACE, qui permet ensuite un nouveau clivage au niveau des sites transmembranaires S3 et S4, par le complexe protéolytique γ -sécrétase. Le récepteur ainsi tronqué (NICD) peut migrer vers le noyau grâce à ses domaines de localisation nucléaire. Au niveau nucléaire, il est reconnu par la protéine CSL capable de se fixer sur l'ADN, ce qui permet le recrutement d'une protéine MAML1 et ainsi la transcription des gènes cibles. **C) Axe bleu: La voie Hedgehog (Hh).** Le récepteur transmembranaire PTCH1 (patched) reconnaît trois ligands HH, Sonic (SHH), Indian (IHH) et Desert (DHH). Suite à la liaison du récepteur à son ligand, il y a libération de la protéine SMO (smoothened) activant les facteurs de transcription GL1, GLI2 et GLI3 ainsi que les gènes en aval, qui sont des régulateurs de la prolifération cellulaire.

Chapitre 3: La phase blastique de la leucémie myéloïde chronique

La LMC est un modèle qui permet de suivre les étapes de la leucémie d'une phase chronique à une phase accélérée et blastique, d'où l'intérêt d'identifier les altérations qui se rajoutent à l'évènement initial, la fusion BCR-ABL1. Ces altérations pourraient contribuer à la résistance de la LMC en phase blastique aux thérapies ciblées. La persistance de la LMC, malgré une thérapie avec les inhibiteurs de TK, peut être dépendante de la fusion BCR-ABL1 chez les patients porteurs de certaines mutations de ABL1. D'autres études démontrent que dans la phase blastique de la LMC, la résistance au traitement est indépendante de la fusion BCR-ABL1 et que de nouvelles mutations sont à l'origine de cette résistance. Récemment, le groupe de Brian J. Druker a démontré que l'insensibilité de la cellule souche de la LMC à l'IM ne dépend pas de l'activité de la fusion BCR-ABL1 et ce, même chez des patients avec un diagnostic récent de LMC (Corbin et al., 2011). Ces résultats suggèrent que d'autres mutations seraient responsables de cette résistance et de la transition de la LMC en phase blastique.

La nature hétérogène des anomalies moléculaires et chromosomiques identifiées, ainsi que des voies cellulaires altérées dans la LMC-PB rend difficile l'investigation de la LMC-PB. Un des défis importants demeure l'identification des mutations à l'origine de cette phase de la LMC et non des mutations secondaires qui sont dues à une instabilité génomique et à un avantage prolifératif. Les principales caractéristiques de cette phase sont l'expansion rapide de la population myéloïde ou lymphoïde et l'arrêt de différenciation (Kantarjian et al., 1987).

3.1.L'arrêt de différenciation myéloïde en phase blastique de la leucémie myéloïde chronique

La transformation blastique de la LMC est associée à l'expansion clonale du pool des GMPs BCR-ABL1 positifs qui ont perdu la capacité de se différencier en réponse aux stimuli tel que les cytokines (Jamieson et al., 2004). L'arrêt de différenciation des GMPs Ph positifs a été démontrée comme étant une conséquence de l'augmentation de l'expression de BCR-ABL1, et inversement, de faibles taux d'expression de la fusion induisent une maturation granulocytaire (Chang et al., 2007).

L'expression de PCBP2 (antérieurement nommé poly(rC)-binding protein 2 ou hnRNP-E2), une protéine de liaison à l'ARN poly(rC), dépend du niveau d'expression de BCR-ABL1. La stabilité de la protéine PCBP2 au niveau post-transcriptionnel suite à l'activation constitutive de la voie de signalisation MAPK^{ERK1/2} dépend de BCR-ABL1 (Chang et al., 2007). La réduction *in vivo* et *in vitro* de l'expression de PCBP2 et de sa phosphorylation par l'inhibition de l'activité MAPK^{ERK1/2} rétablit l'expression de CEBPA, ce qui va initier la différenciation des cellules 32D BCR-ABL1 positives, des progéniteurs CD34+ de patients en LMC-PB, ainsi que des cellules lin- exprimant l'oncoprotéine p210BCR-ABL1(Chang et al., 2007).

L'effet de l'expression élevée de BCR-ABL1 sur l'arrêt de différenciation myéloïde dépend de CEBPA (Perrotti et al., 2002), un facteur de transcription essentiel pour la différenciation granulocytaire. En effet, l'expression de la protéine CEBPA est faible dans les cellules médullaires de patients en LMC-PB, par contre son transcrit *CEBPA* est clairement présent. La traduction de CEBPA serait réprimée dans ces cellules, via une interaction de l'ARNm de *CEBPA* avec PCBP2 (Perrotti et al., 2002). Par ailleurs, l'expression ectopique de CEBPA induit la différenciation des précurseurs myéloïdes BCR-ABL1 positifs, ainsi que des progéniteurs CD34+ de patients en LMC-PB (Ferrari-Amorotti et al., 2006; Perrotti et al., 2002; Schuster et al., 2003).

Un arrêt de différenciation en LMC-PB a aussi été démontré dans un modèle murin, en utilisant une coopération entre les fusions BCR-ABL1 et RUNX1-MECOM. La fusion RUNX1-MECOM, générée par la translocation t(3;21)(q26;q22), réprime aussi l'expression de la protéine CEBPA, tandis que l'ARNm de CEBPA est exprimé (Cuenco and Ren, 2001; Helbling et al., 2004). En effet, la réexpression du microARN miR-328 qui

est sous-exprimé dans la LMC-PB, rétablit l'expression de CEBPA et induit la différenciation des cellules blastiques. Cet effet s'explique par l'interaction du microARN avec PCBP2, ce qui va séquestrer cette protéine, empêchant ainsi son effet inhibiteur sur la traduction de l'ARNm de *CEBPA* (Eiring et al., 2010).

Récemment des chercheurs ont identifié une oncoprotéine, MUC1-C, qui inhibe la différenciation des cellules blastiques par un mécanisme impliquant les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Le rôle des ROS dans la LMC-PB sera discuté dans les prochaines sections. L'inhibition de MUC1-C va réguler négativement l'expression de *BCR-ABL1* ainsi que de *CTNBI* induisant la différenciation myéloïde par des mécanismes liés à la voie ROS (Yin and Kufe, 2011; Yin et al., 2011).

3.2. Dommage à l'ADN et instabilité génomique en phase blastique de la LMC

Dans la LMC, il a été difficile de démontrer le lien entre l'instabilité génomique induite par la fusion *BCR-ABL1* et les anomalies chromosomiques observées chez les patients en PB. Cependant, l'induction des dommages à l'ADN par la fusion *BCR-ABL1* a été le sujet de plusieurs études ces dernières années. Les dommages à l'ADN peuvent aussi être induits par les radiations ionisantes et les drogues génotoxiques utilisées dans le régime de préparation lors de la transplantation de cellules hématopoïétiques chez les patients atteints de LMC. Comparativement aux cellules normales, les cellules avec la fusion *BCR-ABL1* accumulent plus de lésions à l'ADN induites par l'irradiation et les drogues, ce qui engendre plus d'aberrations chromosomiques [170, 171].

3.2.1. Les espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) ont des interactions importantes avec les molécules biologiques incluant l'ADN, les protéines et les lipides. L'augmentation dans le taux de ROS peut causer des dommages oxydatifs irréversibles, induisant la mort cellulaire. Lorsque comparé aux cellules normales, les cellules cancéreuses semblent fonctionner avec des taux élevés de stress oxydatifs endogènes *in vivo* et *in vitro* (Kawanishi and Hiraku, 2006; Szatrowski and Nathan, 1991). La chaîne respiratoire

mitochondriale pourrait jouer un rôle dans ce phénomène (Rodrigues et al., 2008). Les ROS peuvent causer des dommages au niveau des bases azotées et des résidus désoxyriboses de l'ADN et au niveau des nucléotides libres, générant ainsi des bases oxydées et des cassures double brin de l'ADN (CDB) (Beckman and Ames, 1997). Le nombre de « hits » oxydatifs par jour au niveau de l'ADN dans les cellules normales est d'environ 10^4 . Les cellules normales contiennent approximativement 50 CDBs par cellule par cycle cellulaire. Les cellules CD34+ de patients avec une LMC présente 3 à 8 fois plus de nucléobases oxydées et 4 à 8 fois plus de CDBs (Cramer et al., 2008; Koptyra et al., 2006; Nowicki et al., 2004).

L'activation d'oncogènes et le dysfonctionnement des mitochondries par exemple, sont des facteurs intrinsèques qui causent l'augmentation de la production des ROS dans les cellules cancéreuses (Brandon et al., 2006; Horn and Vousden, 2007; Irani et al., 1997; Rodrigues et al., 2008). L'expression de gènes associés à la transformation tumorale, tel que *KRAS*, *BCR-ABL1* et *MYC* induit la production des ROS (Behrend et al., 2003; Cramer et al., 2008; Koptyra et al., 2006; Slupianek et al., 2006; Vafa et al., 2002). Dans les lignées cellulaires et les cellules primaires de patients avec une LMC, la transformation induite par la fusion BCR-ABL1 augmente la production des ROS, causant des dommages oxydatifs et des mutations (Kim et al., 2005; Sattler et al., 2000). Les lignées transformées par BCR-ABL1 et les cellules CD34+ de patients avec une LMC contiennent 2 à 6 fois plus de ROS que les cellules normales. De plus, les cellules en phase blastique de la LMC produisent plus de ROS que les cellules en PC-LMC (Cramer et al., 2008; Koptyra et al., 2006; Slupianek et al., 2006). Pour protéger les cellules leucémiques de l'excès de ROS et des agents génotoxiques induisant les CDBs, la kinase BCR-ABL1 stimule les voies de réparation de type HRR « homologous recombination repair », NHEJ « nonhomologous end-joining » et le SSA « single-strand annealing » (Cramer et al., 2008; Nowicki et al., 2004). Une réparation inadéquate des CDBs induite par l'oxydation des bases de l'ADN via les ROS peut induire des mutations ponctuelles et des aberrations chromosomiques (Bernstein et al., 2002).

3.2.2. La réparation de l'ADN et la voie NER

La voie NER (Nucleotide excision repair) est la voie principale de réparation des dommages à l'ADN causés par les radiations ultraviolet (UV) et corrige une grande variété de lésions de l'ADN qui provoquent une distorsion de la double hélice et qui par conséquent, bloquent la transcription et la réplication. Les distorsions sont reconnues par le complexe du groupe xeroderma pigmentosum C-Rad23B. Ce complexe recrute à son tour d'autres protéines NER dont le facteur de transcription TFIIH et les hélicases NER qui déroulent la double hélice d'ADN en présence d'ATP. Cela est suivi par l'intervention de deux endonucléases simple brin en 5' et 3' de la lésion qui permet l'élimination d'un oligonucléotide simple brin de 27 à 34 bases. La réparation de l'ADN est complétée par les polymérases et finalement l'ADN est ligué par l'ADN ligase. Plusieurs groupes ont étudié l'interaction de BCR-ABL1 avec les complexes protéiques impliqués dans la voie NER. Toutefois, l'effet de la fusion sur le mécanisme NER demeure controversé (Canitrot et al., 2003; Laurent et al., 2003). L'expression de BCR-ABL1 pourrait rendre les cellules plus sensibles aux UVs, induisant des dommages à l'ADN tel que les 6-4 photoproduits et les dimères pyrimidine (Canitrot et al., 2003; Laurent et al., 2003). Selon cette hypothèse, la fusion BCR-ABL1 atténue le processus de réparation de l'ADN entraînant de l'instabilité génomique, ce qui favorise la progression de la LMC en phase blastique. Selon une deuxième hypothèse, BCR-ABL1 rend les cellules plus résistantes en activant la voie NER, stimulant ainsi la réparation des CDBs. Par contre, la fidélité de la réparation par les mécanismes HRR, NHEJ et SSA est compromise.

Il a été démontré que l'expression de la p210BCR-ABL1 dans la lignée murine lymphoïde Ba/F3 inhibe l'activité du NER, rendant ces cellules plus sensibles aux UVs et facilitant le phénotype mutateur (Canitrot et al., 2003).

Par contre, l'expression de la p210BCR-ABL1 dans les lignées myéloïdes humaines et de souris, ainsi que dans les cellules primaires de la moelle osseuse, induit une augmentation de l'activité NER et une résistance aux radiations UVs. Ceci pourrait être associé à un effet anti-apoptotique protecteur dans les cellules leucémiques (Laurent et al., 2003). L'IM renverse ces effets suggérant que l'activité de la tyrosine kinase est responsable de la dérégulation de la voie NER. La fusion p210BCR-ABL1 semble donc avoir un effet différent sur la lignée myéloïde vs lymphoïde. Par contre, la p190BCR-ABL1 n'affecterait pas la voie NER dans les cellules myéloïdes et lymphoïdes.

3.2.3. Contribution du NHEJ à l'instabilité dans la LMC

Le NHEJ ou la réparation par jonction des extrémités non-homologues est le principal mécanisme de réparation des CDBs utilisé chez les mammifères et n'est pas basé sur l'homologie des séquences comme c'est le cas pour la recombinaison homologue. Plusieurs évidences supportent l'hypothèse qu'un mécanisme NHEJ défectueux est associé avec l'augmentation des aberrations chromosomiques, incluant les translocations. Les souris qui présentent des déficiences au niveau d'un des éléments de la voie NHEJ, incluant XRCC6, PRKDC et DNA Ligase IV, finissent par développer des lymphomes avec des translocations chromosomiques complexes, ciblant fréquemment le gène *MYC* (Mills et al., 2003).

Dans la LMC, il a été démontré que la fusion BCR-ABL1 facilite la réparation des CDBs induites par l'irradiation. Les lignées cellulaires 32Dcl3 murines exprimant BCR-ABL1 accumulent plus de cassures comparativement aux cellules normales suite à l'exposition aux irradiations γ . Ces cassures sont réparées par les deux mécanismes de réparation le NHEJ et le HRR. Cependant des mutations et des délétions de grande taille sont détectées dans ces cellules BCR-ABL1 positives, suggérant une réparation anormale pouvant contribuer à l'instabilité génomique de ces cellules (Slupianek et al., 2006). Un défaut au niveau de la réparation des CDBs a aussi été rapporté dans les échantillons de patients avec LMC avec des délétions allant de 30 à 400 pb (Gaymes et al., 2002). Cette dernière étude identifie deux protéines de la voie NHEJ, XRCC6 et XRCC5, comme étant responsables de l'infidélité dans la réparation des CDBs. En effet, l'utilisation des anticorps contre ces deux protéines diminue considérablement la fréquence et la taille des délétions. Cela suggère que des mutations ou des modifications post-transcriptionnelles affectant ces deux protéines pourrait être la cause de la réparation anormale observée (Gaymes et al., 2002). D'autres études démontrent que la fusion *BCR-ABL1* aurait un effet sur la protéine PRKDC, avec une expression diminuée et en relation inverse avec le taux d'expression de *BCR-ABL1*, dans les cellules hématopoïétiques humaines et murines irradiées ainsi que dans les cellules CD34+ de patients en LMC-PB. La diminution de l'expression de PRKDC induite par *BCR-ABL1* est associée à une déficience dans la réparation de l'ADN ce qui pourrait jouer un rôle au niveau de l'instabilité génomique en phase blastique de la

LMC (Deutsch et al., 2001). Récemment, Poplawski et Blasiak 2010 (Poplawski and Blasiak, 2010) ont démontré que la PRKDC peut être dérégulée par la fusion BCR-ABL1 dans les lignées BV173 lorsqu'un dommage à l'ADN est induit par deux différents inhibiteurs de l'ADN topoisomérase II. Les lésions d'ADN induites par le sobuzoxane sont réparées par la voie D-NHEJ (PRKDC-NHEJ), alors que les dommages induits par l'étoposide utilisent deux voies du NHEJ, soit la voie dépendante du PRKDC D-NHEJ et la voie indépendante du PRKDC (voie « backup NHEJ, B-NHEJ »). Dans cette étude il est suggéré que la voie alternative B-NHEJ déclenchée par la fusion BCR-ABL1 induit plus d'erreurs dans la réparation, contribuant ainsi à l'instabilité génomique. Ceci démontre que le contexte cellulaire, ainsi que l'agent inducteur des CDBs sont des éléments importants. Récemment Chakraborty et collègues (Chakraborty et al., 2012) ont fourni une preuve expérimentale de l'instabilité chromosomique issue d'un dommage à l'ADN dans les cellules primaires de LMC des patients en PC, suggérant que *BCR-ABL1* dérégule le NHEJ, initiant ainsi la progression de la LMC en PB. Cependant, contrairement aux résultats publiés par Deutsch et collaborateurs (Deutsch et al., 2001), la persistance du dommage à l'ADN n'est pas liée à la réduction de la réparation des CDBs liée à la diminution du NHEJ. En effet, selon Chakraborty et al. le mécanisme de NHEJ est plutôt augmenté dans ces cellules. Cette cinétique augmentée du NHEJ confirme les résultats de l'étude de Slupianek A et al. (Slupianek et al., 2006).

Il faut toutefois noter que les cellules CD34+ isolées chez des patients avec une LMC en PC dans l'étude de Deutsch (Deutsch et al., 2001) ont subi plusieurs divisions cellulaires dans des milieux de culture in vitro, contrairement aux cellules CD34+ des patients avec une LMC en PC fraîchement isolées et analysées dans l'étude de Chakraborty. Ceci pourrait expliquer, du moins en partie, la différence des résultats obtenus dans ces études.

3.3.Fusion BCR-ABL1, instabilité chromosomique et formation des translocations chromosomiques

Lorsque les patients passent de la phase chronique à la phase blastique de la LMC, des anomalies cytogénétiques additionnelles sont souvent détectées. La première expérience qui a étudié l'hypothèse que l'expression de p210bcr-abl1 pourrait être responsable de l'instabilité chromosomique observée en phase blastique de la LMC, a été réalisée en 1992. Les auteurs ont démontré que les lignées cellulaires murines interleukine 3 (IL-3)-

dépendantes, qui deviennent indépendantes des cytokines en exprimant la fusion p210bcr-abl1, développent une instabilité chromosomique (Laneuville et al., 1992). Des changements au niveau de l'expression génique, la prolifération cellulaire et la régulation du cycle cellulaire ont aussi été notés. Par cytométrie en flux, les auteurs ont observé que les cellules s'accumulent au niveau de la phase G2/M, ce qui représente un blocage partiel de la progression du cycle cellulaire. L'accumulation des cellules en G2/M est une caractéristique des cellules qui entrent dans la réparation de l'ADN après exposition à des radiations ionisantes et des agents causant des dommages à l'ADN (Kubbies et al., 1985). Plusieurs groupes ont par la suite confirmé le rôle de BCR-ABL1 dans la génération de l'instabilité chromosomique, un phénotype clairement associé à la phase blastique de la LMC. Deutsch et al., ont analysé les échanges entre les chromatides sœurs et les réarrangements chromosomiques par FISH et ont démontré que les lignées cellulaires exprimant BCR-ABL1 ont une incidence plus élevée de translocations chromosomiques après le dommage à l'ADN induit par les irradiations gamma (Deutsch et al., 2003). Ils ont aussi observé une réduction importante de l'expression de BRCA1 suite à l'expression de la protéine de fusion BCR-ABL1, cette répression étant absente avec une protéine mutante BCR-ABL1. De plus, un traitement des cellules avec le STI571 rétablissait l'expression de BRCA1 (Deutsch et al., 2003). Ceci a aussi été observé dans les cellules primaires de la LMC (Suljagic et al., 2010). Dierov et al. ont démontré que la fusion BCR-ABL1 induisait une instabilité chromosomique dans les lignées hématopoïétiques murines Ba/F3 exprimant p210BCR-ABL1 dans des conditions de stress génotoxique en utilisant l'étoposide, un inhibiteur de la topoisomérase II (Dierov et al., 2009). Dans cette étude, ils ont aussi observé cette instabilité dans les cellules primaires CD34+ de patients avec LMC en phase chronique, accélérée et blastique. Ils ont noté une augmentation de la fréquence des translocations chromosomiques dans les cellules exprimant BCR-ABL1 traitées à l'étoposide comparativement aux cellules normales. Trois translocations chromosomiques par mitose sont présentes dans les cellules CD34+ des patients en PC-LMC comparativement à l'absence de translocation dans les CD34+ de moelle normale traité avec 10 μ M d'étoposide.

La présence d'anomalies chromosomiques et plus spécifiquement des translocations chromosomiques dans les cellules BCR-ABL1 positives après un stress oxydatif ou une irradiation a aussi été confirmée dans une autre étude (Skorski, 2008). L'utilisation d'un

inhibiteur de ROS, la vitamine E, diminuait considérablement la fréquence des translocations chromosomiques dans ces cellules.

3.4. Les anomalies cytogénétiques additionnelles les plus fréquentes dans la phase blastique de la LMC

Approximativement 80% des patients en phase blastique de la LMC développent des anomalies cytogénétiques additionnelles au chromosome Philadelphie. Cette évolution clonale reflète l'instabilité génétique qui caractérise la transition de la phase chronique à la phase blastique (Zippelius et al., 2007). Cependant ces clones doivent avoir un avantage prolifératif pour persister. Les anomalies les plus fréquentes en LMC-PB sont la duplication du chromosome Ph (38%), la trisomie 8 (34%) et l'isochromosome i(17)(q10) (20%) (Calabretta and Perrotti, 2004; Irvine et al., 2010; Radich, 2007). D'autres anomalies ont été décrites, tel que les trisomies 19, 21, 17 et les anomalies du chromosome 7 dans moins de 10% des cas (Calabretta and Perrotti, 2004; Irvine et al., 2010; Radich, 2007). La perte du chromosome Y est aussi présente en LMC-PB (5%). La perte du chromosome Y chez les patients avec LMC ne semble pas avoir un pronostic significativement différent des patients qui présentent seulement la t(9;22). Notons que le chromosome Y est fréquemment perdu chez les hommes âgés et que les patients avec LMC en rémission complète peuvent aussi perdre le chromosome Y. Ceci suggère que la perte du chromosome Y est un événement indépendant de la maladie et de sa progression (Fabarius et al., 2011; Lippert et al., 2010).

Ces anomalies sont plus fréquemment associées à la progression de type myéloïde. Récemment dans une étude de 1151 patients avec LMC, les anomalies chromosomiques additionnelles ont été classées dans deux groupes, soit un groupe principal incluant la trisomie 8, un deuxième chromosome Ph et l'isochromosome i(17)(q10), et un second groupe comprenant les autres anomalies dont les translocations t(3;12), t(4;6), t(2;16) et t(1;21) (Fabarius et al., 2011).

La trisomie 8, anomalie cytogénétique la plus fréquente en LMC-PB, est retrouvée seule en association avec la t(9;22) dans 10% des cas, et avec d'autres anomalies dans 25% des cas (Huret, 1998). Elle peut être présente lors du diagnostic de la LMC dans ~10% des cas et

confère alors un pronostic défavorable (Huret, 1998). Lorsque détectée durant l'évolution de la maladie, elle est surtout associée à une transformation myéloïde. Cette anomalie chromosomique est fréquemment rapportée dans plusieurs types d'hémopathies malignes et tumeurs solides est fréquemment associée à d'autres translocations chromosomiques primaires (Huret, 1998). Le ou les gènes impliqués sur le chromosome 8 demeurent inconnus, mais l'implication de *MYC*, localisé au niveau de la bande chromosomique 8q24, a été proposée. En effet, dans la phase blastique de la LMC, *MYC* peut être amplifié et surexprimé (Blick et al., 1987). Toutefois, une corrélation entre la trisomie 8 et l'amplification ou la surexpression de *MYC* n'a pas été clairement démontrée (Jennings and Mills, 1998). Des analyses d'expression par micropuces, d'échantillons de patients avec LAM présentant une trisomie 8 comme seule anomalie, ont montré une surexpression de plusieurs gènes localisés au niveau du chromosome 8 mais aussi au niveau d'autres chromosomes, ainsi qu'une diminution d'expression d'autres gènes incluant *MYC* (Virtaneva et al., 2001).

De façon intéressante, une association a été établie récemment entre la trisomie 8 et l'augmentation de l'expression des gènes *HOX*, particulièrement *HOXA9* et *HOXA10*, indépendamment d'un réarrangement du gène *MLL* (Kok et al., 2010).

L'isochromosome 17q retrouvée en LMC-PB est une anomalie chromosomique qui entraîne la perte des bras courts d'un chromosome 17. Il a été proposé qu'elle soit associée à des mutations de *TP53* localisée en 17p13.1. Cependant des mutations de *TP53* ne sont en général pas détectées dans les cellules de LMC avec i(17q) (Fioretos et al., 1999; Schutte et al., 1993). Le premier article qui a exclu cette association entre l'i(17q) et les mutations de *TP53* a analysé 21 patients avec i(17q) dont 8 en phase blastique de la LMC. Le point de cassure était souvent localisé au niveau ou à proximité de la région de délétion commune du Syndrome Smith Magenis (SMS) en 17p11 (Fioretos et al., 1999). Cette région riche en gènes est génétiquement instable et plusieurs syndromes de microdélétion y sont localisés. Par ailleurs, en utilisant les sondes centromériques du chromosome 17, il a été noté que la majorité des isochromosomes sont dicentriques. Ceci suggère que l'i(17)(q10) est formé suite à un événement de recombinaison intrachromosomique (Fioretos et al., 1999).

Le rôle du double chromosome Ph dans la progression de la LMC n'est pas clair, mais pourrait être lié à l'augmentation de l'expression de *BCR-ABL1*, qui est aussi rapportée dans la LMC-PB (Elmaagacli et al., 2000; Gaiger et al., 1995). Cependant la relation entre la présence d'un deuxième Ph et l'augmentation de l'expression de la fusion n'est pas bien établie (Calabretta and Perrotti, 2004).

3.4.1. Les translocations chromosomiques récurrentes en phase blastique de la leucémie myéloïde chronique

Les translocations chromosomiques en phase blastique de la LMC sont rares (<5%) (Radich, 2007). Les plus fréquentes sont la translocation t(3;21)(q26;q21)/fusion *RUNX1-MECOM*, la translocation t(7;11)(p15;p15)/fusion *NUP98-HOXA9* (Mitani et al., 1994; Nakamura et al., 1996a; Radich, 2007) et plus récemment la t(1;21)(p36;q21)/fusion *RUNX1-PRDM16* (Hazourli et al., 2006; Roche-Lestienne et al., 2008). La translocation t(3;21) est retrouvée dans approximativement 2% des cas et la t(7;11) est encore moins fréquente (Calabretta and Perrotti, 2004). D'autres translocations sont rarement observées en LMC-PB tel que la t(8;21)(q22;q22)/*RUNX1/RUNX1T1* (Ammatuna et al., 2009; Najfeld et al., 2011) et la t(3;12)(q26;p13)/*ETV6-MECOM* (Nakamura et al., 2002). L'effet oncogénique transformant des translocations t(3;21) et t(7;11) en phase blastique de la LMC sera discuté dans les sections suivantes.

3.4.1.1. La translocation t(3;21)/*RUNX1-MECOM* et les autres réarrangements du locus *MECOM* dans la phase blastique de la LMC

La t(3;21) est présente dans la phase blastique de la LMC, mais peut aussi être détectée dans les LAM et les SMD. Elle est associée à un mauvais pronostic. *MECOM (EVII)* est aussi réarrangé dans la t(3;12)(q26;p13) et la t(3;3)(q21;q26) ou inv(3)(q21q26) en LMC-PB (Levy et al., 1994; Suzukawa et al., 1997). Dans la classification WHO 2008, les LAM avec inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2)/*RPNI-EVII* font partie d'une nouvelle entité dans la catégorie des LAM avec anomalies génétiques récurrentes et représentent 1% à 2% des LAM (Swerdlow et al., 2008). Cette entité est caractérisée par une dysplasie des trois

lignées et une mégacaryocytopoïèse atypique (Lowenberg, 2008; Rubin et al., 1990). Les LAMs avec $inv(3)/t(3;3)$ ont un pronostic très défavorable (Grimwade et al., 2010).

Cuenco et al. ont démontré l'effet oncogénique de la fusion *RUNXI-MECOM* chez les souris transplantées avec des cellules de moelle osseuse transfectées avec des vecteurs rétroviraux contenant cette fusion. Durant la phase préleucémique, l'expression de cette fusion ne bloquait pas la différenciation myéloïde et les souris développent une LAM avec une latence de 5 à 13 mois (Cuenco et al., 2000). Cependant la coexpression de *RUNXI-MECOM* avec la fusion *BCR-ABL1* induit un blocage de la différenciation myéloïde et induit rapidement une leucémie myéloïde aiguë (Cuenco and Ren, 2001). Ces résultats suggèrent que la coopération entre deux mutations dont l'une active une tyrosine kinase et l'autre altère un facteur de transcription impliqué dans l'arrêt de la différenciation myéloïde, peut induire une leucémie myéloïde aiguë (Cuenco and Ren, 2001).

3.4.1.2. La $t(7;11)/NUP98/HOXA9$ et les autres réarrangements des gènes *HOX* dans phase blastique de la leucémie myéloïde chronique

La translocation $t(7;11)(p15;p15)$ n'est pas fréquente en phase blastique de la LMC. Toutefois, la fusion *NUP98-HOXA9* est importante car son effet oncogénique a été démontré chez la souris. En effet, la coexpression des gènes de fusion *BCR-ABL1* et de *NUP98-HOXA9* dans un modèle murin cause rapidement une maladie progressive correspondant à la phase blastique myéloïde de la LMC (Dash et al., 2002; Mayotte et al., 2002). Une étude a démontré une collaboration entre la fusion *BCR-ABL1* et la fusion *NUP98-HOXA9* ou une surexpression de *HOXA9*. Les souris transplantées avec des cellules de MO coexprimant les fusions *BCR-ABL1* et *NUP98-HOXA9* développent une leucémie aiguë en 7 à 10 jours après la transplantation. Toutefois, l'expression d'une seule fusion, *BCR-ABL1* ou *NUP98-HOXA9*, n'entraînait pas de leucémie au-delà de 175 jours pour la première fusion et au-delà de 2 mois pour la deuxième fusion (Mayotte et al., 2002). Dans cette étude, *HOXA9* est surexprimé chez les 3 patients étudiés en LMC-PB et non chez les 2 patients en phase accélérée, suggérant que l'augmentation de l'expression de *HOXA9* pourrait être impliquée seulement dans la phase blastique. La fusion *NUP98-HOXA9* augmente aussi la prolifération et la survie des progéniteurs myéloïdes. Ceci a été confirmé par Takeda et al., qui ont démontré que la fusion *NUP98-HOXA9* induit la

prolifération des précurseurs érythroïdes, affecte la différenciation myéloïde et érythroïde et bloque la différenciation des cellules CD34+ primaires humaines (Takeda et al., 2006). Dans une culture à long terme (qui reflète les cellules les plus primitives *in vitro*), la fusion augmente aussi la prolifération des progéniteurs/cellules souches suggérant une augmentation dans l'autorenouvellement des cellules primitives. Dans la même étude, l'expression génique étudiée par micropuces a révélé que la fusion NUP98-HOXA9 a un effet bi-phasique sur la prolifération des cellules CD34+. Une première phase de répression de la croissance cellulaire est associée à la surexpression du gène *IFNBI* ainsi que des gènes induits par l'IFN. Une deuxième phase de prolifération est associée à l'expression des gènes codant pour des facteurs de transcription homeobox, ainsi que les gènes *FLT3*, *KIT*, et *WT1*. Plus tardivement, plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs et des gènes associés à la différenciation hématopoïétique sont réprimés.

3.4.1.3. Les mutations moléculaires les plus fréquentes dans la phase blastique de la leucémie myéloïde chronique

Plusieurs gènes impliqués dans la différenciation hématopoïétique, le cycle cellulaire, l'apoptose, ou d'autres voies cellulaires peuvent être mutés dans la LMC-PB. Les mutations les plus fréquentes dans la PB sont détectées au niveau du gène suppresseur de tumeur *TP53* (20%–30%) (Calabretta and Perrotti, 2004; Di Bacco et al., 2000), du facteur de transcription hématopoïétique *RUNX1* (38%) (Roche-Lestienne et al., 2008), et du gène *CDKN2A/B* « cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/2B » (50%) impliqué dans la progression du cycle cellulaire (Mullighan et al., 2008b). D'autres facteurs de transcription sont mutés, tel que Ikaros (*IKZF1*) impliqué dans la spécification lymphoïde des lignées hématopoïétiques (muté dans 55% des cas de transformation lymphoblastique de LMC) (Mullighan et al., 2008a) et *GATA2* dans 11% des LMC-PB (Zhang et al., 2008a), la mutation L359 V (*GATA2*) étant exclusivement rapportée dans la LMC-PB (Zhang et al., 2009).

D'autres gènes sont dérégulés en raison des changements épigénétiques causés par l'expression constitutive de la fusion *BCR-ABL1* (Yong and Melo, 2009), comme par exemple *PRAME*, *MZF1*, *MECOM*, *WT1*, and *JUNB* qui pourraient avoir un rôle dans la progression blastique (Calabretta and Perrotti, 2004; Oehler et al., 2009; Radich et al., 2006). Il est à noter que plusieurs mutations peuvent coexister chez un même patient.

Le gène muté qui a été le plus étudié en LMC-PB est *TP53*. Ce gène joue un rôle important dans le traitement à l'IM. Les souris hétérozygotes pour la fusion *BCR-ABL1* et pour *p53* meurent d'une leucémie aiguë précédée d'un SMP ressemblant à la LMC chez l'humain. Ces leucémies sont des tumeurs clonales de type T, et ceci est similaire à l'induction de lymphomes à cellules T chez les souris *p53*^{-/-} (Donehower et al., 1992). L'effet de *p53* en LMC-PB ne semble pas être lié à l'arrêt de différenciation mais plutôt à l'expansion du pool des progéniteurs hématopoïétiques (Calabretta and Perrotti, 2004). En effet la protéine *p53* régule négativement des facteurs de transcription importants pour les voies de signalisation Wnt et Hedgehog. Spécifiquement, *p53* régule négativement l'activité transcriptionnelle de *GLI1* affectant l'autorenouvellement (Stecca and Ruiz i Altaba, 2009). Les régulateurs transcriptionnels de la voie Wnt, *CTNNB1* et *TCF4* sont aussi négativement régulés par *TP53* soit par dégradation (Prowald et al., 2007) ou par répression de la transcription (Prowald et al., 2007). La voie *p53* pourrait donc être une cible thérapeutique intéressante dans la LMC-PB (Peterson et al., 2011).

Un traitement des cellules exprimant *BCR-ABL1* avec l'IM, induit une activation sélective de *TP53* suite à l'inhibition de la kinase *BCR-ABL1* (Wendel et al., 2006). Par contre l'inactivation de *TP53* qui accompagne la progression de la LMC bloque la réponse à l'IM *in vitro* et *in vivo* malgré l'inhibition de la kinase *BCR-ABL1*. Par conséquent, les mutations qui affectent la voie *p53*, peuvent contribuer à la résistance à l'IM dans la LMC-PB (Wendel et al., 2006).

Nous avons cité les mutations les plus fréquentes. Cependant, de nombreux autres gènes peuvent être mutés en phase blastique de la LMC (Grossmann et al., 2011). La caractérisation de ces anomalies est importante afin de distinguer entre les mutations qui reflètent l'instabilité génomique, les mutations importantes pour la résistance au traitement ainsi que les mutations impliquées dans l'arrêt de la différenciation hématopoïétique.

La caractérisation de ces anomalies génétiques additionnelles pourrait ainsi contribuer à mieux comprendre les mécanismes oncogéniques impliqués dans la transformation blastique de la LMC et dans la résistance aux traitements associée à cette phase de la maladie.

Les objectifs de notre travail

1. Objectif principal

Contrairement à la phase chronique de la LMC, la phase blastique est associée à un pronostic très défavorable car les patients sont résistants aux traitements. Les mécanismes moléculaires impliqués dans cette évolution ne sont pas entièrement élucidés. L'objectif principal de notre projet est d'identifier de nouveaux mécanismes d'altérations génétiques dans la LMC-PB. La caractérisation cytogénétique et moléculaire des translocations chromosomiques détectées dans des cellules leucémiques de patients en LMC-PB permettra d'identifier les gènes impliqués ainsi que les mécanismes d'altération de ces gènes, soit par la formation de gènes de fusion et/ou par la dérégulation de l'expression des gènes impliqués. Ces anomalies génétiques pourraient collaborer avec la fusion *BCR-ABL1* dans la transformation blastique de la LMC.

2. Objectifs spécifiques

Nous avons détecté quatre nouvelles translocations $t(1;21)(p36;q22)$, $t(7;17)(p15;?q22)$, $t(2;12)(q31;p13)$ et $t(8;17)(q?11;?q22)$ dans des cellules leucémiques de patients en PB de la LMC collectées par la Banque de cellules leucémiques du Québec (BCLQ).

Nos objectifs sont :

- Délimitation des points de cassure des translocations chromosomiques et identification des gènes et des loci impliqués.
- Identification de nouveaux mécanismes d'altération génique dans ces translocations, soit par la formation de transcrits de fusion et/ou par l'altération de l'expression des gènes impliqués.

- L'expression des gènes identifiés sera ensuite étudiée dans d'autres spécimens de leucémies aiguës myéloïdes de différents types morphologiques et génétiques afin d'étudier leur implication potentielle dans cette maladie.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Échantillons de lignées et de cellules étudiés dans ce projet

Tous les échantillons de patients proviennent de la BCLQ et ont été obtenus avec un consentement du patient. Les échantillons des quatre patients qui ont été utilisés pour ce projet ont été sélectionnés en tenant compte de la morphologie et du pourcentage de blastes (représentatif d'une transformation de la LMC), de leurs anomalies cytogénétiques (translocations chromosomiques additionnelles à la t(9;22)), ainsi que de la résistance des patients au traitement.

Pour l'étude d'expression de *PRDM16*, 105 échantillons ont été étudiés comprenant des échantillons de 90 patients incluant 14 patients avec syndrome myélodysplasique (SMD) et SMD transformés en LAM, 7 avec LMC-PB incluant le cas 02-H056 avec la translocation t(1;21), l'échantillon de la même patiente en phase chronique de la LMC sans la t(1;21), 68 avec LAM de différents types morphologiques (FAB M0, M1, M2, M4, M5) et de différents groupes cytogénétiques avec les translocations chromosomiques t(11q23), t(15;17), t(8;21) et l'inversion 16, inv(16) (Tableau II). Dans notre étude, nous avons également utilisé des échantillons de 4 moelles normales (MN), un échantillon de cellules CD34 positives de donneur normal, 5 échantillons de sang périphérique normal (PB), ainsi que des cellules de la lignée HCT-116 et de quatre lignées cellulaires de LMC-PB (K562, KU812, MC3, MEG-01). La lignée HCT116 est une lignée cellulaire dérivée d'un carcinome colorectal et ces cellules de type épithélial à haute capacité proliférative sont couramment utilisées dans de nombreuses études. Le caryotype de cette lignée est complexe avec un nombre modal de 45 chromosomes. Les lignées K562 et MC3 nous ont été fournies par les Dr Denis-Claude Roy et C. Gambacorti-Passerini respectivement. La lignée K562 a été établie à partir des cellules d'une patiente de 53 ans en transformation blastique de la LMC. Le nombre des chromosomes est triploïde avec une quinzaine de marqueurs chromosomiques. La lignée MC3 est pseudodiploïde et possède deux chromosomes Ph. Les deux lignées KU812 (CRL-2099) et MEG-01 (CRL-2021) ont été fournies par ATCC (www.atcc.org/). La lignée KU812 a été établie à partir du sang périphérique d'un patient en LMC-PB et le caryotype de cette lignée est à 58 chromosomes

avec trois chromosomes Philadelphie ainsi que l'addition de plusieurs chromosomes. La lignée MEG-01 est issue des cellules d'un patient ayant eu une transformation mégacaryoblastique de la LMC avec un caryotype hyperdiploïde de 56 à 58 chromosomes. Huit échantillons de patients surexprimant *PRDM16* dans notre étude ont ensuite été investigués par FISH afin de vérifier si l'augmentation de l'expression de *PRDM16* était reliée à la présence d'une translocation chromosomique impliquant *PRDM16* ou d'une amplification génique.

Neuf échantillons de patients avec des pourcentages de blastes élevés supérieur à 35%, dont quatre patients en LMC-PB, 5 avec des LAM de types morphologiques différents (M1, M2 et M4) et une MN ont été utilisées pour l'étude d'expression des gènes *HOXA6*, *HOXA7* et *HOXA9* par RT-PCR (Tableau VIII).

Les échantillons utilisés dans les différentes études dans ce projet sont décrits dans le Tableau II.

Tableau II. Liste des échantillons étudiés dans ce projet et technique utilisée.

Code BCLQ	Diagnostic	Investigation par FISH	Investigation moléculaire
00-H059	LMC-PC	FISH pour altération de <i>PRDM16</i>	qPCR <i>PRDM16</i>
02H037	LMC-PB	Délimitation des régions impliquées au niveau des points de cassures et identification des gènes altérés	PCR, RT-PCR
02H052	LMC-PB	Délimitation des régions impliquées au niveau des points de cassures et identification des gènes altérés	PCR, RT-PCR, RACE-PCR
02H056	LMC-PB	Délimitation des régions impliquées au niveau des points de cassures et identification des gènes altérés	PCR, RT-PCR
03H054	LMC-PB	FISH pour altération de <i>PRDM16</i>	qPCR <i>PRDM16</i>
04H027	LMC-PB	FISH pour altération de <i>PRDM16</i>	qPCR <i>PRDM16</i> , RT-PCR <i>HOXA</i>
04H049	LMC-PB	FISH pour altération de <i>PRDM16</i>	qPCR <i>PRDM16</i> , RT-PCR <i>HOXA</i>
06H006	LMC-PB	Délimitation des régions impliquées au niveau des points de cassures et identification des gènes altérés	PCR, RT-PCR, qPCR
08H037	LMC-PB		RT-PCR <i>HOXA</i>
02H003	M0		qPCR <i>PRDM16</i>
03H030	M0		qPCR <i>PRDM16</i>
03H039	M0		qPCR <i>PRDM16</i>
04H096	M0		qPCR <i>PRDM16</i>
02H009	M1	FISH pour altération de <i>PRDM16</i>	qPCR <i>PRDM16</i>
02H025	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
02H028	M1		qPCR <i>PRDM16</i>

02H041	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
02H045	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
02H053	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
02H060	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
02H066	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
02H075			qPCR <i>PRDM16</i>
03H024	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
03H033	M1	FISH pour altération de <i>PRDM16</i>	qPCR <i>PRDM16</i>
03H081	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
03H094	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
03H116	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
03H119	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
04H001	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
04H006	M1	FISH pour altération de <i>PRDM16</i>	qPCR <i>PRDM16</i>
04H112	M1		RT-PCR <i>HOXA</i>
04H024	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
04H025	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
04H048	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
04H055	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
04H103	M1		qPCR <i>PRDM16</i>
04H120	M1	FISH pour altération de <i>PRDM16</i>	qPCR <i>PRDM16</i>
08H053	M1		RT-PCR <i>HOXA</i>
09H002	M1		RT-PCR <i>HOXA</i>
01H002	M3 t(15;17)		qPCR <i>PRDM16</i>
02H046	M3V t(15;17)		qPCR <i>PRDM16</i>
03H070	M3 t(15;17)		qPCR <i>PRDM16</i>
04H123	M3 t(15;17)		qPCR <i>PRDM16</i>
03H067	M5t(11)(q23)		qPCR <i>PRDM16</i>
04H041	M5B t(11)(q23)		qPCR <i>PRDM16</i>
04H080	M5A t(11)(q23)		qPCR <i>PRDM16</i>
05H066	M4 t(11)(q23)		qPCR <i>PRDM16</i>
03H065	M2 t(8;21)		qPCR <i>PRDM16</i>
03H083	M2 t(8;21)		qPCR <i>PRDM16</i>
05H001	M2 t(8;21)		qPCR <i>PRDM16</i>
05H042	M2 t(8;21)		qPCR <i>PRDM16</i>
04H141	M2		RT-PCR <i>HOXA</i>
03H109	M4E inv(16)		qPCR <i>PRDM16</i>
03H112	M4E inv(16)		qPCR <i>PRDM16</i>
04H030	M4E inv(16)		qPCR <i>PRDM16</i>
04H061	M4E inv(16)		qPCR <i>PRDM16</i>
04H091	M4 inv(16)		qPCR <i>PRDM16</i>

05H050	M4		RT-PCR <i>HOXA</i>
03H017	SMD		qPCR <i>PRDM16</i>
03H060	SMD/LAM		qPCR <i>PRDM16</i>
03H097	SMD/LAM		qPCR <i>PRDM16</i>
04H011	SMD/LAM		qPCR <i>PRDM16</i>
04H037	SMD		qPCR <i>PRDM16</i>
04H050	SMD/LAM		qPCR <i>PRDM16</i>
04H063	SMD/LAM		qPCR <i>PRDM16</i>
04H070	SMD/LAM		qPCR <i>PRDM16</i>
04H079	SMD/LAM		qPCR <i>PRDM16</i>
04H134	SMD		qPCR <i>PRDM16</i>
05H005	SMD		qPCR <i>PRDM16</i>
05H009	SMD		qPCR <i>PRDM16</i>
02H004	M6		qPCR <i>PRDM16</i>
02H026	M5A		qPCR <i>PRDM16</i>
02H033	M5A		qPCR <i>PRDM16</i>
03H016	M5A		qPCR <i>PRDM16</i>
03H028	M6B		qPCR <i>PRDM16</i>
03H041	M5		qPCR <i>PRDM16</i>
03H052	M5B	FISH pour altération de <i>PRDM16</i>	qPCR <i>PRDM16</i>
04H006	M2		qPCR <i>PRDM16</i>
04H054	M2		qPCR <i>PRDM16</i>
04H068	M2		qPCR <i>PRDM16</i>
04H084	M5B		qPCR <i>PRDM16</i>
04H107	M2		qPCR <i>PRDM16</i>
04H118	M5A		qPCR <i>PRDM16</i>
04H132	M4		qPCR <i>PRDM16</i>
04H140	M4		qPCR <i>PRDM16</i>
04H141	M2		qPCR <i>PRDM16</i>
05H033	M2		qPCR <i>PRDM16</i>
05H050	M4		qPCR <i>PRDM16</i>
09H027	MN1		RT-PCR <i>HOXA</i>
10H025	MN2		RT-PCR <i>HOXA</i>
07H140	MN3		RT-PCR <i>HOXA</i>

Tableau II : Liste des échantillons étudiés dans ce projet. Chaque patient a un numéro d'identification de la BCLQ pour codifier l'échantillon de sang ou de moelle. Les patients avec réarrangements de la bande 11q23 (gène *MLL*), translocations t(15;17)/fusion *PML-RARA*, et inversion du chromosome 16, inv(16)/fusion *CBFβ/MYH11*, ont été confirmés par FISH. Le type morphologique de la leucémie aiguë myéloïde (LAM) dans la

classification FAB est noté (M0 à M6). LMC-PB, leucémie myéloïde chronique en phase blastique ; LMC-PC, leucémie myéloïde chronique en phase chronique ; SMD, syndrome myélodysplasique; MN1 2 3, moelles normales 1, 2, 3.

2. Caryotype en bandes G obtenu suite à l'action de la Trypsine et du Giemsa

La découverte de Hsu T.C en 1952 permettant la distinction des chromosomes a marqué le début de la cytogénétique standard (le caryotype) (Hsu, 1952). Des améliorations ont ensuite été apportées à la technique, favorisant une augmentation du nombre et de la qualité des métaphases (Nowell, 1960; Tjio and Levan, 1956). Malgré sa faible résolution, le caryotype est devenu un outil important utilisé en recherche et en clinique, permettant une analyse globale des anomalies chromosomiques numériques et structurales des cellules. Le marquage chromosomique en bandes GTG (bandes G obtenues suite à l'action de la Trypsine et du Giemsa) est la technique de marquage chromosomique la plus utilisée dans l'investigation des réarrangements chromosomiques dans les cancers.

Culture cellulaire

Dans notre laboratoire, les cellules mononuclées du sang ou de la moelle sont récupérées par centrifugation suite à l'utilisation du milieu Ficoll-Paque. Les cellules mononuclées se retrouvent dans une couche blanchâtre entre deux couches, une couche supérieure contenant le plasma et une couche inférieure contenant le Ficoll et les autres types cellulaires. La culture des cellules mononuclées pour les leucémies aiguës se fait à différents temps : 24 heures, 48 heures et 72 heures. Nous utilisons comme milieu soit le MarrowMax (Gibco; cat. no. 12260-014) ou le RPMI 1640 (Invitrogen; cat no.11875-093). Le MarrowMax est un milieu complet spécifique pour la culture des cellules hématopoïétiques. Il est composé de sérum de veau fœtal, de L-glutamine, d'antibiotiques ainsi que de facteurs de croissance pour les cellules hématopoïétiques. Le RPMI 1640 est un milieu de base auquel nous ajoutons du sérum de veau fœtal, de la L-glutamine et de la pénicilline (100 UI/ml). Pour favoriser la croissance des cellules myéloïdes, des facteurs de croissance peuvent également être utilisés, dont le GM-CSF (Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor), le SCF (Stem Cell Factor) et le ligand-FLT3. Les cellules sont

cultivées à 37°C, et à une teneur en CO₂ de 5%. Un agent intercalant de l'ADN l'actinomycine D, peut être ajouté 30 minutes avant la fin de la culture. Cet agent inhibe la condensation de l'ADN, améliorant ainsi le niveau de résolution du marquage chromosomique. Enfin, la colcémide (KaryoMAX ColcemidTM Solution, Life technologies) un inhibiteur de la dépolymérisation des microtubules du fuseau mitotique, est ajouté à la fin de la culture pour une durée de 15 minutes, bloquant les cellules en métaphase.

Toutes les lignées cellulaires leucémiques ont été cultivées à 37°C dans le RPMI 1640 auquel nous ajoutons du sérum de veau fœtal, de la L-glutamine et de la pénicilline (100 UI/ml).

Récolte

Les cellules sont centrifugées pendant 8 minutes à 1000 rpm et le culot est suspendu dans une solution hypotonique de chlorure de potassium (KCl 0.56%) à 37°C pendant 15 minutes. On centrifuge pendant 8 minutes à 1000 rpm et les cellules sont resuspendues dans du Carnoy 3:1 composé de 3 volumes de méthanol et 1 volume d'acide acétique glacial. Deux étapes successives de fixation au Carnoy et de centrifugation sont réalisées. Suite à la fixation, les cellules sont gardées à -20°C jusqu'à utilisation.

Marquage en bandes GTG

Idéalement l'étalement des cellules sur lames se fait au Thermotron, sinon il faut prendre en considération l'humidité et la température pour un étalement optimal. Les lames vieilles sont traitées à la trypsine, rincées à l'éthanol 70% et colorées au Giemsa 4% pendant 3 à 5 minutes avant d'être rincées dans deux bains d'eau et séchées à la température de la pièce. L'analyse des lames au microscope permet la capture d'au moins une vingtaine d'images de mitoses, réalisée à l'aide d'une caméra et d'un logiciel de capture et d'analyse d'images (dans notre laboratoire : CytoVision, Leica Microsystems). Le caryotype permet la détection d'anomalies chromosomiques suite à un classement des chromosomes par paires. La formule chromosomique est écrite selon les normes établies par le système international de nomenclature de cytogénétique ISCN 2009 (International System for Human Cytogenetic Nomenclature 2009) (Shaffer et al., 2009).

3. Caryotype spectral

La technique de SKY « Spectral karyotyping » permet une analyse de l'ensemble des chromosomes suite à une seule hybridation in situ avec 24 sondes de peinture chromosomique. Ceci permet la visualisation de chaque paire chromosomique avec une couleur distincte. Les sondes obtenues commercialement (Applied Spectral Imaging) ont été préparées suite à la séparation des chromosomes par cytométrie en flux (Sillar and Young, 1981; Young et al., 1981) ou par microdissection (Greulich, 1992; Guan et al., 1992). Par la suite, grâce aux amorces aléatoires dégénérées, des amplifications ont été réalisées pour chaque chromosome par la réaction DOP-PCR « Degenerate Oligonucleotide Primed-PCR » (Guan et al., 1992; Telenius et al., 1992a; Telenius et al., 1992b).

Le marquage des sondes de peinture spécifique à chaque chromosome est effectué grâce à plusieurs combinaisons de cinq fluorochromes: le Spectrum vert, le Spectrum orange, le Texas red, la Cyanine 5 (Cy5) et la Cyanine 5.5 (Cy5.5). Ainsi, chaque chromosome a une combinaison unique de fluorochromes. La visualisation de tous les chromosomes ayant chacun une couleur distincte, nécessite une analyse des signaux d'hybridation par un interféromètre et l'attribution d'une couleur de classification pour chaque chromosome par le logiciel d'analyse.

Le principe du SKY est le même que celui de l'hybridation in situ en fluorescence « FISH » (voir paragraphe suivant). Quatre étapes principales sont nécessaires pour réaliser la technique de SKY: 1) Préparation des lames; 2) Dénaturation de l'ADN double brin de la sonde et de la cible sur lame (métaphases pour le SKY, cellules interphasiques et métaphases pour le FISH); 3) Hybridation de la sonde à l'ADN cible et lavages; 4) Détection des sondes et analyse des images.

1) Préparation des lames

Les lames sélectionnées sont d'abord déshydratées dans l'alcool en concentration croissante de 70%, 80% et 100% puis traitées à la RNase A/2x SCC (4 mg Rnase/40 ml 2x SCC) à 37°C pendant 45 minutes et sont lavées dans le tampon 2x SSC à température pièce pendant 5 minutes à 3 reprises. Les lames sont ensuite trempées dans une solution de 0.6mg pepsine/50 ml de 0.01M HCL à 37°C pendant 2 minutes, puis lavées dans une solution 1x PBS à température pièce pendant 5 minutes à 2 reprises. Puis, les lames sont

lavées dans une solution de 1x PBS/MgCl₂ (5 ml de 1M MgCl₂ plus 95 ml 1x PBS) à température pièce pendant 5 minutes et traitées dans une solution de 1% formaldéhyde/1x PBS/MgCl₂ (2,7 ml de formaldéhyde 37% ad 100 ml avec du 1x PBS /MgCl₂) à température pièce pendant 10 minutes.

Elles sont enfin lavées dans du 1x PBS à température pièce pendant 5 minutes puis déshydratées dans des solutions d'éthanol 70%, 80% et 100% pendant 2 minutes.

2) Dénaturation de l'ADN cible et de la sonde

La dénaturation des lames se fait à 70°C (+ ou- 20°C) dans la formamide 70%/2x SSC (35 ml formamide + 10 ml H₂O distillée + 5 ml 20X SSC) durant 1 minute, puis elles sont déshydratées dans trois bains successifs d'alcool froid à 70%, 80% et 100% pendant 2 minutes et séchées à l'air libre. La sonde du caryotype spectral est dénaturée séparément dans le bain-marie à 80°C pendant 7 minutes puis gardée à 37°C pendant 1 heure (jusqu'à utilisation).

3) Hybridation et lavages

On dépose la sonde sur la lame et on incube dans une chambre humide à 37°C pour 36 à 48 heures. Suite à l'incubation des lames, une série de lavages est effectuée dont trois lavages dans la formamide 50%/2X SSC à 45°C pendant 5 minutes et deux lavages dans du 1X SSC à 45°C pendant 5 minutes, puis les lames sont trempées dans une solution 4x SSC/0.1% Tween 20 pour 2 minutes. Le colorant Cy5 (80 ul) est appliqué, la lame est recouverte d'une lamelle et incubée dans une chambre humide à 37°C pendant 45 minutes. Ensuite, trois lavages sont effectués dans du 4XSSC/Tween 20 0,1% à 45°C pendant 3 minutes. Puis, 80 ul de colorant Cy5.5 est appliqué sur la lame qui est couverte d'une lamelle et incubée dans une chambre humide à 37°C pendant 45 minutes. Trois lavages successifs de 4xSSC/0.1% Tween 20 sont ensuite effectués pour 3 minutes et les lames sont rincées avec de l'eau distillée dans un bain avec une légère agitation constante, puis sécher à l'air libre. Le DAPI est appliqué sur la lame comme contre colorant, puis la lame est couverte avec une lamelle. L'analyse est effectuée dans notre laboratoire avec le logiciel de capture Spectral Imaging 2.3 et le logiciel d'analyse SKYview 1.6.1 de Applied Spectral Imaging (San Jose, CA). La fluorescence générée par la combinaison de différents fluorochromes est analysée par le logiciel et une couleur spectrale est assignée à chaque

combinaison grâce à un système à filtre triple (SKY CUBE™, Applied Spectral Imaging) permettant l'identification des chromosomes.

4. Hybridation in situ en fluorescence

Le principe du FISH « fluorescence in situ hybridization » repose sur l'hybridation moléculaire d'une sonde d'ADN marquée avec un fluorochrome, permettant sa visualisation suite à son hybridation spécifique à une séquence cible complémentaire d'ADN, au niveau des noyaux interphasiques ou des chromosomes métaphasiques. Trois étapes principales sont nécessaires pour réaliser la technique du FISH: 1) Dénaturation de la sonde et de la lame; 2) Hybridation et lavages; 3) Visualisation des sondes et analyse des images.

1) Dénaturation de la sonde et de l'ADN cible sur lame

La dénaturation se fait grâce à la chaleur et la formamide, cette dernière déstabilise les liaisons hydrogènes liant les deux brins d'ADN permettant une dissociation des deux brins à des températures qui n'affectent pas la structure des chromosomes et des noyaux. La dénaturation des lames se fait dans la formamide 70%/2X SSC à 73°C pendant 5 minutes, suivie par une déshydratation à l'alcool 70%, 85% et 100% pendant une minute puis un séchage à l'air libre. La dénaturation de la sonde à l'abri de la lumière, se fait à la même température, 73°C, pendant 2 à 5 minutes dépendamment de la sonde utilisée.

2) Hybridation et lavages

L'hybridation entre la sonde et l'ADN cible se fait durant une incubation de 16 heures à 37°C dans une chambre humide dans la noirceur. Le lendemain, un premier lavage est fait avec la solution 0,4X SSC/0,3% NP-40 à 73°C. Le temps du lavage (quelques secondes à 2 minutes) dépend du type de sonde utilisée : sondes commerciales généralement de grande taille, ou sondes préparées au laboratoire à partir de vecteurs de type BACs (Bacterial artificial chromosomes) ou PACs (Phage P1-derived artificial chromosomes). Un deuxième lavage se fait à température pièce dans une solution 2X SSC/0,1% NP-40 pendant quelques secondes à une minute dépendamment de la sonde utilisée. Dans le but de maximiser le signal d'hybridation spécifique et de minimiser les signaux générés par une hybridation non spécifique (bruit de fond), une optimisation des conditions de lavage

est nécessaire pour chaque sonde utilisée. En général, pour les sondes BACs/PACs, de plus petites tailles que les sondes commerciales, les conditions de lavage sont moins stringentes. De plus, une validation de la localisation de ces sondes en les hybridant sur des préparations métaphasiques de sujets normaux est nécessaire.

3) Détection des sondes et analyse des images

Suite à la contre coloration des lames au DAPI, la visualisation et l'analyse des lames de FISH sont effectuées en utilisant une combinaison de filtres qui permettent la visualisation des différents fluorochromes utilisés dans le marquage des sondes. Les images sont capturées à l'aide du logiciel CytoVision® version 3.6 (Leica Microsystems) dans notre laboratoire.

Tableau III. Liste des sondes Abbott utilisées dans ce projet.

Nom de la sonde	Localisation	Gènes /locus	Caractéristiques	Utilisation dans le projet
<i>ES-BCR-ABL1</i> (<i>extra signal BCR-ABL1</i>)	9q34.1 22q11	<i>ABL1</i> <i>BCR</i>	<u>Sonde LSI <i>ABL1</i> :</u> - spectrum orange - taille 650 Kb - couvre les gènes <i>ABL1</i> et <i>ASS</i> <u>Sonde LSI <i>BCR</i> :</u> - spectrum vert - taille 300 Kb - couvre la majorité du gène <i>BCR</i> (<i>exons 1 à 14</i>).	Confirmation de la fusion <i>BCR-ABL1</i> chez les patients atteints de LMC
<i>RUNX1/RUNXIT1 DF</i> (<i>double fusion</i>)	8q21.3 21q22	<i>RUNXIT1</i> <i>RUNX1</i>	<u>Sonde LSI <i>RUNXIT1</i> :</u> - spectrum orange - taille 655 Kb - couvre le gène et une région adjacente <u>Sonde LSI <i>RUNX1</i> :</u> - spectrum vert - taille 1,4 Mb - couvre le gène et une région adjacente	Investigation du réarrangement de <i>RUNX1</i> dans la t(1;21) ainsi que chez les patients qui surexpriment <i>PRDM16</i>
<i>ETV6/RUNX1</i> « <i>ES Dual Color</i> »	12p13 21q22	<i>ETV6</i> <i>RUNX1</i>	<u>Sonde LSI <i>ETV6</i> :</u> - spectrum vert - taille 350 kb - couvre la partie 5' <i>ETV6</i> (<i>exons 1 à 4</i>) et une région adjacente <u>Sonde <i>RUNX1</i> :</u> - spectrum orange - taille 500kb - couvre tout le gène et une région adjacente	Investigation du réarrangement de <i>RUNX1</i> dans la t(1;21) et du réarrangement de <i>ETV6</i> dans la t(2;12)
<i>ETV6 Dual Color</i> « <i>Break Apart</i> »	12p13	<i>ETV6</i>	- couvre les deux parties 5' et 3' de <i>ETV6</i> , de deux couleurs différentes. <u>Sonde 3' d'<i>ETV6</i> :</u>	Investigation du réarrangement de <i>ETV6</i> dans la

			- spectrum vert - taille 632 kb <u>Sonde 5' d'ETV6 :</u> - spectrum orange - taille 486 kb	t(2;12)
<i>LSI 1p36/LSI 1q25</i>	1p36.32 1q25	<i>TP73 et EGFL3</i> <i>ABL2 et ANGPTL 1</i>	<u>Sonde 1p36.32 :</u> - spectrum orange - taille 400 kb <u>Sonde 1q25:</u> - spectrum vert - taille 620 kb	Investigation du réarrangement de la bande 1p36 dans la t(1;21)
<i>LSI RARA Dual Color Break Apart</i>	17q21	<i>RARA</i>	- couvre les deux parties 5' et 3' de <i>RARA</i> , de deux couleurs différentes. <u>Sonde 5' de RARA :</u> - spectrum orange - taille 150 kb <u>Sonde 3' de RARA :</u> - spectrum vert - taille 417 kb	Investigation du réarrangement de la bande 17q21 dans la t(8;17)

Tableau IV. Liste des BACs utilisés dans ce projet.

Nom du BAC ou du PAC	Localisation	Gène (s) ou locus étudiés avec cette sonde
t(1;21)(p36.3;q22.1)		
RP11-421C4	1p36.33	Plusieurs gènes à partir du gène <i>CPSF3L</i> jusqu'à <i>ATAD3B</i>
RP1-283E3	1p36.33	Plusieurs gènes à partir du gène <i>CDK11B</i> jusqu'à <i>GNB1</i>
RP1-163G9	1p36.32	<i>PRDM16</i> (exon 1 et intron 1)
RP4-785P20	1p36.32	<i>PRDM16</i> (intron 3-exon 17)
RP11-659J6	1p36.32	<i>PRDM16</i> (intron 1- intron 4)
RP11-59J21	1p36.32	<i>PRDM16</i> (exons 3 à 12)
RP11-299D9	21q22.1	<i>RUNX1</i> (exons 2 à 8)
RP11-771C10	21q22.1	<i>RUNX1</i> (exons 7 et 8)
t(2;12)(q?31;p12)		
RP11-892L20	2q31.1	<i>KIAA1715</i> centromérique au locus <i>HOXD</i>
RP11-116M4	2q31.1	<i>KIAA1715</i> centromérique au locus <i>HOXD</i>
RP11-426F12	2q31.1	<i>KIAA1715</i> centromérique au locus <i>HOXD</i>
RP11-99I21	2q31.1	À partir du gène <i>KIAA1715</i> jusqu'à <i>HOXD4</i>
RP11-203G19	2q31.1	locus <i>HOXD</i> à partir de <i>EVX2</i> jusqu'à <i>HOXD1</i>
RP11-1078K2	2q31.1	Région sans gène connu, centromérique au locus <i>HOXD</i>
RP11-12N7	2q31.1	<i>ATF2</i>
RP11-446K13	2q31.1	<i>TLK1</i>
RP11-1023G22	2q31.1	<i>SP3</i>
RP11-1125C19	2q31.1	<i>METAP1D, DLX1, DLX2</i>
t(7;17)(p15;q?22)		
RP11-692L4	7p21.2	<i>ETV1</i>
RP11-1132K14	7p15.2	<i>HOXA3</i> jusqu'à <i>EVX1</i>

RP11-22E20	17q22	<i>MSI2</i> (exons 7 à 14)
RP11-166N4	17q22	<i>MSI2</i> (intron 5)
RP11-959D16	17q22	<i>MSI2</i> (intron 6 à l'exon 11)
RP11-964F3	17q22	<i>MSI2</i> (exon 1 à l'intron 5)
RP11-1089N22	17q22	<i>MSI2</i> (exon 1 à l'intron 5)
RP11-1002I13	17q22	<i>AKAP1</i> et 5' <i>MSI2</i> (exon 1 à intron 5)
RP11-449M1	17q25.3	<i>SEPT9</i>
RP11-676C19	17q22	<i>ANKFN1</i> (exon1 à intron 2)
RP11-1018A15	17q22	<i>ANKFN1</i> (intron2 à exon 17)
RP11-9G4	17q22	<i>HLF</i>
RP11-799D23	17q21.33	<i>CAT7, TAC4</i>
RP11-209M4	17q21	<i>MEOX1, SOST</i> et <i>DUSP3</i> (exon1)
t(8;17)(q?12;q?q22)		
RP11-845K20	8q11.21	<i>SNAI2, EFCAB1</i>
RP11-13I4	8q11.21	<i>PRKDC, CEBPD, KIAA0146</i>
RP11-30L15	8q11.23	<i>RGS20, TCEA1, LYPLA1</i>
RP11-246M7	8q12.1	<i>TGSI, LYN</i>
RP11-22E14	8q12.1	<i>LYN, RPS20, SNORD56, MOS</i>
RP11-196H10	8q12.1	<i>XKR4</i>
RP11-122D2	8q12.1	<i>PLAG1, CHCHD7</i>
RP11-653L18	8q11.23	<i>RP1</i>
RP11-30G11	8q11.23	<i>SOX17</i>
RP11-359F18	8q11.23	<i>SOX17</i>
RP11-832F24	8q11.23	<i>SOX17</i>
RP11-97I9	8q11.23	Centromérique à <i>SOX17</i>
RP11-22E20	17q22	<i>MSI2</i> (exons 7 à 14)
RP11-166N4	17q22	<i>MSI2</i> (intron 5)
RP11-1089N22	17q22	<i>MSI2</i> (exon 1 à intron 5)
RP11-3K24	17q23.2	<i>USP32</i>
RP11-430B7	17q24.2	<i>KPNA2, LOC100499466</i>
RP11-945N10	17q24.3	<i>MAP2K6</i>
RP11-435J17	17q22	<i>LPO, MPO, SUPT4H1, BZRAP1, RNF43, HSF5</i>
RP11-142B17	17q22	<i>TEX14, RAD51C, PPM1E</i>
RP11-209M4	17q21	<i>MEOX1</i> et <i>SOST</i>
RP11-640G9	17q22	<i>VEZFI, SRSF1</i>

5. Préparation des vecteurs BACs et PACs

Les BACs et les PACs utilisés comme sondes dans la technique de FISH, sont des vecteurs comprenant des séquences du génome humain (insert). Chaque séquence est associée à un numéro correspondant (nomenclature commençant par RP11 pour le BAC et par RP1 ou RP4 pour le PAC). La taille de l'insert pour ces vecteurs est en moyenne de 100 à 150 kb. Nous avons sélectionné les BACs et les PACs utilisés dans ce projet, dans les régions d'intérêt à l'aide du site du Genome Browser UCSC (<http://genome.ucsc.edu/>) et ils ont été obtenus du BACPAC Ressources Center (<http://bacpac.chori.org/>). Le BAC est constitué d'un vecteur dérivé du plasmide F (facteur de fertilité) assurant sa réplication et son expression une fois inséré dans la bactérie E.Coli. Un site de clonage dans le gène lacZ est aussi présent, fournissant la sélection de criblage blanc/bleu. Au niveau du BAC, une origine de réplication oriS maintient les copies de 1 à 2 par cellule limitant les phénomènes de recombinaison. La présence du gène de résistance au chloramphénicol permet la sélection des bactéries contenant le BAC. Le PAC, dérivé du bactériophage P1, se réplique comme un plasmide à une copie unique grâce au réplicon plasmidique de P1 et il est très stable. Les clones recombinants sont sélectionnés en présence de kanamycine, grâce à une enzyme toxique pour E.coli, codée par le gène SacB, qui s'exprime seulement en absence du fragment d'ADN humain.

Différents protocoles d'extraction des BACs/PACs ont été utilisés dans ce projet dont le Qiagen large-construct kit (Qiagen, cat. no. 12462) et le Spin doctor BAC prep kit (Gerard Biotech, cat. no. S121L). Les bactéries E.coli contenant les vecteurs sont reçues dans des milieux LB semi solides. Afin d'isoler une colonie nous entreprenons des cultures dans le milieu LB et l'antibiotique approprié afin d'éviter les contaminations. Pour les BACs, la concentration du Chloramphénicol est de 12.5µL/ml et pour les PACs, la concentration de la kanamycine est à 50 µg/mL. Suite à une incubation toute la nuit, des étalements sont effectués dans des boîtes de pétri afin d'obtenir des colonies isolées. À partir d'une colonie isolée, on effectue une culture bactérienne pour l'extraction de l'ADN des BACs. La période d'incubation dans le milieu LB (125 mL) avec antibiotiques est de 16 heures à 37°C. On sépare en premier les bactéries du milieu par centrifugation 10 minutes à 5000 rpm. Le culot bactérien est par la suite homogénéisé dans 10 mL de solution P1 (5 mL de TRIS 1M à pH=8, 2 mL de EDTA à 0.5M à pH=8, 93 mL d'eau DIUF, 50 µL de RNase 20

mg/mL). On y rajoute 10 mL de solution P2 (80 mL de NaOH à 0,25N, 1 gr de SDS plus 20 mL d'eau). Le mélange est incubé pendant au moins 5 minutes avant le rajout de 10 mL de solution P3 (KOAc à 3M, pH=5.5). Suite à une centrifugation à 10000 rpm pendant 10 minutes nous récupérons l'ADN dans le surnageant par filtration. L'ADN est précipité par l'isopropanol froid (30 mL), avec incubation de 5 minutes et centrifugation de 15 minutes à 9000 rpm. Le surnageant est jeté et le culot qui contient l'ADN est lavé à l'éthanol 100%. À la fin de l'extraction, nous suspendons l'ADN dans le TE (Tris-EDTA 1X) et on mesure la concentration de l'ADN par densité optique.

6. Marquage des vecteurs BACs/PACs par déplacement de coupures de type « Nick translation »

Suite à l'extraction de l'ADN des BACs ou PACs et quantification, le marquage se fait par ajout du fluorochrome sélectionné, Spectrum vert ou orange. En premier, grâce à l'enzyme DNase I, des coupures simple brin se font au hasard au niveau de l'ADN. En deuxième lieu, l'ADN polymérase I s'associe aux extrémités 3' des cassures et allonge le brin en direction 5'-3' en incorporant les nucléotides marqués (dUTP) tout en excisant devant elle les nucléotides non marqués 5'.

Le kit de « Nick translation » utilisé pour le marquage des sondes (Abbott Molecular ; cat. no. 32-801300) nécessite une quantité de 1µg d'ADN à marquer dans la noirceur, 2.5 µL de fluorochrome 0,2 mM de Spectrum vert ou orange (Enzo Life Sciences ; cat. no. 02N32-050 et cat. no. 02N33-050), 10 µL (0,1 mM) de dNTPs (désoxyribonucléotides), 5 µL (0,1 mM) de dTTP et l'enzyme (10 µL) et son tampon (5 µL). Les quantités d'eau et d'ADN sont ajustées afin de marquer 1µg d'ADN par réaction. Cette dernière se fait sur glace et en noirceur suite à une incubation de 8 à 16 heures. La réaction est arrêtée à une température de 70°C pendant 10 min. Suite au marquage des sondes, on rajoute de l'ADN COT-1 humain à 30µg/ml (Invitrogen ; cat. no. 15279-011), ainsi que de l'ADN de sperme de saumon (Sigma ; cat. no. D9156-1ML). Ces deux types d'ADN facilite la précipitation de l'ADN de la sonde et minimise l'hybridation non spécifique. Le mélange d'ADN (ADN du BAC ou PAC marqué, COT-1 et sperme de saumon) est précipité avec 0.1 volume d'acétate de sodium (9 µL) ainsi que 2.5 volumes d'éthanol 100% (250 µL) à -20°C pour

toute la nuit ou à -80°C pour 4 heures. La réaction est suivie d'une centrifugation à 4°C , 30 minutes à 12000 rpm. Le culot est séché pendant 15 minutes, puis suspendu dans 6 μL d'eau sans nucléase et 14 μL de solution d'hybridation (50% formamide, 10% dextran sulphate, $2\times\text{SSC}$ pH=7.0). La sonde est prête à utiliser en FISH et peut être conservée à -20°C dans la noirceur.

7. Extraction des acides ribonucléiques totaux à partir du TRIzol™

À la BCLQ, la conservation des spécimens humains pour l'étude de l'ARN se fait dans le TRIzol™ (Invitrogen ; cat. no. 15596018) à -80°C , ce milieu assurant une meilleure conservation des cellules pour l'extraction des ARNs totaux de haute qualité. On prépare la zone de travail minutieusement afin d'éliminer toute source de contamination et de dégradation de l'ARN. Afin d'homogénéiser l'échantillon, on le met pendant 5 à 10 minutes sur la glace pour assurer la dissociation du complexe nucléoprotéine. Il faut s'assurer que l'échantillon soit bien décongelé. L'ajout de 200 μl de chloroforme permet de séparer les protéines, les lipides et les polysaccharides (composants hydrophobes qui vont rester dans le chloroforme), des acides nucléiques (composants hydrophiles qui vont être dans la partie aqueuse supérieure). La centrifugation à 12000 rpm pendant 15 minutes à 4°C permet de séparer trois phases : une phase inférieure rouge, la phase de phénol-chloroforme, une interphase, et une phase aqueuse supérieure sans couleur. L'ARN reste uniquement dans la phase aqueuse. Le volume de la phase aqueuse est d'environ 60% du volume de TRIzol™ utilisé. La phase aqueuse hydrophile contenant les acides nucléiques est transférée dans un tube de 1.5 mL. Pour la précipitation de l'ARN nous rajoutons 500 μL d'isopropanol dans chaque tube et on mélange plusieurs fois en inversant. Afin de donner le temps à l'ARN de précipiter, on incube à température pièce de 5 à 10 minutes puis on centrifuge à 12000 rpm pour 10 minutes à 4°C . On décante et on jette le surnageant en prenant soin de ne pas déplacer le culot d'ARN. On fait un lavage à EtOH 75% (1 ml), suivi d'une centrifugation des échantillons à 7500 rpm à 4°C pendant 5 minutes, puis on décante en prenant soin de ne pas déplacer le culot de couleur blanchâtre. Suite à l'évaporation de l'éthanol, on ajoute 60 μL d' H_2O DEPC (diethylpyrocarbonate), on incube à 60°C de 10 à 15 minutes, et on conserve immédiatement à -80°C . Pour la

quantification des ARNs, nous avons utilisé un spectrophotomètre et le bio-analyseur Agilent Bioanalyzer 2100.

8. Extraction des acides déoxyribonucléiques à partir du TRIzol™

L'extraction des acides déoxyribonucléiques (ADN) a été effectuée à partir des tubes TRIzol™ restants de l'extraction de l'ARN. On enlève la phase aqueuse résiduelle afin d'éviter une contamination par l'ARN. On ajoute 300 µL d'éthanol à 100% et on mélange par inversion. Après avoir laissé reposer 2 à 3 minutes, on sédimente l'ADN par centrifugation à une vitesse maximale de 2000 rpm pendant 5 minutes à 4°C. On peut garder la phase aqueuse contenant les protéines à -20°C. L'ADN est lavé avec 1mL de solution de citrate de sodium et 10% d'éthanol. À chaque lavage on laisse le culot d'ADN 30 minutes à température de la pièce dans la solution avec des inversions périodiques sur le rotateur puis on centrifuge à 2000 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Le lavage est répété 2 à 3 fois selon la grosseur du culot d'ADN obtenu. Par la suite l'ADN est resuspendu dans 1,5mL d'éthanol à 75% et laissé à température pièce pendant 10 à 20 minutes en mélangeant périodiquement. Suite à la centrifugation à 2000 rpm pendant 5 minutes à 4°C, on sèche le culot d'ADN à l'air libre pendant 5 à 15 minutes. L'ADN est dissous dans 300 à 600µL de TE 1X. Une dernière centrifugation est effectuée et on récupère l'ADN dans la phase aqueuse. Finalement, pour permettre à l'ADN de bien se dissoudre dans le TE 1X on peut chauffer à 55°C pendant une heure, puis garder à -20°C.

9. Synthèse des acides déoxyribonucléiques complémentaires

La synthèse des acides déoxyribonucléiques complémentaires (ADNc) est effectuée à partir des ARNs, pour faire les réactions d'amplification RT-PCR et les RT-PCR quantitatives (voir les paragraphes suivants) en deux étapes séparées (synthèse de l'ADNc et amplification par PCR). Deux kits ont été utilisés, celui de Invitrogen (SuperScript® First-Strand Synthesis System for RT-PCR; cat. no. 11904-018) et celui d'ABI (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; cat. no. 4368814). Pour les deux kits une

quantité de 2µg ARN est requise par réaction, ainsi que des amorces aléatoires ou « random hexamers ». Pour le kit Invitrogen, on ajoute à l'ARN, 1 µL de random hexamers et 1 µL de dNTP à 10 nM et on ajuste l'eau DEPC jusqu'à 10 µL selon le volume d'ARN initial. Le tube est incubé à 65°C pendant 5 minutes et mis sur glace par la suite. Pour chaque tube on rajoute un mélange préalablement préparé, composé de 2 µL du tampon RT 10X, 2 µL de DTT 0,1M, 4 µL de MgCl₂ 25 mM ainsi qu'1 µL du mélange d'enzymes recombinante RNaseOUT et de l'inhibiteur de la ribonucléase. Pour une bonne efficacité, la réaction est incubée à 25°C pendant 2 minutes avant de rajouter 1 µL d'enzyme SuperScript™ II RT (50 unités). La synthèse de l'ADNc se fait au thermocycleur suivant un cycle de 10 min à 25°C, 50 min à 42°C et 15 min à 70°C. Afin de dégrader l'ARN initial restant à la fin de la réaction, il faut ajouter 1 µL de l'enzyme endoribonucléase RNase H et finalement incubé à 37°C pendant 20 minutes. Pour le kit d'ABI, le premier mélange ajouté à l'ARN est composé de 2 µL de « random primers », 2 µL du tampon 10X RT, 0,8 µL de dNTP 25X (100mM) et 1 µL de l'enzyme « MultiScribe reverse transcriptase ». Le volume est ajusté avec de l'eau « nuclease free » pour un volume final de 20µL. La synthèse de l'ADNc se fait au thermocycleur suivant un cycle de 10 min à 25°C, 120 min à 37°C et 5 min à 85°C.

10.Réactions en chaîne par polymérisation

La réaction de la PCR «Polymerase Chain Reaction » est une technique qui nous permet à partir d'un fragment d'ADN, et grâce à l'amplification enzymatique de la Taq polymérase, d'obtenir un grand nombre (des millions) de copies identiques au fragment d'ADN initialement ciblé par des amorces sélectionnées. Plusieurs kits de PCR ont été utilisés dans ce travail, dont celui de Qiagen « HotStar HiFidelity PCR » (cat. no. 202602) et d'Invitrogen « Taq Platinum Polymerase High fidelity » (cat. no.11304-011) pour l'amplification des ADN génomiques et des ADNc. Pour le Kit Qiagen « HotStar HiFidelity PCR », la quantité d'ADN requise est entre 10 et 100 ng et les amorces sont utilisées à une concentration de 5 µM (10 µL). Le tampon PCR 5X HotStar HiFidelity (10 µL) ainsi que 1 µL d'enzyme HotStar HiFidelity ADN polymérase sont ajoutés dans la réaction et on ajuste au volume final de 50 µL. Le cycle utilisé au thermocycleur est le suivant : 5 minutes de dénaturation, 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant 15 secondes,

hybridation à 55-60°C pendant 1 minute et extension à 72°C ou 68°C pendant 1 minute par Kb de produit à amplifier. Une étape finale d'extension de 10 minutes à 72°C est ajoutée après les 35 à 40 cycles.

Pour la PCR de High Fidelity d'Invitrogen, la quantité d'ADN utilisée est de 100 ng et les amorces sont utilisées (1 µL) à une concentration de 10 µM, plus 5 µL du tampon de PCR 10X High Fidelity, 1 µL du mélange de dNTP à 10mM, 2 µL de MgSO₄ à 50mM ainsi que 0,2 µL de l'enzyme Platinum Taq High Fidelity. On ajuste le volume final jusqu'à 50 µl. Le cycle utilisé au thermocycleur est le suivant : un cycle de 2 min de dénaturation, 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, hybridation à 60°C pendant 30 secondes et extension à 68°C pendant 3 min. Une étape finale d'extension à 68°C pendant 10 min est ajoutée. Les produits de PCRs peuvent être mis sur gel directement ou conservés à 4°C ou à -20°C si on veut les garder plus longtemps.

11. Réactions de la transcription inverse - réaction en chaîne par polymérisation

La RT-PCR « Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction » est une réaction d'amplification de PCR qui se fait après la transcription inverse d'un ARN en ADN complémentaire (ADNc). Durant ce projet, plusieurs kits de RT-PCR en une seule étape ont été utilisés dont celui de QIAGEN « OneStep RT-PCR » (Kit no Catalog. 210212) et celui de Invitrogen « OneStep RT-PCR » (Kit no Catalog.12574-026). Pour le kit de QIAGEN, la transcription reverse se fait à 55°C pendant 30 minutes pour l'obtention de l'ADNc à partir de l'ARN. Par la suite l'amplification de cet ADNc, précisément de la région ou du gène d'intérêt, se fait par PCR grâce aux amorces choisies. La PCR est initialement activée par une pré-étape d'échauffement de 15 minutes à 95°C, où l'enzyme HotStarTaq ADN Polymerase est activée, les transcriptases réverses sont inactivées, et l'ADNc est dénaturé. Par la suite, trois étapes vont se répéter en cycle afin d'assurer l'amplification : la dénaturation de l'ADN et des amorces d'une durée de 30-60 secondes à 94°C, l'alignement de l'ADN et des amorces 30-60 secondes à 50-68°C (approximativement 5°C en bas de la température de fusion T_m (melting temperature) des amorces; l'équation utilisée pour le calcul de la T_m est la suivante : (nombre de A+T) x 2 + (nombre de C+G) x 4). Par la suite l'extension qui dure une minute à 72°C pour les

produits de RT-PCR de 1–2 kb. Le nombre de cycles est entre 25 à 40 selon la quantité initiale d'ARN ainsi que l'abondance du transcrite ciblé dans l'échantillon (en moyenne 35 cycles). Une extension finale de 10 min à 72°C est ajoutée. La quantité d'ARN utilisé dans la réaction est de 0.01 pg à 1 µg pour Invitrogen et 1 pg à 2 µg pour Qiagen. La concentration des amorces diffère aussi pour les deux kits utilisés, soit 0.6 µM pour le kit de Qiagen et 10 µM pour celui d'Invitrogen.

12. Amplification rapide des extrémités 3' des acides déoxyribonucléiques complémentaires - réaction en chaîne par polymérisation

La technique RACE « Rapid Amplification of cDNA Ends » est conçue pour l'isolation et la caractérisation des parties 3' ou 5' des ARNm où l'une des deux extrémités 5' ou 3' est inconnue. C'est la technique de choix pour l'identification de nouveaux gènes de fusion lorsque l'un des deux gènes partenaires est connu. Elle est aussi utilisée pour l'identification de gènes lorsque de fortes homologues de séquences sont conservées entre différentes espèces. La 3' RACE PCR (Invitrogen Catalog no. 18373-019) convertit les ARNm en ADNc en utilisant la transcriptase reverse et l'amorce oligo-dT ou AP «Adapter primer». Les ADNc sont donc obtenus du sens 3' vers la queue poly(A). L'ajout de la RNase H va dégrader l'ARNm en hétéroduplexe avec l'ADNc. L'ADN spécifique est par la suite amplifié en utilisant deux amorces, l'amorce spécifique choisie, GSP «gene-specific primer» et l'amorce universelle d'amplification, UAP «Universal Amplification Primer» ou AUAP «Abridged Universal Amplification Primer» qui reconnaît une partie de la première amorce utilisée AP dans la queue poly(A). Le choix de l'amorce GSP est important, il faut qu'elle soit spécifique et corresponde aux normes minimales pour une amplification ciblée. Une fois que l'ADNc est synthétisé par l'enzyme SuperScript™ II avec l'amorce GSP1 et l'amorce universelle, on réamplifie en PCR nichée avec une amorce spécifique nichée «nested GSP» ainsi que l'amorce universelle.

La quantité d'ARN total utilisée pour synthétiser l'ADNc est de 5 µg pour un volume total de 11 µl où l'on met 10X PCR buffer 25 mM MgCl₂, 10 mM dNTP mix, 0.1 M DTT ainsi que l'amorce AP à une concentration finale de 500 nM. Le tout est incubé à 42°C pour 2 à 5 min, suivi par l'ajout de 1 µl de SuperScript™ II RT pour une incubation à 42°C pendant

50 min et une incubation à 70°C pendant 15 min pour l'arrêt de la réaction. Un volume de 1 µl de RNase H est rajouté pour une incubation de 20 min à 37°C avant d'entamer la procédure du deuxième protocole pour l'amplification de l'ADNc cible. Pour l'amplification par PCR, seulement 2 µl d'ADNc synthétisé est utilisé par réaction, qui contient aussi l'amorce spécifique GSP et l'amorce universelle AUAP. Le kit de PCR utilisé pour l'amplification des ADNc de la RACE-PCR est la PCR à haute fidélité de Qiagen « HotStar HiFidelity Polymerase Kit » (Qiagen Catalog no. 202602). Brièvement, 10 à 100 ng d'ADNc, 10 µL de tampon PCR 5X HotStar HiFidelity, 10 µL d'amorces à 5 µM (concentration finale des amorces sens et anti-sens à 0.2 µM) sont utilisés dans la réaction. Finalement, 1 µL d'enzyme HotStar HiFidelity ADN polymérase est rajouté et le volume final de la réaction est ajusté à 50 µL. Au thermocycleur les conditions d'amplification sont les suivantes: une première étape de « HotStar » de 5 min à 95°C, suivi de 35 à 40 cycles de dénaturation à 94°C pendant 15 secondes, hybridation à 55-60°C pendant 1 minute et extension à 72°C ou 68°C pendant 1 minute par Kb à amplifier. La réaction se termine par une étape d'extension finale de 10 minutes à 72°C.

Tous les produits de PCR, RT-PCR et RACE-PCR sont mis sur gel d'agarose pour électrophorèse et pour visualisation et extraction. La conservation de ces produits à court terme se fait à 4°C et à long terme à -20°C.

Tableau V. Liste des amorces utilisées dans ce projet.

Code	Gènes	Exons	Séquences 5'-3' des amorces
<i>t(1;21)(p36.3;q11.2)/RUNX1-PRDM16</i>			
1.1	<i>RUNX1</i>	Exon 4 fr	CTAGGGGATGTTCCAGATGG
1.2	<i>RUNX1</i>	Exon 5 fr	TGTCGGTCGAAGTGGAAGAGG
1.3	<i>RUNX1</i>	Exon 6 fr	CCTCCCTGAACCACTCCACT
2.1	<i>PRDM16</i>	Exon 2 rev	AAGTCTGCTGGGATCGGAA
2.2	<i>PRDM16</i>	Exon 3 rev	CCTTCCTGGGGCGACACTTCC
2.3	<i>PRDM16</i>	Exon 4 rev	CGCCACACGGATGTACTTGAG
<i>t(7;17)(p15;q22)/MSI2-HOXA9/MSI2-HOXA10/MSI2-HOXA11</i>			
130	<i>MSI2</i>	Exon4 fr	TTC GCA GAC CCA GCA AGT GTA GAT
131	<i>MSI2</i>	Exon9 rev	TCC CAG GTG GGA ACA TGA CTT CTT
132	<i>MSI2</i>	Exon3 fr	TGAGAGATCCCACTACGAAACGCT
133	<i>MSI2</i>	Exon9 fr	AGC CGA AAG AAG TCA TGT TCC CAC
135	<i>MSI2</i>	Exon2 fr	ATGTTTATCGGTGGACTGAGCTGG
137	<i>HOXA9</i>	Exon1 fr	AAC TAC TAC GTG GAC TCG TTC CTG
138	<i>HOXA9</i>	Exon1 rev	GCC GCT CTC ATT CTC AGC ATT GTT
139	<i>HOXA9</i>	Exon3 rev	GCC CAA ATG GCA TCA CTC GTC TTT
140	<i>HOXA10</i>	Exon3 rev	ACT CTT TCT CCA GTT CCA GGG TCT
353	<i>HOXA5</i>	Exon2 rev	TTT CAA TCC TCC TTC TGC GGG TCA
355	<i>HOXA6</i>	Exon 2 rev	GCT GCG TGG AAT TGA TGA GCT TGT
357	<i>HOXA7</i>	Exon2 rev	AGA TCT TAA TCT GGC GCT CGG TGA
358	<i>HOXA10</i>	Exon 2 rev	AAA GTC AGA ACA AAC CAG CCC TGC
361	<i>HOXA11</i>	Exon 2 rev	CAG TTG CAG GCG CTT CTC TTT GTT
365	<i>HOXA13</i>	Exon2 rev	TGT AGC CTG AAA GGT TCA GCT GGT
<i>locus HOXA</i>			
350	<i>HOXA4</i>	Exon1 fr	AAC TAC ATC GAG CCC AAG TTC CCT
351	<i>HOXA4</i>	Exon1 rev	TAA CGG CGC TGA CAT GGA TCT TCT
352	<i>HOXA5</i>	Exon1 fr	TAC AAT GGC ATG GAT CTC AGC GTC
353	<i>HOXA5</i>	Exon2 rev	TTT CAA TCC TCC TTC TGC GGG TCA
354	<i>HOXA6</i>	Exon1 fr	TTT ACC CTT GGA TGC AGC GGA TGA
355	<i>HOXA6</i>	Exon 2 rev	GCT GCG TGG AAT TGA TGA GCT TGT
356	<i>HOXA7</i>	Exon1 fr	TCG ACC GTT CCG GGC TTA TAC AAT
357	<i>HOXA7</i>	Exon2 rev	AGA TCT TAA TCT GGC GCT CGG TGA
137	<i>HOXA9</i>	Exon1 fr	AAC TAC TAC GTG GAC TCG TTC CTG
138	<i>HOXA9</i>	Exon1 rev	GCC GCT CTC ATT CTC AGC ATT GTT
358	<i>HOXA10</i>	Exon 2 rev	AAA GTC AGA ACA AAC CAG CCC TGC
359	<i>HOXA10</i>	Exon1a fr	TTA AAG CAA CGC GCA TTC GCT AGG
360	<i>HOXA11</i>	Exon1 fr	TTT CTA TAG CAC CGT GGG CAG GAA

361	<i>HOXA11</i>	Exon 2 rev	CAG TTG CAG GCG CTT CTC TTT GTT
362	<i>HOXA13</i>	Exon1b fr	TAA GGA GTT CGC CTT CTA CCA CCA
363	<i>HOXA13</i>	Exon 1a fr	CGA CGA GCT CAA CAA GAA CAT GGA
364	<i>HOXA13</i>	Exon2 fr	ACG CTT CAG AAC TCG TTG CTT TGC
365	<i>HOXA13</i>	Exon2 rev	TGT AGC CTG AAA GGT TCA GCT GGT
<i>t(8;17)(q11.23;q22)/MSI2-SOX17</i>			
130	<i>MSI2</i>	Exon4 fr	TTC GCA GAC CCA GCA AGT GTA GAT
131	<i>MSI2</i>	Exon9 rev	TCC CAG GTG GGA ACA TGA CTT CTT
132	<i>MSI2</i>	Exon3 fr	TGAGAGATCCCACTACGAAACGCT
133	<i>MSI2</i>	Exon9 fr	AGC CGA AAG AAG TCA TGT TCC CAC
135	<i>MSI2</i>	Exon2 fr	ATGTTTATCGGTGGACTGAGCTGG
141	<i>SOX17</i>	Exon1 fr	TTT CAT GGT GTG GGC TAA GGA CGA
142	<i>SOX17</i>	Exon2 rev	GCT TGC ACA CGA AGT GCA GAT ACT
143	<i>SOX17</i>	Exon1 rev	TCG TCC TTA GCC CAC ACC ATG AAA
144	<i>SOX17</i>	Exon1 fr	TTG AGC AAG ATG CTG GGC AAG T
161	<i>SOX17</i>	Exon2 rev	AGT GTG TAA CAC TGC TTC TGG CCT
162	<i>SOX17</i>	Exon2 rev	ATC TTA AAC CCA GCG ATG CTT GCC
163	<i>SOX17</i>	Exon2 rev	GCT TGC CAC TTC CCA AGG TGT AAA
<i>t(2;12)(q31.1;p12)/ETV6-HOXD</i>			
183	<i>HOXD11</i>	exon2 rev	ACT GCA GAC GGT CTC TGT TCA GTT
184	<i>HOXD11</i>	exon2 rev	TTG ACC GTG GGA AGG AAT CGT GAA
185	<i>HOXD11</i>	exon1 fr	TAG CAA GCC TTC GTT CCT TTC CCA
186	<i>HOXD11</i>	exon2 rev	TTT GAC TTG CCG GTC AGT GAG GTT
187	<i>HOXD13</i>	exon2 rev	TGT CCG GCT GAT TTA GAG CCA CAT
188	<i>HOXD13</i>	exon2 rev	AAG CTG CAG TTT GGT GTA AGG CAC
189	<i>HOXD13</i>	exon2 rev	TTC TAA GCT GTC TGT GGC CAA CCT
190	<i>HOXD13</i>	exon1 fr	GCT TAC AGC AGA ATG CGC TCA AGT
191	<i>ETV6</i>	exon1 fr	ATG TCT GAG ACT CCT GCT CAG TGT
192	<i>ETV6</i>	exon2 fr	ATA TAC ACC TCC AGA GAG CCC AGT
193	<i>ETV6</i>	exon3 fr	TTG CAG CCA ATT TAC TGG AGC AGG
194	<i>ETV6</i>	exon4 fr	TTC TGA AGC AGA GGA AAC CTC GGA
195	<i>ETV6</i>	exon5 fr	ATC ACG ACA AAT CAC CGG CCT TCT
196	<i>ETV6</i>	exon3 rev	AGC GAA AGT CCT CTT TGG TCA GCA
197	<i>ETV6</i>	exon4 rev	TAT GAC CTC CGG CTG TGT GTG TAT
198	<i>ETV6</i>	exon5 rev	CAA CAG TTC AAT GGT GGG AGG GTT
199	<i>ETV6</i>	exon6 rev	AGG ACG CTG GGC AGT GAT TAT TCT
<i>locus HOXD</i>			
329	<i>HOXD8</i>	Exon1 fr	GTT TGT AAA CCG AGG CCA GAG TGT
330	<i>HOXD8</i>	Exon1 rev	TAC AGC GGG TTC ACG AAG TAC GAA
333	<i>HOXD9</i>	Exon1 fr	AAA TGT CTT CCA GTG GCA CCC TCA

335	<i>HOXD9</i>	Exon2 fr	TCC TTT GTG GGT GTT TGG TGC TTG
336	<i>HOXD9</i>	Exon2 rev	TGT CGC TCT GCC TTC ATT CTT GGA
339	<i>HOXD10</i>	Exon2 fr	TGG CAG AAA GAA GAG GTG CCC TTA
340	<i>HOXD10</i>	Exon2 rev	TTG CTG GAT GGA TGG ATG GAT GGA
184	<i>HOXD11</i>	Exon2 rev	TTG ACC GTG GGA AGG AAT CGT GAA
185	<i>HOXD11</i>	Exon1 fr	TAG CAA GCC TTC GTT CCT TTC CCA
341	<i>HOXD12</i>	Exon1 fr	TGA ATC TGC AGT CGC CAG ACT CTT
343	<i>HOXD12</i>	Exon2 rev	TGG ACA ATT CCT TGC GTT TCT GCC
344	<i>EVX2</i>	Exon1 fr	TTT GAC CAG TCA TTC CCT CGC TCT
346	<i>EVX2</i>	Exon3 rev	CGT GCG TCA TCA TGT AGG TGT AGA
Amorces des gènes contrôles et de la RACE-PCR			
210	<i>ACTB</i> (<i>b-actin</i>)	Exon3 fr	ACCAACTGGGACGACATGGAGAAA
211	<i>ACTB</i> (<i>b-actin</i>)	Exon4 rev	TAGCACAGCCTGGATAGCAACGTA
235	AP		GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT
236	UAP		CUACUACUACUAGGCCACGCGTCGACTAGTAC
237	AUAP		GGCCACGCGTCGACTAGTAC

Tableau V: Liste des amorces utilisées dans ce projet. Les amorces ont été choisies à l'aide du site IDT « Integrated DNA Technologies » <http://www.idtdna.com/site> en respectant la longueur optimale de 20 à 30 nucléotides, la température de 55 à 60°C ainsi que le pourcentage de nucléotides CG. Chaque amorce est ensuite testée pour vérifier si elle est spécifique à la séquence d'intérêt à l'aide du site <http://genome.ucsc.edu/>. fr «forward» : amorces sens ; rev «reverse» : amorces anti-sens.

13. Extraction des acides déoxyribonucléiques à partir d'un gel d'agarose

Une fois les PCR terminées, la migration des produits de PCR est effectuée sur un gel d'Agarose à 2% auquel le bromure d'éthidium est ajouté pour visualiser les bandes d'ADN. Nous rajoutons également le tampon de charge (bleu bromophénol), ce qui permet de suivre l'avancement de la migration électrophorétique sur le gel d'agarose. Une fois la migration complétée, on coupe les bandes d'ADN du gel. Le kit utilisé pour l'extraction de l'ADN des produits de PCR est celui de Qiagen : QIAEX II (cat. no. 20021). Un volume de solution QX1 qui dépend du poids net de la bande coupée et 10 µL de la solution QIAEX II sont ajoutés pour ≤ 2µg d'ADN. Les tubes sont chauffés à 50°C pendant 10 min

en présence de la solution QX1 à forte teneur en sels. Ceci permet la dissolution de l'agarose et la libération de l'ADN qui va se lier aux particules de silices. Une fois en contact avec une solution à faible teneur en sels (eau DIUF), l'ADN est libéré. Auparavant, les billes sont récupérées par centrifugation et lavées une fois avec la solution QX1 et deux fois avec le tampon PE. Nous séchons les tubes et nous incubons à température pièce pendant 5 minutes dans 15 à 20 μ L d'eau DIUF à pH 7.0 à 8.5.

14. Séquençage de type Sanger

Les échantillons ont été séquencés à la plateforme de génomique de l'IRIC et le séquençage a été effectué avec l'appareil d'Applied Biosystems (ABI 3730) qui repose sur la méthode de Sanger. Suite à la fixation de l'amorce spécifique au fragment à séquencer (notre échantillon d'ADN), l'élongation s'effectue grâce à l'ADN polymérase en incorporant les quatre déoxynucléotides et des ddNTPs (didéoxynucléotides) ajoutés. Les ddNTPs présents dans le milieu vont empêcher la liaison phosphodiester avec le nucléotide suivant (extrémité 3'OH remplacée par 3'H) ce qui va interrompre l'élongation. En effet, l'absence de l'atome d'oxygène en 3' empêche la formation d'une nouvelle liaison phosphodiester. Cela permet d'avoir un mélange de fragments d'ADN de tailles croissantes. La détection des fragments synthétisés se fait en incorporant des traceurs fluorescents attachés aux différents ddNTPs (ddATP, ddTTP, ddGTP et ddCTP). Les fragments d'ADN synthétisés portent un fluorophore terminal appelé terminateur d'élongation ou « BigDye Terminator ». Il y a plusieurs structures de ddNTP fluorescents : 6-TAMRA-ddTTP, 6-FAM-ddATP, 5-TET-ddCTP, 5-HEX-deaza-ddGTTP. Les différentes fluorescences sont captées et décryptées en chromatogramme correspondant à la séquence de l'ADN étudié. Les réactifs utilisés pour la réaction de séquençage sont la solution de séquençage « BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit » contenant les dNTPs et les ddNTPs, le tampon de réaction ainsi que le produit de PCR purifié et l'amorce spécifique de ce produit. Pour la réaction de séquençage sur les appareils ABI, le programme est de 25 cycles avec les températures suivantes : 96°C (pré-réchauffement), 50°C (hybridation), 60°C (élongation) d'une durée de 10 secondes, 5 secondes, 1 minute et 15 secondes respectivement. Suite à la purification et la précipitation par éthanol/acétate de

sodium, les produits sont resuspendus dans une solution d'injection et sont prêts à passer dans le séquenceur.

15. La PCR quantitative en temps réel

La PCR quantitative en temps réel (qPCR) est basée sur la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent ou «reporter» pendant le processus d'amplification. L'augmentation du signal d'émission fluorescente est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits durant la réaction. Il existe deux principes généraux pour la détection quantitative des amplicons : les agents se liant à l'ADN double brin (ex. SYBR Green I) et les sondes fluorescentes. Pour cette dernière catégorie, plusieurs technologies existent dont les sondes TaqMan® que nous avons utilisées pour notre projet. Cette étude de qPCR a été effectuée en collaboration avec l'équipe de la plate-forme de génomique de l'IRIC.

Deux amorces (une amorce sens qui se fixe sur le brin négatif et une amorce antisens qui se fixe sur le brin positif) sont nécessaires à l'amplification. A l'extrémité 5' de la sonde TaqMan se trouve un fluorochrome (reporter) et à son extrémité 3' se trouve un groupement « quencher ». Lorsque le fluorochrome et le quencher sont proches, la fluorescence est absorbée par le quencher. Durant l'étape d'élongation de la PCR, il y a séparation du fluorochrome de la sonde suite à l'activité 5'-3' exonucléase de la polymérase thermostable qui dégrade la sonde grâce à son activité 5'exonucléase. Cette hydrolyse permet le relâchement du reporter ce qui produit l'émission de la fluorescence qui sera captée à chaque cycle d'amplification. Avant la procédure, il est important d'effectuer une courbe standard pour chaque essai de qPCR. Cette courbe sert à vérifier l'efficacité de la réaction en utilisant une série de dilutions d'un ADNc universel ou spécifique, testées en duplicata.

La quantification relative de *PRDMI6* a été réalisée par qPCR, grâce au système de détection de séquence ABI Prism 7900HT. Brièvement, les valeurs CT (Threshold Cycle) de *PRDMI6* ont été normalisées aux valeurs CT d'un gène contrôle, le *GAPDH*. Le CT étant le cycle seuil représentant le nombre de cycles requis où le signal d'émission de fluorescence est significativement plus élevé que le signal résiduel. La normalisation par rapport au *GAPDH* est représentée par la mesure « delta Ct » ($\Delta C_T = C_{T\ PRDMI6} - C_{T\ GAPDH}$) qui est comparée à un calibrateur en utilisant la mesure « delta delta Ct » ($\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$

échantillon - $\Delta C_{T \text{ calibrateur}}$). Le calibrateur utilisé dans notre étude est la valeur moyenne des C_t de quatre échantillons de moelle normale. La variation du nombre de copies du gène cible *PRDM16* est représentée par la valeur RQ (Relative quantity) qui est égale à $2^{-\Delta\Delta C_T}$. L'efficacité pour chaque essai est calculée à partir de la pente de la courbe: $E = [10^{(-1/\text{pente})}] - 1$.

Pour l'étude de l'expression de *PRDM16* chez la patiente 02H056 en LMC-PB, comparé à l'expression de *PRDM16* de la même patiente 00-H059 en PC-LMC, 3 essais d'expression TaqMan® ont été effectués. Les amorces ciblant l'exon 4 du gène contrôle, *GAPDH* correspondent à l'essai TaqMan® PN4326317E. Pour *PRDM16*, deux différentes quantifications ont été effectuées. Les amorces ciblant les exons 1 et 2 de *PRDM16* (Hs00922674_m1, ABI) ont été utilisées dans le premier essai, afin de discriminer entre l'expression de l'allèle normal de *PRDM16* et de l'allèle transloqué *RUNXI-PRDM16* puisque ce dernier ne contient pas l'exon 1. Dans le deuxième essai, les amorces ciblant les exons 9-10 de *PRDM16* (Hs00922679_m1, ABI) ont été utilisées pour détecter l'allèle transloqué et l'allèle normal.

La deuxième étude d'expression de *PRDM16* a été effectuée sur 105 échantillons avec des amorces ciblant l'exon 9-10 de *PRDM16* (Hs00922679_m1, ABI) et pour le gène contrôle, *GAPDH*, des amorces ciblant l'exon 4 (PN4326317E).

Pour la réaction de PCR, 25 à 50 ng d'ADNc ont été utilisés dans un volume total de 10µl comprenant le mélange universel «TaqMan® Universal Master Mix» ainsi que les essais TaqMan® d'expression des gènes (Applied Biosystems, USA). Le thermocycleur ABI Prism 7900HT SDS est programmé en une étape initiale de 2 min à 50°C et 10 min à 95°C, suivi par 40 cycles de 15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C. Toutes les réactions ont été effectuées en triplicata.

RÉSULTATS

1. Investigation de la translocation t(1;21)(p36.3;q22.1) en phase blastique de la leucémie myéloïde chronique (cas 02H056)

1.1. Présentation clinique et analyses cytogénétiques

La patiente de 60 ans se présente en avril 2000 avec une leucocytose, une thrombocytose et une hépatosplénomégalie. L'analyse cytogénétique standard et la biologie moléculaire ont confirmé le diagnostic de LMC avec présence d'un chromosome Philadelphie dans toutes les mitoses analysées ainsi que la fusion *BCR-ABL1* (transcrit b3a2) par RT-PCR. La patiente est mise sous IFN. À la 25^{ème} et 36^{ème} semaine, l'analyse FISH démontre une fusion *BCR-ABL1* à 40% et 29% respectivement, représentant une réponse cytogénétique majeure (MCyR) (Baccarani et al., 2009a). Après deux ans de traitement, la patiente demeure en phase chronique de la LMC. Dès que l'IM a été disponible en clinique, la patiente a été traitée avec une dose de 400 mg/jour. Malgré ce nouveau traitement, la patiente développe une neutropénie sévère avec une déviation gauche de la lignée myéloïde et les blastes représentent environ 10% de la cellularité, suggérant une accélération de la LMC. Après six mois de traitement, on note une thrombopénie sévère avec présence de 40% de blastes au frottis sanguin. Une aspiration médullaire a confirmé un diagnostic de LAM de type M1. En attente d'une allogreffe la patiente est traitée par chimiothérapie. Malheureusement, la patiente décède en janvier 2001 de plusieurs complications médicales dont une embolie pulmonaire.

Suite à la transformation blastique, le caryotype effectué sur les cellules sanguines a révélé une asymétrie au niveau des bras longs d'un chromosome 21 suggérant une délétion 21q comme anomalie additionnelle à la translocation t(9;22) dans les 20 métaphases analysées. La formule chromosomique est la suivante : 46,XX,t(9;22)(q34;q11.2),?del(21)(q22)[20] (Figure 8A.). Toutefois il est difficile de déterminer avec certitude si le chromosome 21 réarrangé résulte d'une délétion terminale ou interstitielle ou d'une translocation chromosomique cryptique. Afin de caractériser l'asymétrie du chromosome 21, des techniques de cytogénétique moléculaire ont été utilisées, dont le caryotype spectral qui a

révélé une translocation d'une portion des bras longs du chromosome 21 au niveau des bras courts du chromosome 1 (Figure 8C). Toutefois, la technique SKY ne nous a pas permis dans ce cas-ci de déterminer que la translocation chromosomique t(1;21) était réciproque. La réciprocité de la translocation t(1;21) a été confirmée par FISH avec une sonde localisée sur la bande chromosomique 1p36 qui a hybridé sur les chromosomes réarrangés 1 et 21 (résultats non démontrés).

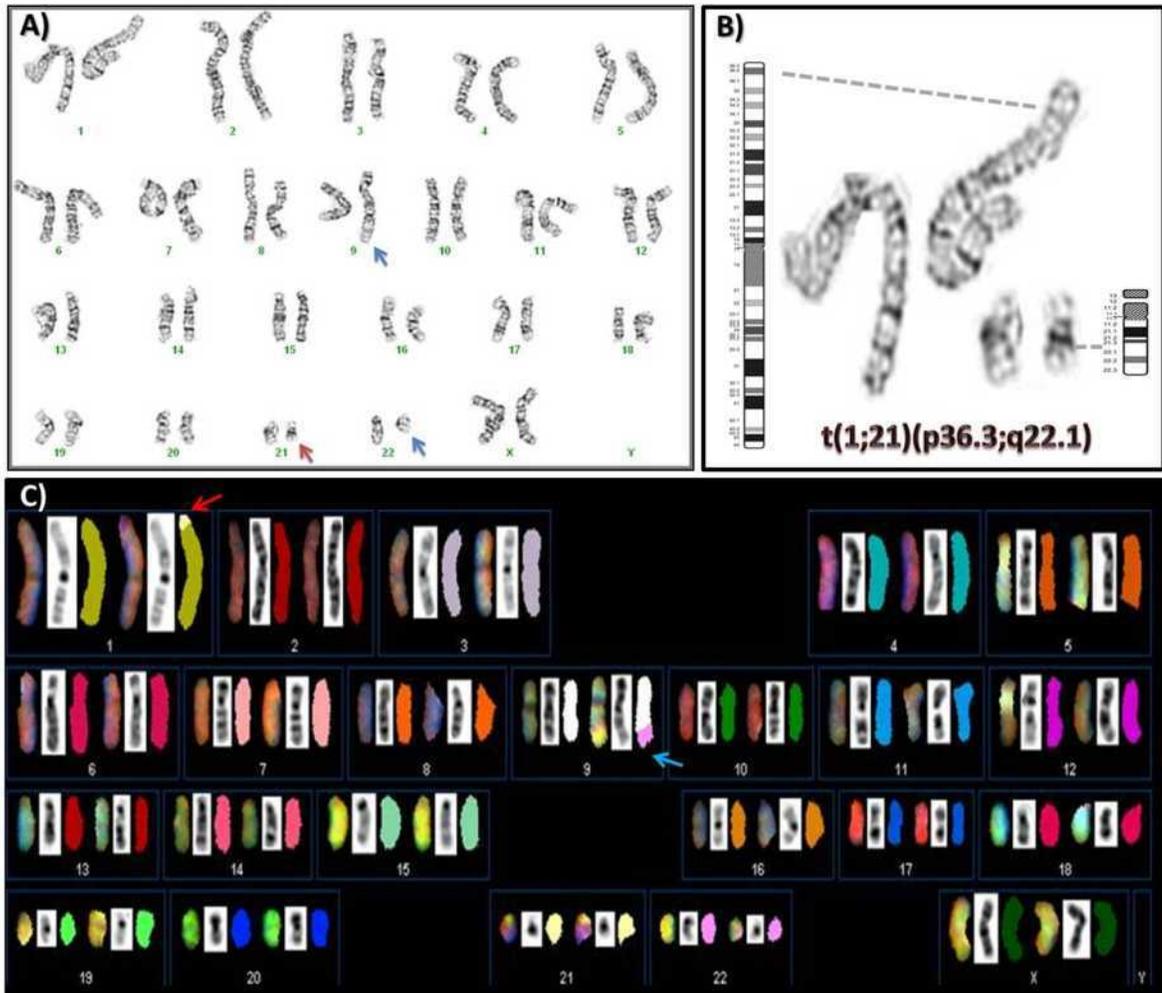


Figure 8. Caryotypes en bandes GTG et caryotype spectral révélant la présence des translocations chromosomiques t(9;22) et t(1;21) chez la patiente 02H056.

A) En bandes GTG le caryotype sur le prélèvement sanguin du cas 02H056 avec une leucémie myéloïde chronique en phase blastique révèle la présence d'une translocation chromosomique t(9;22)(q34.1;q11.2) (flèches bleues) ainsi qu'une asymétrie au niveau des bras longs du chromosome 21 (flèche rouge) suggérant une délétion ou une translocation chromosomique cryptique. **B)** Caryotype partiel et idiogrammes des chromosomes 1 et 21

suggérant des points de cassure au niveau des bandes 1p36.3 et 21q22.1. C) Le caryotype spectral (SKY) révèle la présence du dérivé 9 de la translocation t(9;22) (flèche bleue) ainsi que la présence d'un dérivé 1 d'une translocation chromosomique cryptique t(1;21), avec la peinture spécifique du chromosome 21 présente sur le chromosome dérivé 1, der(1) (flèche rouge).

1.2. Caractérisation du point de cassure sur la bande chromosomique 21q22.1 et identification du réarrangement du gène *RUNXI*

Le gène candidat au niveau de la bande chromosomique 21q22.1 est le facteur de transcription hématopoïétique *RUNXI/AML1* fréquemment réarrangé dans les leucémies aiguës (De Braekeleer et al., 2011a). Deux sondes qui couvrent le locus *RUNXI* ont été utilisées en FISH, soit la sonde *RUNXI/RUNXIT1* (Figure 9A) de taille 1.4 Mb et la sonde *ETV6/RUNXI* (Figure 9B) de taille 500 pb (Abbott Molecular, Des Plaines, IL). Les deux sondes ont révélé un réarrangement du locus *RUNXI*. Afin de préciser le point de cassure au niveau du gène, deux BACs couvrant *RUNXI* ont été utilisés. Le BAC RP11-771C10 couvrant l'intron 6 à l'exon 8 du gène *RUNXI* a révélé une position télomérique du point de cassure par rapport à la région couverte par la sonde, puisque le signal d'hybridation est resté sur le der(21) (Figure 9C). L'utilisation du deuxième BAC, RP11-229D9 a révélé un point de cassure entre l'intron 1 et l'exon 8 du gène *RUNXI* (Figure 9D).

1.3. Caractérisation du point de cassure sur la bande chromosomique 1p36.3 et identification du réarrangement du gène *PRDM16*

L'analyse cytogénétique de la translocation t(1;21) a montré un point de cassure en 1p36.3 (Figure 8B). La bande 1p36.3 d'environ 7Mb peut être subdivisée en 3 sous-bandes : 1p36.31, 1p36.32 et 1p36.33 et comprend une centaine de gènes. Parmi les gènes candidats on note le gène *TP73* en 1p36.32 impliqué dans différents cancers incluant les hémopathies malignes (Alexandrova and Moll, 2012; Bisso et al., 2011; Boominathan, 2007). La FISH avec la sonde LSI 1p36 (Figure 10) montre que le gène *TP73* n'est pas réarrangé et nous

indique une position télomérique du point de cassure (Figure 10). Au niveau de la sous-bande chromosomique 1p36.33, les analyses en FISH effectuées avec le BAC RP11-421C4 et le PAC RP1-283E3 ont démontré un point de cassure centromérique aux deux *loci* étudiés par ces sondes (Figure 10). Ces résultats nous ont permis de réduire la région à investiguer à moins de 2 Mb entre les *loci* *TP73* en 1p36.32 et la kinase *NADK* en 1p36.33 (Figure 10). Dans cette région, nous avons utilisé deux PACs pour cibler le gène candidat *PRDM16/MEL1*, un gène surexprimé dans les LAMs et les SMDs en présence de la translocation chromosomique t(1;3)(p36.32;q21) (Lahortiga et al., 2004; Mochizuki et al., 2000; Nishikata et al., 2003; Xinh et al., 2003). Le PAC RP4-785P20 couvre l'intron 3 jusqu'au dernier exon de *PRDM16* (exon 17) et le PAC RP1-163G9 couvre l'exon 1 et l'intron 1 du gène (Figure 11). L'hybridation avec le PAC RP4-785P20 a révélé que le point de cassure était télomérique à l'intron 3 de *PRDM16* et l'hybridation avec le PAC RP1-163G9 a confirmé un réarrangement de *PRDM16* avec un point de cassure au niveau de l'intron 1 (Figure 11). Ce résultat nous a permis d'identifier un nouveau gène partenaire de *RUNX1* dans la phase blastique de la LMC.

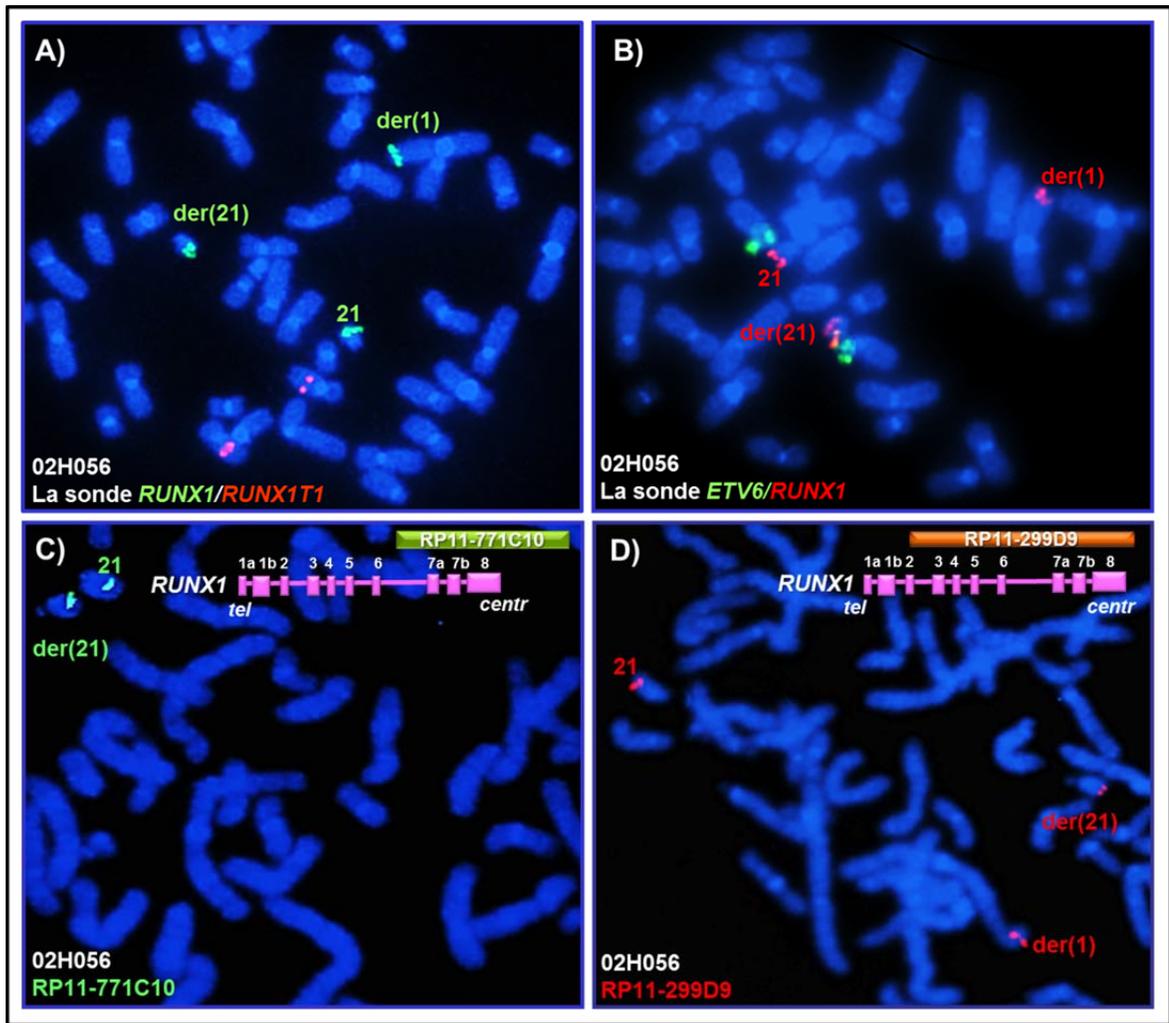


Figure 9. Identification du réarrangement du gène *RUNXI* par hybridation in situ en fluorescence dans la t(1;21)(p36.3;q11.2).

A) Analyse par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) sur métaphases des cellules sanguines du cas 02H056 avec la sonde *RUNXI/RUNXIT* (Abott) révélant un réarrangement du locus *RUNXI*. La sonde du locus *RUNXI* (couleur verte) hybride au niveau du chromosome 21 normal et des chromosomes réarrangés dérivés, der(1) et der(21). **B)** L'analyse en FISH avec la sonde *ETV6/RUNXI* (Abott) confirme aussi un réarrangement du locus *RUNXI*. La sonde du locus *RUNXI* (couleur orange) hybride au niveau du chromosome 21 et des chromosomes dérivés, der(21) et der(1). **C)** Analyse par FISH avec le BAC RP11-771C10 (couleur verte) couvrant les exons 6 à 8 du gène *RUNXI*, qui hybride sur le chromosome 21 normal et sur le chromosome dérivé der(21), indiquant une position télomérique du point de cassure. **D)** Analyse par FISH en utilisant le BAC

RP11-299D9 (couleur orange) indiquant un point de cassure entre les exons 2 et 8 du gène *RUNX1*. On note un signal sur le chromosome 21 normal et un signal réarrangé sur chacun des chromosomes dérivés der(21) et der(1).

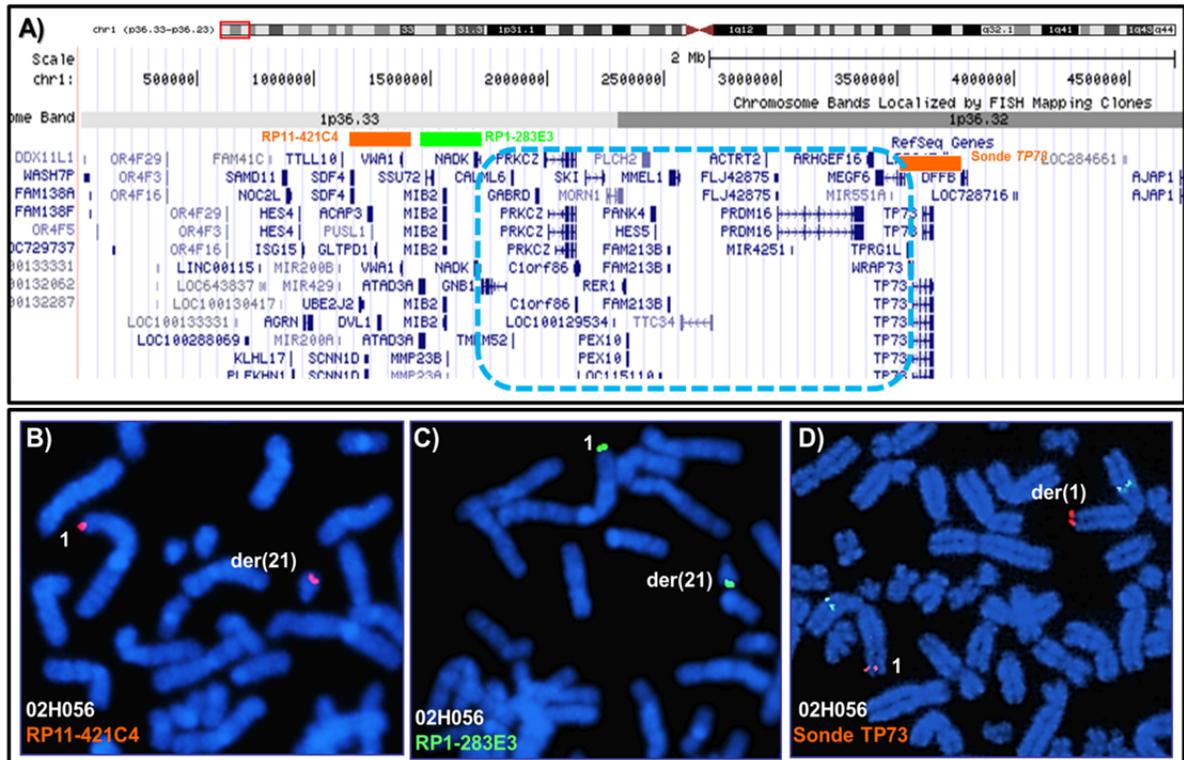


Figure 10. Délimitation de la région chromosomique 1p36.3 impliquée dans la translocation $t(1;21)(p36.3;q22.1)$ par hybridation in situ en fluorescence.

A) Localisation des sondes utilisées et des gènes au niveau des sous-bandes chromosomiques 1p36.33 et 1p36.32. **B)** et **C)** Hybridation in situ en fluorescence (FISH) sur chromosomes avec le BAC RP11-421C4 (couleur rouge) et le PAC RP1-283E3 (couleur verte) au niveau du chromosome 1 normal et du chromosome dérivé, der(21), indiquant une position centromérique du point de cassure. **D)** Analyse par FISH ciblant le locus *TP73* (couleur rouge) avec la sonde LSI 1p36 qui hybride aux niveaux du chromosome 1 normal et du chromosome réarrangé der(1), indiquant une position télomérique du point de cassure.

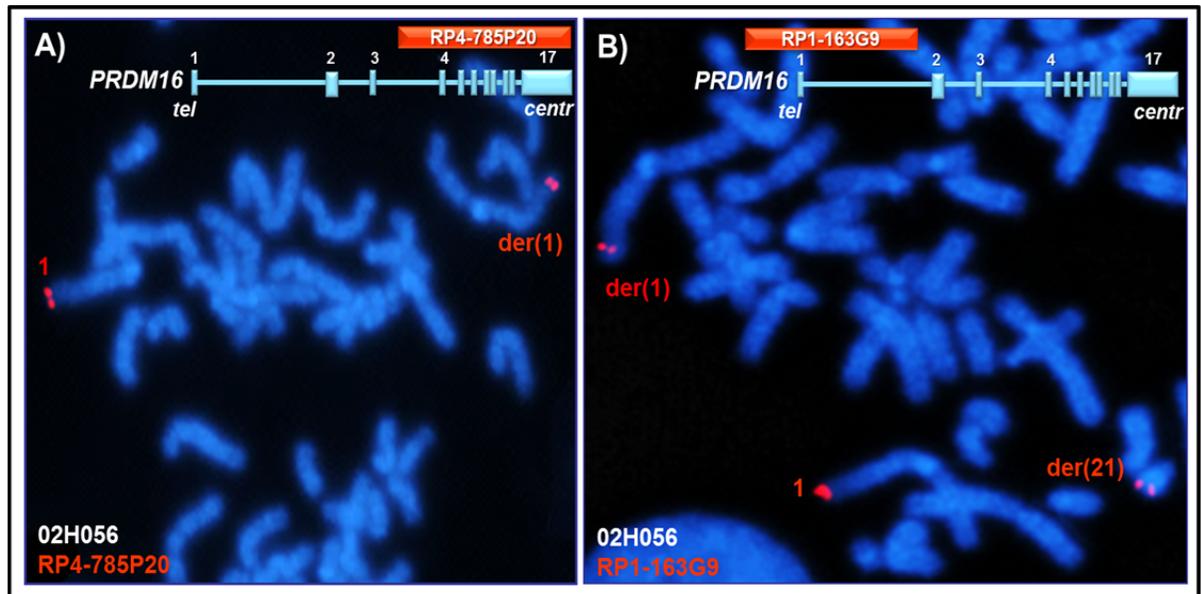


Figure 11. Identification du réarrangement du gène *PRDM16* par hybridation in situ en fluorescence dans la $t(1;21)(p36.3;q11.2)$.

A) Hybridation in situ en fluorescence (FISH) sur métaphases avec le PAC RP4-785P20 (couleur rouge), ciblant les exons 4 à 17 du gène *PRDM16*, qui hybride au niveau du chromosome 1 normal et du chromosome dérivé, der(1) indiquant une position télomérique du point de cassure. **B)** Analyse par FISH en utilisant le PAC RP1-163G9 (couleur orange) révélant un point de cassure dans l'intron 1 du gène *PRDM16*. On note un signal sur le chromosome 1 normal et un signal réarrangé sur chacun des chromosomes dérivés, der(1) et der(21).

1.4. Identification des transcrits de fusion *RUNX1-PRDM16*

Les résultats du FISH suggèrent fortement une fusion entre les deux gènes altérés *RUNX1* et *PRDM16*. L'orientation des deux gènes *PRDM16* et *RUNX1* est en direction 5'-3' par rapport au centromère. Suite à la translocation t(1;21), la partie 5' du gène *RUNX1* est déplacée sur le der(1) et fusionne avec la partie 3' du gène *PRDM16* (Figure 12A). La partie 5' du gène *PRDM16* est transloquée à la partie 3' du gène *RUNX1* sur le der(21), s'il n'y a pas de délétions accompagnant la translocation. Afin d'amplifier les fusions *RUNX1-PRDM16* et *PRDM16-RUNX1* potentiellement exprimées, plusieurs combinaisons d'amorces ont été utilisées en RT-PCR. Nous avons identifié 8 transcrits de fusion *RUNX1-PRDM16* parmi lesquels deux respectent le cadre de lecture avec des jonctions trinuécléotidiques AGT ou GGT donnant une arginine ou une guanine à cette position (Figure 12C). Dans la première jonction trinuécléotidique, l'exon 5 de *RUNX1* finissant avec le nucléotide A est fusionné à l'exon 2 de *PRDM16* débutant avec les deux nucléotides GT. Dans la deuxième jonction trinuécléotidique, l'exon 6 de *RUNX1* finissant avec le nucléotide G est fusionné à l'exon 2 de *PRDM16* débutant avec les deux nucléotides GT. Lors de l'épissage, le trinuécléotide formé dans la jonction exon 1- exon 2 de *PRDM16* sauvage est composé du dernier nucléotide de l'exon 1 et des deux premiers nucléotides de l'exon 2. Le nucléotide de l'exon 1 de *PRDM16* réarrangé est remplacé soit par le nucléotide A ou G de l'exon 5 ou 6 de *RUNX1*. Dans les six autres transcrits, le cadre de lecture est modifié menant à des formes tronquées de *RUNX1*. Le gène *RUNX1* est de 260 Kb et est composé de 10 exons (1a, 1b, 2, 3, 4, 5, 6, 7a, 7b et 8) (Mikhail et al., 2006). Il possède deux promoteurs P1 distal et P2 proximal, qui permettent l'expression de plusieurs transcrits dont les trois principaux sont le transcrit variant 3 (NM_001122607.1) *RUNX1a*, le transcrit variant 2 (NM_001001890.2) *RUNX1b* qui est le transcrit le plus exprimé et le transcrit variant 1 (NM_001754.4) *RUNX1c* (Mikhail et al., 2006). Le domaine conservé RHD « Runt Homology domain » de *RUNX1*, de 128 aa, est codé par les exons 3, 4 et 5 (Figure 13). Le RHD est présent dans les protéines issues des trois transcrits de *RUNX1*. Les deux transcrits *RUNX1b* et *RUNX1c* partagent également un autre domaine de régulation transcriptionnelle TAD « transactivation domain » codé par les exons 7b et 8 (Mikhail et al., 2006). Au niveau des six transcrits de fusion qui ne respectent pas le cadre de lecture dans la fusion *RUNX1-PRDM16*, les exons 1 à 6 de

RUNXI sont présents, ce qui suppose la présence du domaine RHD et l'absence du domaine TAD dans ces formes tronquées de *RUNXI*.

La séquence de *PRDM16* est présente en 3' des transcrits de fusion à partir des exons 2, 3 ou 4. *PRDM16* sauvage possède deux transcrits majeurs, soit le transcrit variant 1 (NM_022114.3) composé des exons 1 à 17a, et le transcrit variant 2 (NM_199454.2) qui possède également le même nombre d'exons. Le domaine PR « PRDI-BF1 and RIZ homology » de *PRDM16*, homologue au domaine SET « Su(var), Enhancer of zeste, Trithorax », est en 5' de la protéine. Plusieurs doigts de zinc (Zf-C2H2) sont présents et correspondent à deux domaines de liaison à l'ADN. En 3' de la protéine un domaine d'interaction avec CTBP1 (Figure 13) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/289547572?report=graphe> est également présent. Dans les fusions *RUNXI-PRDM16* respectant le cadre de lecture, on retrouve la quasi-totalité de *PRDM16* et la partie 5' de *RUNXI* avec son domaine RHD (Figure 13). Cependant les transcrits de fusion qui ne respectent pas le cadre de lecture mènent à des codons stop prématurés sans aucun domaine fonctionnel de *PRDM16* (Figure 13).

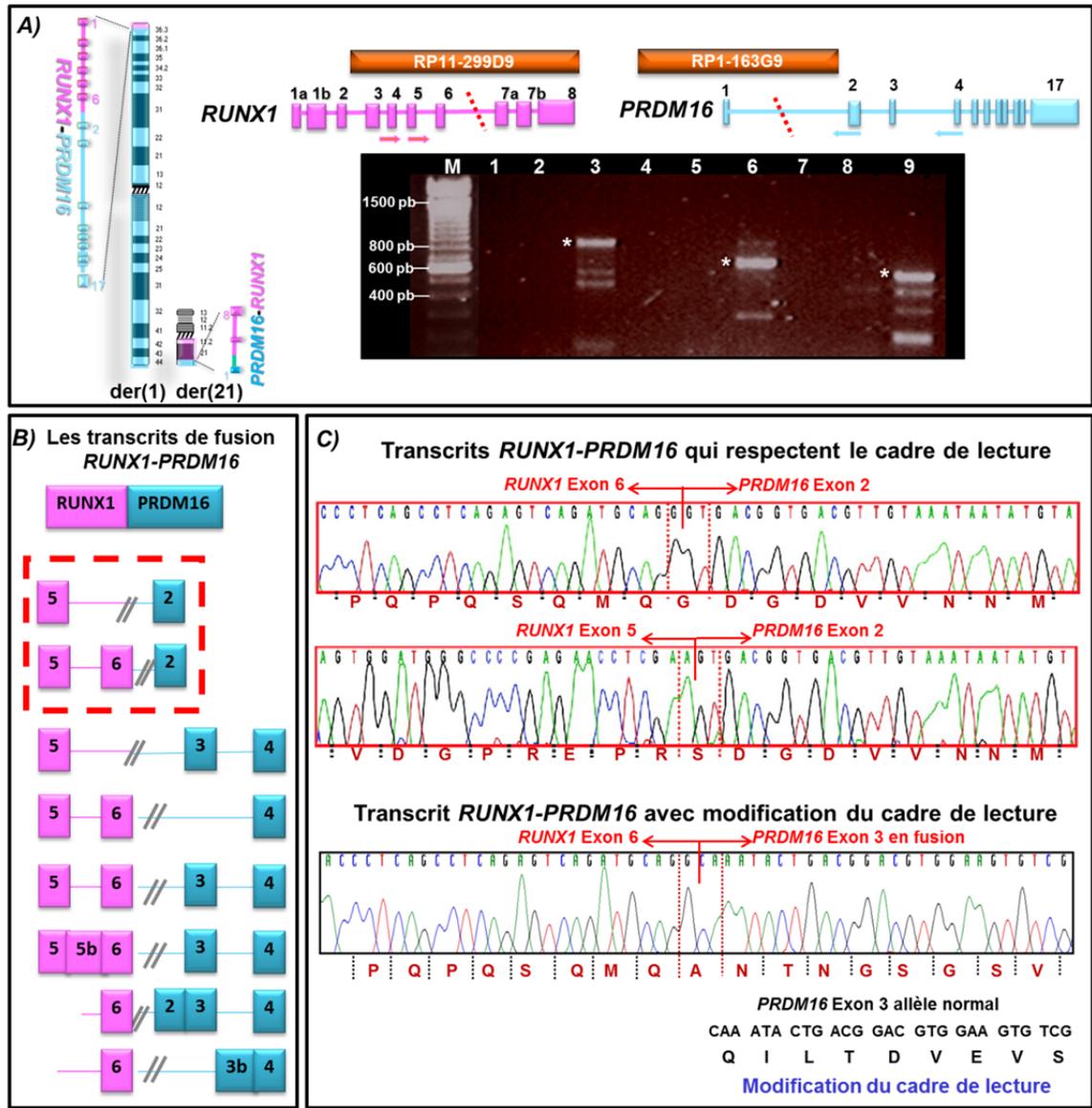


Figure 12. Identification des transcrits de fusions *RUNX1-PRDM16* dans la translocation t(1;21).

A) Les résultats de l'analyse FISH suggèrent une fusion de la partie 5' de *RUNX1* avec la partie 3' de *PRDM16* sur le chromosome dérivé, der (1) et une fusion potentielle de la partie 5' de *PRDM16* avec la partie 3' de *RUNX1* sur le chromosome dérivé, der(21). Le gel de bromure d'éthidium à 2% montrent plusieurs produits de fusion *RUNX1-PRDM16* amplifiés par RT-PCR à partir des cellules mononuclées du cas 02H056 présentant la t(1;21) en phase blastique de la leucémie myéloïde chronique (LMC-PB) en utilisant des amorces sens au niveau des exons 4 (amorce 1.1) et 5 (amorce 1.2) de *RUNX1* (flèches horizontales rouges) et des amorces antisens au niveau des exons 2 (amorce 2.1) et 4 (amorce 2.3) de *PRDM16* (flèches horizontales bleues). Les trois premiers puits

représentent les produits d'amplification obtenu avec les amorces *RUNXI* exon 4 sens et *PRDM16* exon 4 antisens (1 : contrôle sans ARN (H₂O), 2 : produit d'amplification obtenu à partir d'un échantillon de moelle d'un cas avec une LMC sans la t(1;21), 02H024, comme contrôle négatif, 3 : produit d'amplification obtenu à partir de l'échantillon de sang du cas 02H056 avec la t(1;21). Le produit principal (étoile) est de 778 pb (puits 3). Puits 4, 5 et 6 : produits d'amplification obtenus pour ces 3 mêmes échantillons avec les amorces *RUNXI* exon 5 sens et *PRDM16* exon 4 antisens. Le produit principal (étoile) est de 650 pb (puits 6). Puits 7, 8 et 9 : produits d'amplification obtenus avec les amorces *RUNXI* exon 4 sens et *PRDM16* exon 2 antisens. Le produit principal (étoile) est de 501 pb (puits 9). Le marqueur de poids moléculaire de taille 100 pb a été utilisé. **B)** Huit transcrits de fusion étudiés par séquençage confirment une fusion de l'exon 5 ou 6 de *RUNXI* avec les exons 2, 3 ou 3b de *PRDM16*. Seulement les transcrits de fusion encadrés en rouge respectent le cadre de lecture. **C)** Séquences partielles des transcrits de fusion qui respectent le cadre de lecture fusionnant l'exon 5 ou 6 de *RUNXI* avec l'exon 2 de *PRDM16*. Exemple de séquence partielle de la fusion *RUNXI-PRDM16* où le cadre de lecture est décalé avec fusion de l'exon 6 de *RUNXI* avec l'exon 3 de *PRDM16*.

A) Transcrit RUNX1 exon5 - PRDM16 exon2

```

ATG GCT TCA GAC AGC ATA TTT GAG TCA TTT CCT TCG TAC CCA CAG TGC TTC ATG AGA GAA TGC ATA CTT GGA
ATG AAT CCT TCT AGA GAC GTC CAC GAT GCC AGC ACG AGC CCG CCG TTC ACG CCG CCT TCC ACC GCG CTG AGC
CXA GGC AAG ATG AGC GAG GCG TTG CCG CTG GGC GCC CCG GAC GCC GGC GCT CCG CTG GCC GGC AAG CTG AGG
AGC GGC GAC CCG AGC ATT GTG GAG GTG CTG GCC CAC CCG GCG GAG GTG CTG CCG ACC GAC AGC CCC AAC
S G D R S M V E V L A D H P G E L V R T D S P N
TTC CTC TGC TCC CTG CTG CCT ACG GAC TGG CCG TGC AAC AAG ACC CTG CCG ACT GCT TTC AAG GTG GTG GCC
P L C S V L P T H W R C N K T L P I A F K V V A
CTA GGG GAT GTT CCA GAT GGC ACT CTG GTC ACT GTG ATG GCT GGC AAT GAT GAA AAC TAC TGG GCT GAG CTG
L G D V P D G T L V T V M A G N D E N Y S A E L
AGA AAT GCT ACC GCA GCC ATG AAG AAC CAG GTT GCA AGA TTT AAT GAC CTC AGG TTT GTC GGT CGA AGT GGA
R N A T A A M K N Q V A R F N D L R P V G R S G
AGA GGG AAA AGC TTC ACT CTG ACC ATC ACT GTC TTC ACA AAC CCA CCG CAA GTC GCC ACC TAC CAC AGA GCC
R G K S P T L T I T V P T N P P Q V A T Y H R A
ATC AAA ATC ACA GTG GAT GGG CCC CGA GAA CCT CGA AGT GAC GGT GAC GTT GTA AAT AAT ATG TAT GAG CCC
I K I T V D G F R E P R S D G D V V N N M Y E P
AAC CCG GAC CTG CTG GCC AGC CAC AGC CCG GAG GAC GAG GCC GAG GAC AGT GCC ATG TCG CCC ATC CCC GTG
GGG CCA CCG TCC CCC TTC CCC ACC AGC GAG GAC TTC ACC CCC AAG GAG GCG TCG CCG TAC GAC GCC CCT GTC
TAC ATT CCT GAA GAC ATT CCG ATC CCA GCA GAC TTC GAC CTC CGA GAG TCC TCC ATC CCA GGG GCT GGC CTG
Y I P E D I P I P A D F R L H E S S I T G A G
GGG TGG GGG AAG AAG AAG ATG GAA GCC GGG GAG AGG CTG GGC CCC TGC GTG GTG CCG GCG GCG GCG
G V W A K R R W N E A D E R L G P C V V Y P R A A
GCA AAG GAG ACA GAC TTC GGA TGG GAG CAA ATA CTG ACG GAC GTG GAA GTG TCG CCC CAG GAA GGC TGC ATC
A K E T D P D W E Q I L T D V E V S P Q E O C T
ACA AAG ATC TCC GAA GAC CTG GGC AGT GAG AAG TTC TGC GTG GAT GCA AAT CAG GCG GGG GCT GGC AGC TGG
F R I S F D L G S E K F C V D A R Q A D A D S M
CTC AAG TAC ATC CGT GTG GCG TGC TCC TGC GAT GAC CAG AAC CTC ACC ATG TGT CAG ATC AGT GAG CAG ATT
L K Y I R V A C S C D D Q N L T W C Q I S P Q
TAC TAT AAA GTC ATT AAG GAC ATT GAG CCA GGT GAG GAG CTG CTG GTG CAC GTG AAG GAA GGC GTC TAC CCC
Y Y K V I F D I E P G E P L L V E V K E Q V Y P
CTG GGC ACA GTG CCG CCC GGC CTG GAC GAG GAG CCC ACG TTC CCG TGT GAC GASTGT GAC GAA CTC TTC CAG
TCC AAG CTG GAC CTG CCG CCG CAT AAG AAG TAC ACG TGT GGC TCA GTG GGG GCT CCG CTC TAC GAG GGC CTG
GCT GAG GAG CTC AAG CCC GAG GGC CTT GGC GGT GGC AGC GGC CAA GCC CAC GAG TGC AAG GAC TGC GAG CCG
ATG TTC CCC AAC AAG TAC AGC CTG GAG CAG CAC ATG GTC ATC CAC ACG GAG GAG CCG GAG TAC AAA TGC CAG
CAG TGT CCC AAG GCC TTC AAG TGG AAG TCC AAC CTC ATC CCG CAC CAG ATG TCC CAG GAC AGC GGC AAA CCG
TTC GAA TGT GAA AAC TGC GTG AAG GTG TTC ACG GAC CCC AGC AAC CTT CAG CCG CAC ATC CCG TCG CAG CAG
GTG GGC GCT CCG GCC CAC GCC GGC GTC GGC GAG GAG
ATG GTC GTC AGC AGC CCG TTC ATA TGT GAT GTC TGC CAC AAG TCC TAC ACG GAC TTC TCC AAC
CTG TGC CCG CAG AAG CCG ATG CAC GCC GAC TGC CCG ACG GAG ATC AAG TCC AAG GAC TGT GGC CAG ATG TTT
AGC ACT ACC TCC TCC CCG AAC CAG CCG CCG TCC TCG GAG GGC AAG AAC CAT TAC ACG CCG GGC GGC ATC
TIT GCC CCG GCG CTG CCG TTT ACC CCC AGC CCC ATG ATG GAC AAG GCA AAA CCC TCC CCC AGC CTT AAT CAC
GCC AGC CTG GGC TTC AAC GAG TAC TTT CCG TCC ACG CCG CAC CCG GGG AGC CTG CCC TTC TCC ACG CCG CCT
CCC ACG TTC CCC GCA CTC ACC CCC GGC TTC CCG GGC ATC TTC CCT CCA TCC TTG TAC CCC CCG CCG CCT CTG
CTA CTT CCC ACA CTG CTG CTG CTC AAG AGC CCC CTG AAC CAC ACC CAG GAC GCC AAG CTC CCC AGT CCC CTG GGG
AAC CCA GCC CTG CCC CTG TCC GGC GTC AGC AAC AGC AGC CAG GGC ACC ACG GCA GCT GCG GGG CCC GAG
GAG AAG TTC GAG AGC CCG CTG GAG GAC TCC TGT GTG GAG AAG CTG AAG ACC AGG AGC AGC CAG ATG TCG GAG
GGC AGT GAC TTT GAG GAC GTC AAC ACC ACC ACG GGG ACC GAC CTG GAC ACG ACC ACG GGG ACG GGC TCG GAC
CTG GAC AGC GAC GTG GAC GAC CTT GAC AAG GAC AAG GGC AAG GGC AAG TCC GCC GAG GGC CAG CCC AAG
TIT GGG GGC GGC TTG GCG CCC CCG GGG GCC CCG AAC AGC GTG GCC GAG GTG CCT GTC TAT TCC CAG CAG
TCA TTC TTC CCG CCA CCC GAC GAG CAG CTG CTG ACT GCA ACG GGC GCC GCG GGC GAC TCC ATC AAG GCC ATC
GCA TCC ATT GCC GAG AAG TAC TTT GGC CCC GGC TTC ATG GGG ATG CAG GAG AAG AAG CTG GGC GCC GGC GAG CTG CCC
TAC CAC TCG GCG TTC CCC TTC CAG TTC CTG CCC AAC TTC CCC CAC TCC CTT TAC CCC TTC ACG GAC CGA GCC
CTC GCC CAC AAC TTG CTG GTC AAG GCC GAG CCA AAG TCA CCC CCG GAC GCC CTC AAG GTG GGC GGC CCC AGT
GCC GAG TGC CCC TTT GAT CTC ACC ACC AAG CCC AAA GAC GTG AAG CCC ATC CTG CCC ATG CCC AAG GGC CCC
TGC GCC CCC GCA TCC GGC GAG GAG CAG CCG CTG GAC CTG AGC ATC GGC AGC CCG GCC CGT GCC AGC CAA AAC
GCC GGC GGG CCG GAG CCG CCG AAG AAC CAC GTC TAT GGG GAA CCG AAG CTG GGC GCC GGC GAG GGC CTG CCC
CAG GTG TGC CCG CCG GCG ATG CCG CAG CAG CCC CCG CTG CAC TAC GCC AAG CCC TCG CCC TTC TTC ATG GAC
CCC ATC TAC AAC AGG GTA GAA AAG CCG AAG GTC ACA GAC GCC CTG GGA GCG CTG AAG GAG AAG TAC CTG CCG
CCG TCC CCG CTG CTG TTC CAC CCC CAG ATG TCA GCC ATA GAG ACC ATG ACA GAG AAG CTG GAG AGC TTT GCA
GCC ATG AAG GCG GAC TGG GGC AGC TCC CTG CAG CCC CTC CCC CAC CAC CCC TTC AAC TTC CCG TCC CCA CCC
CCA ACG CTC TCC CAC CCC ATC CTC AGG AAG GGC AAG GAG CCA TAC AGC TCC AGG
ACT GGG GAG CAG CCG TAC AGG TGT AAG TAC TGC
GAC CCG TCC TTC AGC ATC TCT TCG AAC CTC CAG CCG CAC GTC CCG AAC ATC CAC AAC AAG GAG AAG CCT TTC
AAG TGC CAC CTG TGC TGC CAG CCG TGC TTC GGG CAG CAG ACC AAC CTG GAC CCG CAC CTC AAG AAC CAC GAG CAG
AAG AAC GCA CCA GTG AGC CAG CAC CCC GGG GTC CTC ACG AAC CAC CTG GGG ACC AGC GCG TCC TCT CCC ACC
TCA GAG TCG GAC AAC CAC CCA CTT TTA GAC GAG AAA GAA GAC TCT TAT TTC TGG GAA ATC AGA AAC TTT ATT
GCC AAT AGT GAG ATG AAC CAA GCA TCA ACG CCA ACA GAG AAA CCG GCG GAC ATG CAG ATC GTG GAC GGC AGT
GCC CAG TGT CCA GGC CTA GCG AGT GAG AAG CAG GAG GAC GTG GAG GAG GAG GACGAG GAG GAC GAT GAG GAC
AGC CTG GCC GGG AAG TGG CAG GAT GAC ACC GTGTCC CCG GCA CCC GAG CCC CAG CCC GGC TAC GAG GAT GAG
GAG GAT GAG GAG CCA GCC TCC CTG GCC GTC GGC TTT GAC CAC ACC CCA AGG TGT GCT GAG GAC CAC GAA
GGC GGT CTG TTA GCT TTG GAG CCG ATG CCG ACT TTT GGG AAG GGG CTG GAC CTC CCG AGA GCA GCT GAG GAA
GCA TTT GAA GTT AAA GAT GTG CTT AAT TCC ACC TTA GAT TCT GAG GCT TTA AAA CAT ACA CTG TGC AGG CAG
GCT AAG AAC CAG GCA TAT GCA ATG ATG CTG TCC TTT CCG GAA GAC ACT CTT CTC CAC ACC CCC TCC CAG GGT
TCT TCG GAC GCT TGG TTG AAG GTC ACT GGA GCC ACG TGG GAG TCT GGA GCA TTT CAC CCC ATC AAC CAC CTC
S L D A W L K V T G A T S E S G A F H P I N H L
TGA

```

B) Transcrit RUNX1 exon5 - PRDM16 exon3

```

ATG GCT TCA GAC AGC ATA TTT GAG TCA TTT CCT TCG TAC CCA CAG TGC TTC ATG AGA GAA TGC ATA CTT GGA
ATG AAT CCT TCT AGA GAC GTC CAC GAT GCC AGC ACG AGC CCG CCG TTC ACG CCG CCT TCC ACC GCG CTG AGC
CXA GGC AAG ATG AGC GAG GCG TTG CCG CTG GGC GCC CCG GAC GCC GGC GCT CCG CTG GCC GGC AAG CTG AGG
AGC GGC GAC CCG AGC ATG GTG GAG GTG CTG GCC CAC CCG GCG GAG GTG CTG CCG ACC GAC AGC CCC AAC
S G D R S M V E V L A D H P G E L V R T D S P N
TTC CTC TGC TCC CTG CTG CCT ACG GAC TGG CCG TGC AAC AAG ACC CTG CCG ACT GCT TTC AAG GTG GTG GCC
P L C S V L P T H W R C N K T L P I A F K V V A
CTA GGG GAT GTT CCA GAT GGC ACT CTG GTC ACT GTG ATG GCT GGC AAT GAT GAA AAC TAC TGG GCT GAG CTG
L G D V P D G T L V T V M A G N D E N Y S A E L
AGA AAT GCT ACC GCA GCC ATG AAG AAC CAG GTT GCA AGA TTT AAT GAC CTC AGG TTT GTC GGT CGA AGT GGA
R N A T A A M K N Q V A R F N D L R P V G R S G
AGA GGG AAA AGC TTC ACT CTG ACC ATC ACT GTC TTC ACA AAC CCA CCG CAA GTC GCC ACC TAC CAC AGA GCC
R G K S P T L T I T V P T N P P Q V A T Y H R A
ATC AAA ATC ACA GTG GAT GGG CCC CGA GAA CCT CGA AGT GAC GGT GAC GTT GTA AAT AAT ATG TAT GAG CCC
I K I T V D G F R E P R S D G D V V N N M Y E P
AAC CCG GAC CTG CTG GCC AGC CAC AGC CCG GAG GAC GAG GCC GAG GAC AGT GCC ATG TCG CCC ATC CCC GTG
GGG CCA CCG TCC CCC TTC CCC ACC AGC GAG GAC TTC ACC CCC AAG GAG GCG TCG CCG TAC GAC GCC CCT GTC
TAC ATT CCT GAA GAC ATT CCG ATC CCA GCA GAC TTC GAC CTC CGA GAG TCC TCC ATC CCA GGG GCT GGC CTG
Y I P E D I P I P A D F R L H E S S I T G A G
GGG TGG GGG AAG AAG AAG ATG GAA GCC GGG GAG AGG CTG GGC CCC TGC GTG GTG CCG GCG GCG GCG
G V W A K R R W N E A D E R L G P C V V Y P R A A
GCA AAG GAG ACA GAC TTC GGA TGG GAG CAA ATA CTG ACG GAC GTG GAA GTG TCG CCC CAG GAA GGC TGC ATC
A K E T D P D W E Q I L T D V E V S P Q E O C T
ACA AAG ATC TCC GAA GAC CTG GGC AGT GAG AAG TTC TGC GTG GAT GCA AAT CAG GCG GGG GCT GGC AGC TGG
F R I S F D L G S E K F C V D A R Q A D A D S M
CTC AAG TAC ATC CGT GTG GCG TGC TCC TGC GAT GAC CAG AAC CTC ACC ATG TGT CAG ATC AGT GAG CAG ATT
L K Y I R V A C S C D D Q N L T W C Q I S P Q
TAC TAT AAA GTC ATT AAG GAC ATT GAG CCA GGT GAG GAG CTG CTG GTG CAC GTG AAG GAA GGC GTC TAC CCC
Y Y K V I F D I E P G E P L L V E V K E Q V Y P
CTG GGC ACA GTG CCG CCC GGC CTG GAC GAG GAG CCC ACG TTC CCG TGT GAC GASTGT GAC GAA CTC TTC CAG
TCC AAG CTG GAC CTG CCG CCG CAT AAG AAG TAC ACG TGT GGC TCA GTG GGG GCT CCG CTC TAC GAG GGC CTG
GCT GAG GAG CTC AAG CCC GAG GGC CTT GGC GGT GGC AGC GGC CAA GCC CAC GAG TGC AAG GAC TGC GAG CCG
ATG TTC CCC AAC AAG TAC AGC CTG GAG CAG CAC ATG GTC ATC CAC ACG GAG GAG CCG GAG TAC AAA TGC CAG
CAG TGT CCC AAG GCC TTC AAG TGG AAG TCC AAC CTC ATC CCG CAC CAG ATG TCC CAG GAC AGC GGC AAA CCG
TTC GAA TGT GAA AAC TGC GTG AAG GTG TTC ACG GAC CCC AGC AAC CTT CAG CCG CAC ATC CCG TCG CAG CAG
GTG GGC GCT CCG GCC CAC GCC GGC GTC GGC GAG GAG
ATG GTC GTC AGC AGC CCG TTC ATA TGT GAT GTC TGC CAC AAG TCC TAC ACG GAC TTC TCC AAC
CTG TGC CCG CAG AAG CCG ATG CAC GCC GAC TGC CCG ACG GAG ATC AAG TCC AAG GAC TGT GGC CAG ATG TTT
AGC ACT ACC TCC TCC CCG AAC CAG CCG CCG TCC TCG GAG GGC AAG AAC CAT TAC ACG CCG GGC GGC ATC
TIT GCC CCG GCG CTG CCG TTT ACC CCC AGC CCC ATG ATG GAC AAG GCA AAA CCC TCC CCC AGC CTT AAT CAC
GCC AGC CTG GGC TTC AAC GAG TAC TTT CCG TCC ACG CCG CAC CCG GGG AGC CTG CCC TTC TCC ACG CCG CCT
CCC ACG TTC CCC GCA CTC ACC CCC GGC TTC CCG GGC ATC TTC CCT CCA TCC TTG TAC CCC CCG CCG CCT CTG
CTA CTT CCC ACA CTG CTG CTG CTC AAG AGC CCC CTG AAC CAC ACC CAG GAC GCC AAG CTC CCC AGT CCC CTG GGG
AAC CCA GCC CTG CCC CTG TCC GGC GTC AGC AAC AGC AGC CAG GGC ACC ACG GCA GCT GCG GGG CCC GAG
GAG AAG TTC GAG AGC CCG CTG GAG GAC TCC TGT GTG GAG AAG CTG AAG ACC AGG AGC AGC CAG ATG TCG GAG
GGC AGT GAC TTT GAG GAC GTC AAC ACC ACC ACG GGG ACC GAC CTG GAC ACG ACC ACG GGG ACG GGC TCG GAC
CTG GAC AGC GAC GTG GAC GAC CTT GAC AAG GAC AAG GGC AAG GGC AAG TCC GCC GAG GGC CAG CCC AAG
TIT GGG GGC GGC TTG GCG CCC CCG GGG GCC CCG AAC AGC GTG GCC GAG GTG CCT GTC TAT TCC CAG CAG
TCA TTC TTC CCG CCA CCC GAC GAG CAG CTG CTG ACT GCA ACG GGC GCC GCG GGC GAC TCC ATC AAG GCC ATC
GCA TCC ATT GCC GAG AAG TAC TTT GGC CCC GGC TTC ATG GGG ATG CAG GAG AAG AAG CTG GGC GCC GGC GAG CTG CCC
TAC CAC TCG GCG TTC CCC TTC CAG TTC CTG CCC AAC TTC CCC CAC TCC CTT TAC CCC TTC ACG GAC CGA GCC
CTC GCC CAC AAC TTG CTG GTC AAG GCC GAG CCA AAG TCA CCC CCG GAC GCC CTC AAG GTG GGC GGC CCC AGT
GCC GAG TGC CCC TTT GAT CTC ACC ACC AAG CCC AAA GAC GTG AAG CCC ATC CTG CCC ATG CCC AAG GGC CCC
TGC GCC CCC GCA TCC GGC GAG GAG CAG CCG CTG GAC CTG AGC ATC GGC AGC CCG GCC CGT GCC AGC CAA AAC
GCC GGC GGG CCG GAG CCG CCG AAG AAC CAC GTC TAT GGG GAA CCG AAG CTG GGC GCC GGC GAG GGC CTG CCC
CAG GTG TGC CCG CCG GCG ATG CCG CAG CAG CCC CCG CTG CAC TAC GCC AAG CCC TCG CCC TTC TTC ATG GAC
CCC ATC TAC AAC AGG GTA GAA AAG CCG AAG GTC ACA GAC GCC CTG GGA GCG CTG AAG GAG AAG TAC CTG CCG
CCG TCC CCG CTG CTG TTC CAC CCC CAG ATG TCA GCC ATA GAG ACC ATG ACA GAG AAG CTG GAG AGC TTT GCA
GCC ATG AAG GCG GAC TGG GGC AGC TCC CTG CAG CCC CTC CCC CAC CAC CCC TTC AAC TTC CCG TCC CCA CCC
CCA ACG CTC TCC CAC CCC ATC CTC AGG AAG GGC AAG GAG CCA TAC AGC TCC AGG
ACT GGG GAG CAG CCG TAC AGG TGT AAG TAC TGC
GAC CCG TCC TTC AGC ATC TCT TCG AAC CTC CAG CCG CAC GTC CCG AAC ATC CAC AAC AAG GAG AAG CCT TTC
AAG TGC CAC CTG TGC TGC CAG CCG TGC TTC GGG CAG CAG ACC AAC CTG GAC CCG CAC CTC AAG AAC CAC GAG CAG
AAG AAC GCA CCA GTG AGC CAG CAC CCC GGG GTC CTC ACG AAC CAC CTG GGG ACC AGC GCG TCC TCT CCC ACC
TCA GAG TCG GAC AAC CAC CCA CTT TTA GAC GAG AAA GAA GAC TCT TAT TTC TGG GAA ATC AGA AAC TTT ATT
GCC AAT AGT GAG ATG AAC CAA GCA TCA ACG CCA ACA GAG AAA CCG GCG GAC ATG CAG ATC GTG GAC GGC AGT
GCC CAG TGT CCA GGC CTA GCG AGT GAG AAG CAG GAG GAC GTG GAG GAG GAG GACGAG GAG GAC GAT GAG GAC
AGC CTG GCC GGG AAG TGG CAG GAT GAC ACC GTGTCC CCG GCA CCC GAG CCC CAG CCC GGC TAC GAG GAT GAG
GAG GAT GAG GAG CCA GCC TCC CTG GCC GTC GGC TTT GAC CAC ACC CCA AGG TGT GCT GAG GAC CAC GAA
GGC GGT CTG TTA GCT TTG GAG CCG ATG CCG ACT TTT GGG AAG GGG CTG GAC CTC CCG AGA GCA GCT GAG GAA
GCA TTT GAA GTT AAA GAT GTG CTT AAT TCC ACC TTA GAT TCT GAG GCT TTA AAA CAT ACA CTG TGC AGG CAG
GCT AAG AAC CAG GCA TAT GCA ATG ATG CTG TCC TTT CCG GAA GAC ACT CTT CTC CAC ACC CCC TCC CAG GGT
TCT TCG GAC GCT TGG TTG AAG GTC ACT GGA GCC ACG TGG GAG TCT GGA GCA TTT CAC CCC ATC AAC CAC CTC
S L D A W L K V T G A T S E S G A F H P I N H L
TGA

```

Figure 13. Transcrit de fusion *RUNX1-PRDM16* qui respecte le cadre de lecture vs transcrit de fusion qui ne respecte pas le cadre de lecture et domaines probables présents au niveau des protéines de fusion.

A) Le transcrit de fusion *RUNXI* exon5 – *PRDM16* exon2. Les nucléotides codant pour les exons sont alternés en vert et en noir, et le premier ATG où la transcription débute est noté en rouge. Le point de fusion entre les deux gènes est surligné en rouge (ATG). Le A du trinuécléotide appartient à l'exon 5 de *RUNXI* et le GT appartient à l'exon 2 de *PRDM16*. Le trinuécléotide formé (AGT) assure donc un cadre de lecture non décalé. Le gène *PRDM16* est présent à partir de son deuxième exon. Dans la protéine chimérique probable, il y a présence des séquences codant pour le domaine RHD (en jaune) de *RUNX1*, ainsi que les séquences codant pour le domaine PR (en vert) de *PRDM16* et son domaine de liaison avec le CtBP (en gris). Les séquences codant pour les doigts de zinc de *PRDM16* sont surlignées en rose. **B)** Exemple de transcrit *RUNXI* (exon5)-*PRDM16* (exon2) qui ne respecte pas le cadre de lecture. Le trinuécléotide formé lors de la fusion des deux gènes (ACA) est surligné en rouge. Dans cette forme tronquée de *RUNX1*, seulement le domaine RHD de *RUNX* (en jaune) est présent. Les domaines de *PRDM16* ne sont pas présents en raison d'un décalage de lecture et de la présence d'un codon stop prématuré (indiqué par une étoile)

1.5. Étude d'expression de *PRDM16* en phase chronique vs en phase blastique de la LMC dans le cas 02-H056

Afin de comparer l'expression de *PRDM16* chez notre patiente en phase chronique vs en phase blastique de la LMC par PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR), nous avons placé des amorces dans les exons 1-2 et 9-10 de *PRDM16*. Ceci nous permet de différencier entre l'allèle sauvage de *PRDM16* et l'allèle réarrangé, puisque la fusion implique *PRDM16* à partir de son exon 2. Le contrôle endogène utilisé dans notre étude est le gène *GAPDH*, et le calibrateur (RQ=1), est un échantillon de moelle d'un patient avec une LAM de type M2 sans la t(1;21). Chez notre patiente en phase chronique de la LMC (00-H59), la valeur Ct (Cycle Threshold) de *PRDM16* avec les amorces ciblant les exons 1 et 2 et les exons 9 et 10 est de 0 indiquant que *PRDM16* n'est pas exprimé. Cependant en phase blastique de la LMC, la valeur Ct de *PRDM16* avec les amorces ciblant les exons 9 et 10 est de 33.58 et la valeur Ct du *GAPDH* est de 33.11. Le $\Delta Ct = Ct_{PRDM16} - Ct_{GAPDH} = 0.47$, cela montre que *PRDM16* est plus exprimé que le *GAPDH* en LMC-PB. L'expression de *PRDM16* reste absente avec les amorces placées dans les exons 1 et 2. Ces résultats démontrent que suite à la translocation t(1;21), l'expression de *PRDM16* est fortement augmentée, plus précisément l'expression de l'allèle transloqué de *PRDM16* tandis que l'expression de l'allèle normal de *PRDM16* est absente (Figure 14).

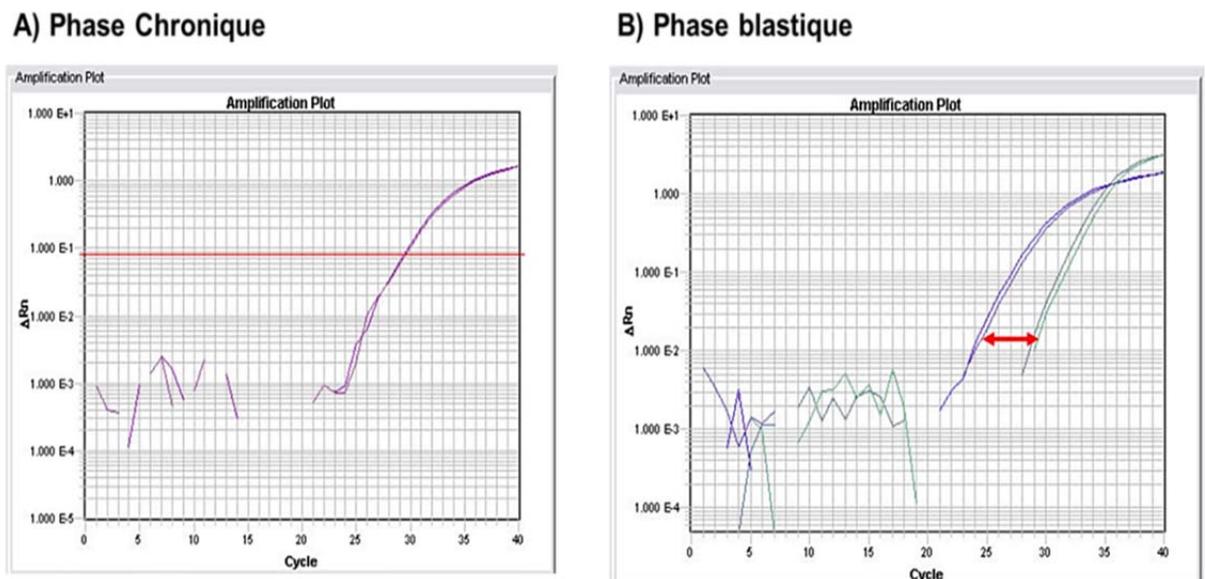


Figure 14. Expression de *PRDM16* chez la patiente 02H056 en phase chronique vs en phase blastique de la leucémie myéloïde chronique

A) Analyse des courbes d'amplification de la PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) à partir des cellules mononuclées de la patiente 00H059 en phase chronique de la leucémie myéloïde chronique. Seule la courbe d'amplification du contrôle endogène, le *GAPDH* (courbe mauve) est détectée alors que cette courbe est absente pour l'amplification ciblant les exons 9 et 10 du gène *PRDM16*. **B)** Analyse des courbes d'amplification de la qRT-PCR à partir des cellules mononuclées de la patiente 02H056 présentant la t(1;21) en phase blastique de la leucémie myéloïde chronique. Le nombre d'amplicons de *PRDM16* avec des amorces localisées dans les exons 9 et 10 est plus important que celui du contrôle endogène *GAPDH*. Ceci est représenté par la courbe d'amplification de *PRDM16* (courbe bleue) qui est détectée avant la courbe de *GAPDH* (courbe verte).

1.6. Étude d'expression de *PRDM16* dans 105 échantillons regroupant des patients avec des leucémies aiguës et chroniques myéloïdes et des syndromes myélodysplasiques

Par PCR quantitative nous avons étudié l'expression de *PRDM16* en ciblant les exons 9 et 10 pour pouvoir détecter les différentes formes alternatives des transcrits. Cent-cinq échantillons ont été étudiés dont 7 échantillons de patients en LMC-PB incluant le cas 02-H056 avec la translocation t(1;21), l'échantillon de la même patiente en phase chronique de la LMC (00-H059) sans la t(1;21), 14 échantillons de patients avec un SMD ou SMD/LAM et 68 échantillons de LAMs de différents groupes FAB (M0, M1, M2, M4, M5) et de différents groupes cytogénétiques, ont également été analysés. Ces derniers regroupent les translocations chromosomiques impliquant la bande chromosomique 11q23 t(11q23)/réarrangement du gène *MLL* associés à un mauvais pronostic, et les réarrangements chromosomiques à bon pronostic t(15;17)(q24;q21), t(8;21)(q22;q22) et l'inversion 16, inv(16)(p13q22). Nous avons inclus dans l'étude 5 échantillons de moelle normale comprenant un échantillon de cellules CD34 positives, 5 échantillons de sang normal, 4 lignées de LMC-PB (K562, KU812, MC3, MEG-01) et la lignée HCT-116. Toutes les analyses ont été effectuées en duplicata et la valeur moyenne a été utilisée pour la quantification.

Des 90 patients étudiés avec SMD, LAM et LMC, 8 patients surexpriment *PRDM16* dont notre cas avec la t(1;21). Un seul autre patient en phase blastique de la LMC (06-H006) exprime significativement *PRDM16*. Son caryotype révèle une translocation chromosomique t(7;17)(p15;q22) comme anomalie additionnelle à la t(9;22) (voir section suivante des résultats). Les caryotypes prédominants chez les patients surexprimant *PRDM16* sont des caryotypes normaux chez 4 patients (02H009, 03H033, 04H006, 03H052) dont 3 LAM de type M1 et 1 LAM de type M5B. Dans notre étude, *PRDM16* est faiblement exprimé dans les LAM avec réarrangements impliquant la bande chromosomique 11q23 et les LAM avec les translocations t(8;21) et t(15;17) et avec l'inversion 16, inv(16) (Tableau VI et Figure 15).

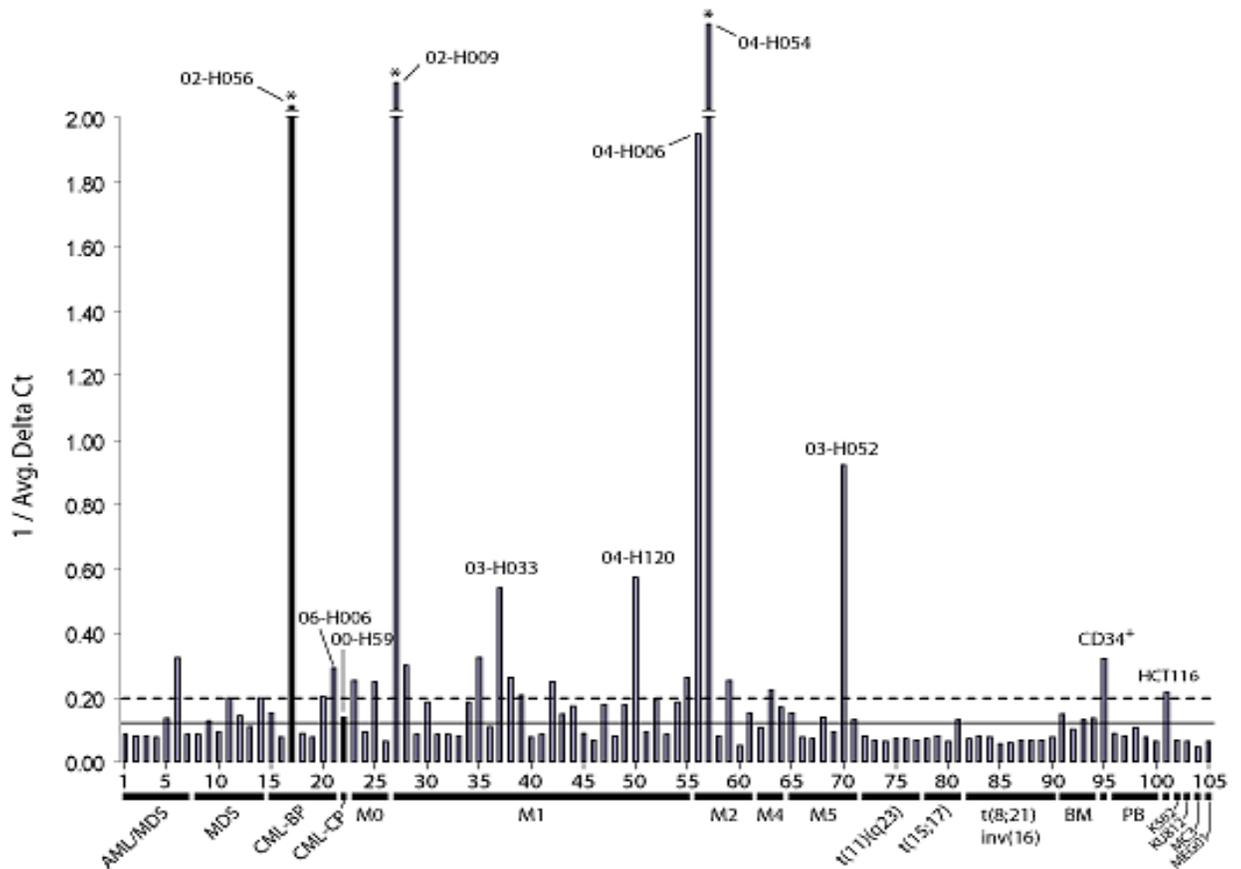


Figure 15. Étude de l'expression de *PRDM16* dans 105 échantillons.

Quantification relative de *PRDM16* par PCR quantitative en temps réel en utilisant des amorces localisées dans les exons 9-10 de *PRDM16* dans 105 échantillons comprenant : 14 syndromes myélodysplasiques (MDS) et SMD transformés en leucémie aiguë myéloïde (AML/MDS), 7 leucémies myéloïdes chroniques en phase blastique (CML-BP) incluant le cas 02-H056 avec la translocation $t(1;21)$, l'échantillon de la même patiente en phase chronique de la LMC (CML-CP, 00-H59) sans la $t(1;21)$, 68 LAM de différents types morphologiques (FAB M0, M1, M2, M4, M5) et de différents groupes cytogénétiques avec les translocations chromosomiques $t(11q23)$, $t(15;17)$, $t(8;21)$ et l'inversion 16, $inv(16)$, 5 moelles normales (BM) dont un échantillon de cellules CD34 positives, 5 échantillons de sang périphérique (PB), la lignée HCT-116 et quatre lignées cellulaires de leucémie myéloïde chronique en phase blastique (K562, KU812, MC3, MEG-01). Le graphique montre les ratios $1/\Delta Ct$. $\Delta Ct = Ct_{PRDM16} - Ct_{GAPDH}$, le CT (Cycle Threshold) représente le cycle seuil qui est la mesure relative de la concentration du gène cible dans la réaction de l'amplification de la PCR quantitative. La ligne continue horizontale indique le ratio de 1/moyenne des ΔCt des quatre échantillons de moelle normale (calibrateur). La ligne

horizontale discontinue en haut de la ligne horizontale continue, montre un ratio $1/\Delta CT$ de 0.21 indiquant une expression élevée. La ligne horizontale discontinue en bas de la ligne horizontale continue, montre un ratio $1/\Delta CT$ de 0.09 indiquant une expression basse. Une surexpression est définie dans notre étude par une expression 10 fois plus élevée que l'expression des ARNm détectées dans les cellules contrôles BM. Les valeurs ΔCT sont : 04-H070: 3.1; 02-H056: 0.3; 06-H006: 3.4; 00-H59: 7.3; 02-H009: 0.2; 02-H075: 3.1; 03-H033: 1.9; 04-H120: 1.7; 04-H006: 0.5; 04-H054: -2.2; 03-H052: 1.1. La moyenne des valeurs ΔCT des moelles normales est de 8.0.

Figure reproduite de *Genes, Chromosomes and Cancer*, 45, Sawcène Hazourli, Pierre Chagnon, Martin Sauvageau, Raouf Fetni, Lambert Busque, Josée Hébert « Overexpression of *PRDM16* in the presence and absence of the *RUNX1/PRDM16* fusion gene in myeloid leukemias. », p. 1072–1076, copyright Aug 9, 2006, avec permission de Copyright Clearance Center.

Tableau VI. Résultats de la PCR quantitative de *PRDM16* en fonction des caractéristiques morphologiques et cytogénétiques des spécimens étudiés.

Echantillon	Diagnostic	Tissu	RQ <i>PRDM16</i>	Caryotype
00H59	LMC-PC	MO	1.2165	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[20]
02H037	LMC-PB	SP	2.8346	47,XY,t(8;17)(q11;q23),t(9;22)(q34;q11.2),+der(22)t(9;22)(q34;q11.2)[21]
02H052	LMC-PB	MO	0.0341	45,XY,t(2;12)(q31;p12),t(9;22)(q34;q11.2),der(9)t(9;22)(q34;q11.2)-22[3]/47,XY,t(2;12)(q31;p12),t(9;22)(q34;q11.2),+der(22)t(9;22)(q34;q11.2)[15]/46,XY[3]
02H056	LMC-PB	SP	203.8325	46,XX,t(1;21)(p36;q22),t(9;22)(q34;q11.2)[20]
03H054	LMC-PB	MO	0.117	46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[1]/47,idem,+8[18]
04H027	LMC-PB	MO	0.029	Absence de metaphase
04H049	LMC-PB	MO	8.5031	46,XX,t(9;22)(q34;q11.2)[18]/47,XX,t(9;22)(q34;q11.2),+8[2]
06H006	LMC-PB	MO	23.6808	47,XY,t(7;17)(p15;q?22),t(9;22)(q34.1;q11.2),+der(22)t(9;22)(q34.1;q11.2)[20]
02H003	M0	SP	12.3035	46,XX,del(2)(q31),add(8)(p21)[17]/46,XX[1]
03H030	M0	SP	0.165	44~48,XX,add(1)(p3?2),del(5)(q13),del(6)(p22),+8,add(18)(p11.3),+21[cp22]
03H039	M0	SP	16.177	Absence de metaphase
04H096	M0	MO	0.0038	45,XY,-7[3]/46,XY[18]
02H009	M1	MO	171.1954	46,XX[21]
02H025	M1	SP	18.7703	46,XX,t(2;16)(p11.2;q24)[8]/46,XX,del(12)(p13),der(17)?t(17;22)(q25;q11.2)[4]/46,XX[11]
02H028	M1	MO	0.0822	46,XY,del(1)(p11p22)[22]
02H041	M1	MO	6.1933	46~47,XX,-10,-18,der(18)?t(10;18)(q22;q23),+1~3mar[cp6]/46,XX[16]
02H045	M1	MO	0.0567	46,XX,del(9)(q22)[19]/46,XY[1]
02H053	M1	MO	0.0653	46,XY[20]
02H060	M1	SP	0.0399	45,XY,-21[3]/46,XY[22]
02H066	M1	MO	6.1405	46,XX[22]
02H075	M1	SP	30.7849	45~47,XY,2,add(5)(q13),del(7)(p15),add(17)(p13),-20,+1~4mar[cp19]/46,XY[2]
03H024	M1	MO	0.4931	47,XY,+8[18]/48,XY,+8,+8[3]/46,XY[1]
03H033	M1	SP	71.3482	46,XX[21]
03H081	M1	MO	18.2886	47,XX,+8[21]
03H094	M1	SP	8.9939	45,XY,-3,del(3)(q12),-4,der(5)t(3;5)(p12;q11.2),del(6)(q21q25),t(9;10)(p13;q26),add(11)(p15),?del(12)(q22),der(12)t(4;12)(q32;q22),-15,?add(16)(p11.2),-17,der(17)add(17)(p11.2),?del(17)(q12q22),add(18)(p11.2),t(17;18)(q12;q23),+del(22)(q13),+1~2mar[19]
03H116	M1	MO	0.0252	46,XX[21]

03H119	M1	MO	0.0663	46,XY[20]
04H001	M1	SP	16.0362	47,XY,+13[13]/49,XY,+9,+13,+13[7]/46,XY[1].
04H024	M1	MO	2.4567	46,XX[21]
04H025	M1	MO	4.8782	46,XY[21]
04H048	M1	MO	0.1126	46,XY,del(9)(q22q33)[19]/46,XY[1]
04H055	M1	SP	0.0085	46,XY,del(20)(q11.2)[19]/46,XY[1]
04H103	M1	SP	5.3071	46,XY,t(4;12)(q11-q12;p13)[21]
01H002	M3 t(15;17)	MO	0.0103	46,XY,t(15;17)(q24;q21)[17]/45,XY,-13,t(15;17)(q24;q21)[3]
02H046	M3V t(15;17)	SP	0.0547	46,XX,t(15;17)(q24;q21)[20]
03H070	M3 t(15;17)		0.0048	FISH <i>PML-RARA</i> positif
04H123	M3 t(15;17)		1.3171	FISH <i>PML-RARA</i> positif
03H067	M5 t(11)(q23)	MO	0.0189	46,XY,t(11;17)(q23;q25)[19]/46,XY[1]
04H041	M5B t(11)(q23)	MO	0.0109	46,XY,t(11;17)(q23;q25)[18]/46,XY[2]
04H080	M5A t(11)(q23)	MO	0.0137	46,XY,t(9;11)(p22;q23)[14]/46,XY[8]
05H066	M4 t(11)(q23)	MO	0.0091	46,XX,t(6;11)(q27;q23)[20]
03H065	M2 t(8;21)	MO	0.0189	46,XY,t(4;8;21)(p14;q22;q22)[21]
03H083	M2 t(8;21)	SP	0.0549	46,XY,t(8;21)(q22;q22),inv(9)(p11q12)c[20]
05H001	M2 t(8;21)	MO	0.024	45,X,-Y,t(8;21)(q22;q22)[14]/46,XY[7]
05H042	M2 t(8;21)	MO	0.0011	47,XY,t(8;21)(q22;q22),+8[21]
03H109	M4E inv(16)	SP	0.0075	46,XY,inv(16)(p13q22)[20]
03H112	M4E inv(16)	SP	0.0086	46,XY,inv(16)(p13q22)[20]
04H030	M4E inv(16)	MO	0.0107	46,XY,inv(16)(p13q22)[21]
04H061	M4E inv(16)	MO	0.0248	46,XX,inv(16)(p13q22)[20]
04H091	M4 inv(16)	MO	0.0017	46,XY,inv(16)(p13q22)[5]/46,XY,der(16)inv(16)(p13q22)t(16;16)(q22;q22)[4]
03H017	SMD	MO	1.0726	47,XY,+8[1]/46,XY[19]
03H060	SMD/LAM	MO	0.071	47,XY,+19[20]/46,XY,+19,-21[3]
03H097	SMD/LAM	MO	0.0395	46,XY[22]
04H011	SMD/LAM	MO	0.0462	46,XY[23]
04H037	SMD	MO	0.1371	46,XY,add(9)(q21)[21]
04H050	SMD/LAM	MO	0.023	46,XX,inv(3)(q21q26)[21]/46,XX,del(3)(q12q26)[3]
04H063	SMD/LAM	SP	1.3933	46,XX,t(3;3)(q21;q26)[20]
04H070	SMD/LAM	MO	30.5025	42~45,XY,-Y,5,add(7)(q11.2),der(10;13)(q10;q10),t(12;17)(p11.2;q11.1),-17,add(18)(p11.2),-20,-20,-21,+1~5mar[cp8]/

				46,XY[1]
04H079	SMD/LAM	MO	0.0625	46,XX,inv(3)(q21q26)[23]
04H134	SMD	MO	7.6501	46,XY,del(20)(q11)[22]
05H005	SMD	MO	1.9888	46,XY[20]
05H009	SMD	MO	0.5061	46,XY[22]
02H004	M6	MO	3.4176	42~43,XY,der(3)?del(3)(q11.2q13.3)?inv(3)(q21q26),4,del(5)(q22q31),add(7)(q22),add(7)(q11.2),-8,-10,-11,-15,-16,-17,-18,-18,+1~6mar[cp20]/46,XY[2]
02H026	M5A	MO	0.0256	46~47,XY,add(1)(p36),add(4)(p16),+8,add(21)(q22)[cp17]/46,XY[7]
02H033	M5A	MO	0.0173	47,XY,+8[17]/49,XY,+6,+8,+8[2]/46,XY[2].
03H016	M5A	MO	1.6958	46,XY[20]
03H028	M6B	MO	0.1241	40~43,XY,+2,-4,-5,-5,-7,-7,-14,-15,-17,-19,-19,-22,+7mar [cp4] /46,XY[14]
03H041	M5	MO	2.6332	46,XX[22]
03H052	M5B	MO	121.9239	46,XY[20]
04H006	M2	MO	181.084	46,XX[20]
04H054	M2	MO	1185.465	46,XY,add(1)(q44),?add(2)(p11.2),?add(2)(q21),add(3)(q13),add(5)(p15),t(6;9)(p23;q34),del(17)(q23),add(19)(q13.4),del(20)(q12),+mar[cp21]
04H068	M2	MO	0.0408	46,XX[20]
04H084	M5B	MO	1.3009	46,XX[20]
04H107	M2	MO	16.7545	46,XY[20]
04H118	M5A	MO	0.1394	47,XY,+8[1]/49,XY,+8,+8,+20[20]
04H132	M4	SP	0.3433	45,XY,del(6)(q15),-7,t(9;13)(q10;q10)[11]/46,idem,t(17;21)(q11.2;q22),+mar[9]
04H140	M4	MO	11.4579	46,XX[20]
04H141	M2	MO	0.0003	46,XY[20]
05H033	M2	MO	2.5262	46,XY[22]
05H050	M4	MO	4.2362	46,XY[20]

Tableau VI. Résultats de la PCR quantitative de *PRDM16* en fonction des caractéristiques morphologiques et génétiques des spécimens étudiés. La première colonne correspond à l'identification des cas étudiés avec les numéros de code de la BCLQ. La deuxième colonne correspond au diagnostic morphologique : leucémie myéloïde chronique (LMC) en phase chronique (PC-LMC) ou en phase blastique (LMC-PB), leucémie aigüe myéloïde (LAM) classée selon la classification FAB : M0, M1, M2, M3, M4, M5A, M5B. La troisième colonne indique le tissu étudié : moelle osseuse (MO) ou sang périphérique (SP). Les résultats de la PCR quantitative pour le gène *PRDM16* sont exprimés en RQ (Relative Quantity) et sont notés en rouge (surexpression importante: RQ

supérieur à 70), en vert (expression modérée à moyenne: RQ entre 3 et 30.7) ou en noir (expression faible ou absente).

1.7. Investigation des réarrangements et de l'amplification de *PRDM16* chez les cas surexprimant *PRDM16*

Suite à l'analyse des caryotypes des patients surexprimant *PRDM16* (cas 02H009, 03H033, 03H052, 04H006, 04H054, 04H120 et 06H006) nous n'avons observé aucun réarrangement impliquant la bande chromosomique 1p36.3 en cytogénétique standard. De plus, pour confirmer l'absence de réarrangement des gènes *RUNXI* et *PRDM16* dans ces cas, nous avons complété nos investigations par une étude en FISH avec des sondes ciblant ces gènes. Un seul cas présentait un réarrangement de *RUNXI* (04H120) suite à une t(7;21)(p22;q22), translocation qui a été caractérisée dans notre laboratoire (Giguere and Hebert, 2011). Nous n'avons détecté aucun autre cas qui présentait une translocation impliquant *PRDM16* avec la technique de FISH et les sondes utilisées. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure totalement la présence d'un réarrangement de ce gène qui ne serait pas détecté par cette technique. De plus aucune amplification de ce gène n'a été démontrée par FISH dans ces cas. Ces résultats suggèrent que *PRDM16* peut être surexprimé en présence ou en absence de réarrangements chromosomiques et que la surexpression notée dans nos cas n'est pas associée à une amplification de *PRDM16*.

Tableau VII. Caryotypes et résultats des FISH ciblant *PRDM16* chez les patients surexprimant *PRDM16*.

BCLQ	Diagnostic	Caryotype	RP1-163G9	RP4-785P20
02H009	LAM-M1	46,XX[21]	Négatif	Négatif
02H056	LMC-PB	46,XX,t(1;21)(p36;q22),t(9;22)(q34;q11.2)[20]	Positif	Négatif
03H033	LAM-M1	46,XX[21]	Négatif	Négatif
03H052	LAM-M5B	46,XY[20]	Négatif	Négatif
04H006	LAM-M1	46,XY[20]	Négatif	Négatif
04H054	LAM-M2	46,XY,add(1)(q44),?add(2)(p11.2),?add(2)(q21),add(3)(q13),add(5)(p15),t(6;9)(p23;q34),del(17)(q23),add(19)(q13.4),del(20)(q12),+mar[cp21]	Négatif	Négatif
04H120	LAM-M1	46,XY,del(5)(q22q33),del(21)(q22)[20]	Négatif	Négatif
06H006	LMC-PB	46,XY,t(7;17)(p15;q2?2),t(9;22)(q34.1;q11.2)[9]/47,idem,+der(22)t(9;22)(q34.1;q11.2)[14]	Négatif	Négatif

Tableau VII. Caryotypes et résultats des FISH ciblant *PRDM16* chez les patients surexprimant *PRDM16*. Le PAC RP1-163G9 couvre l'exon 1 et une partie de l'intron 1 de *PRDM16* et le PAC RP4-785P20 couvre une partie de l'intron 3 jusqu'à l'exon 17 de *PRDM16*. Différents types de leucémie aigüe myéloïde (LAM) sont représentés : les cas 02H009, 03H033, 04H006 et 04H120 sont des LAM-M1; le cas 04H054 est une LAM M2, et le cas 03H052 est une LAM M5B. Les cas 02H056 et 06H006 sont des leucémies myéloïdes chroniques en phase blastique (LMC-PB).

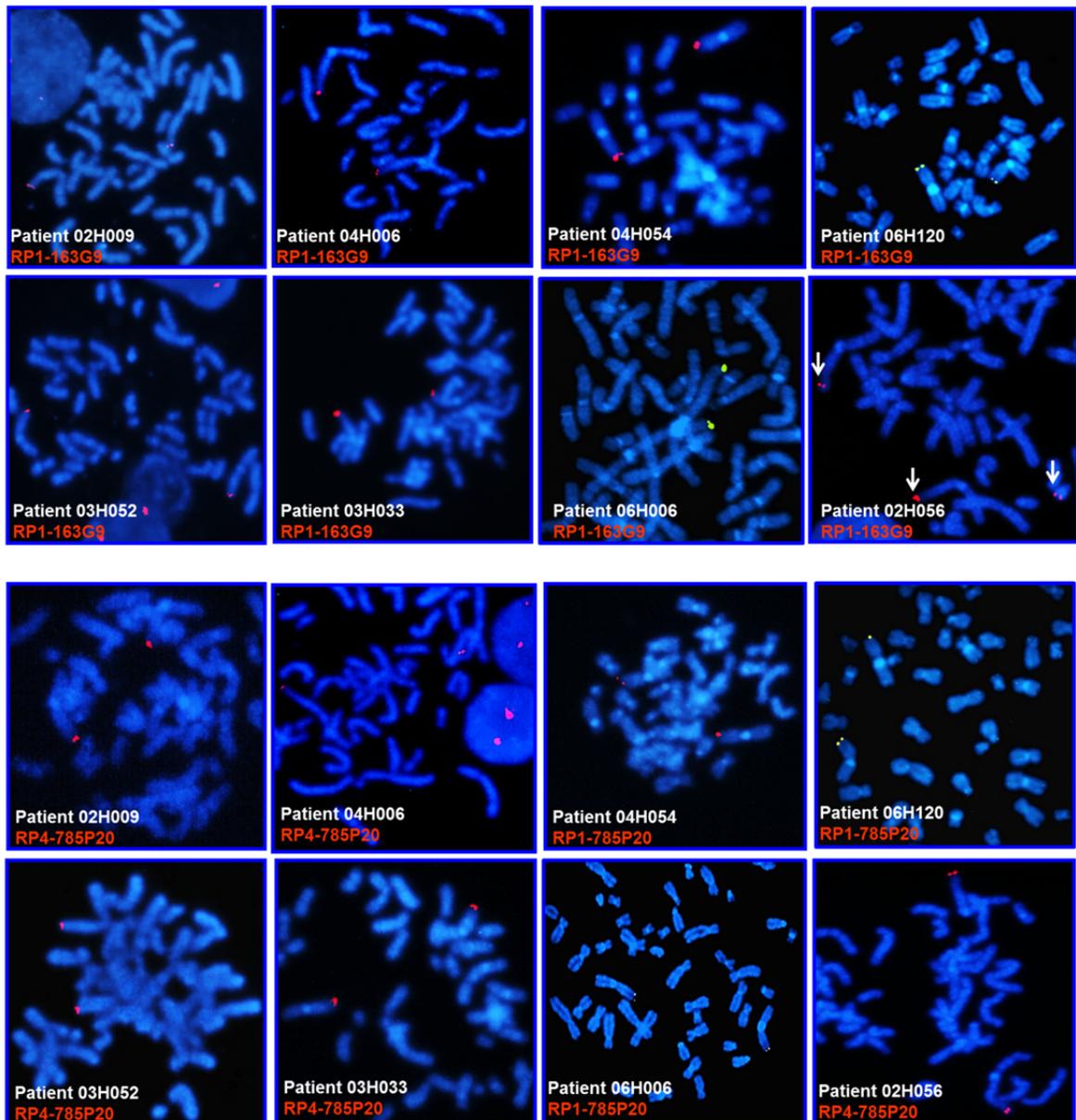


Figure 16. Étude du réarrangement et de l'amplification du gène *PRDM16* dans les cas surexprimant *PRDM16*.

L'analyse par hybridation in situ en fluorescence (FISH) avec le PAC RP1-163G9 ciblant l'exon 1 et l'intron1 de *PRDM16* et le BAC RP11-785P20 ciblant l'intron 4 à l'exon 17 de *PRDM16* sur la bande 1p36.32. L'analyse FISH sur les métaphases des spécimens 02H009, 03H033, 03H052, 04H006, 04H054, 04H120 et 06H006 montre que chaque sonde hybride en 2 copies sur la bande 1p36, indiquant que ces régions de *PRDM16* ne sont pas transloquées ni amplifiées. L'analyse FISH avec le PAC RP1-163G9 est positive seulement pour le cas 02H056 avec présence de 3 signaux (flèches blanches) tel que démontré dans la figure 11B.

2. Investigation de la translocation t(7;17)(p15;q22) en phase blastique de la leucémie myéloïde chronique (cas 06H006)

2.1. Présentation clinique et analyses cytogénétiques

Le patient âgé de 37 ans s'est présenté en mars 2005 avec une splénomégalie et une leucocytose. L'analyse FISH a démontré une fusion *BCR-ABL1* et un chromosome Ph était présent dans toutes les mitoses analysées comme anomalie isolée au caryotype. Suite à ces résultats, le patient a été mis sous IM (400 mg/jour). Sept mois plus tard, le patient ne répondant plus au traitement, la dose d'IM a été augmentée à 800 mg/jour. Malheureusement le patient a cessé de lui-même son traitement à cause des effets secondaires. La qRT-PCR a révélé une augmentation significative des transcrits de fusion *BCR-ABL1*. Une recherche de mutations au niveau du domaine tyrosine kinase d'*ABL1* s'est avérée négative. En janvier 2006, l'aspiration médullaire a démontré la présence de 35% de cellules blastiques, signe de transformation blastique de la LMC. Le caryotype a révélé la présence additionnelle d'une translocation chromosomique entre les bras courts du chromosome 7 et les bras longs du chromosome 17 dans toutes les mitoses analysées et une évolution clonale dans 14 cellules sur 23 analysées, avec l'addition d'un deuxième Ph. Vue la similarité du marquage chromosomique entre les extrémités 7p et 17q, il était difficile de préciser les bandes chromosomiques impliquées au caryotype standard. La formule chromosomique a été établie comme suit : 46,XY,t(7;17)(p15,q22),t(9;22)(q34.1;q11.2)[9]/47,idem,+der(22)t(9;22)(q34.1;q11.2) [14] (Figure 17). Le patient étant réfractaire au traitement (chimiothérapie et IM), il n'était donc pas éligible à une greffe allogénique de cellules souches et il est décédé à l'âge de 38 ans en juillet 2006.

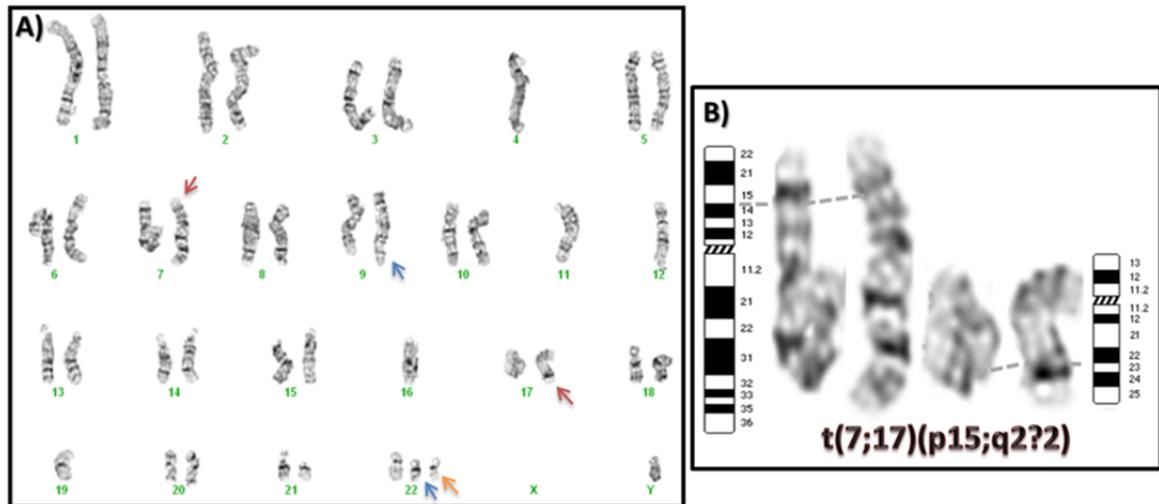


Figure 17. Caryotype en bandes GTG révélant la présence des translocations chromosomiques $t(9;22)$ et $t(7;17)$ chez le patient 06H006.

A) Caryotype en bandes GTG avec une résolution de 500 bandes, effectué à partir des cellules mononuclées du patient 06H006 en phase blastique de la leucémie myéloïde chronique révélant la présence du chromosome Philadelphie (Ph) résultant de la translocation $t(9;22)(q34.1;q11.2)$ (flèches bleues), un deuxième Ph (flèche orange), ainsi qu'une translocation chromosomique entre les bras courts du chromosome 7 et les bras longs du chromosome 17 (flèches rouges). **B)** Caryotype partiel et idiogrammes des chromosomes 7 et 17, suggérant des points de cassure au niveau des bandes chromosomiques 7p15 et 17q2??.

2.2. Caractérisation du point de cassure sur la bande chromosomique 7p15 et identification du réarrangement du locus *HOXA* dans la translocation $t(7;17)(p15;q22)$

Un seul cas de translocation chromosomique $t(7;17)(p15;q22)$ impliquant les gènes *MSI2* et *HOXA9* a été rapporté à ce jour (Barbouti et al., 2003). Nous avons donc ciblé ces gènes avec des BACs couvrant le locus *HOXA* localisé en 7p15 et le gène *MSI2* localisé en 17q22. D'autre part, au niveau des bras courts du chromosome 7, les gènes les plus fréquemment impliqués dans les leucémies sont localisés au niveau du locus *HOXA*. Ce dernier regroupe les gènes *HOXA1*, *HOXA2*, *HOXA3*, *HOXA4*, *HOXA5*, *HOXA6*, *HOXA7*,

HOXA9, *HOXA10*, *HOXA11*, *HOXA13* et *EVXI*. Des ARNs non codants sont aussi présents dont *HOTAIRMI*, *LOC100133311*, *HOTTIP* et le microARN *MIR196B*. Les gènes les plus fréquemment altérés dans les leucémies sont *HOXA9*, *HOXA11* et *HOXA13* (Fujino et al., 2002; Hatano et al., 1999; Suzuki et al., 2002; Taketani et al., 2002b; Wong et al., 1999b). Nous avons étudié ces gènes par FISH avec le BAC RP11-1132K14 et nous avons identifié un point de cassure au niveau des bras courts du chromosome 7 entre *HOXA3* et *EVXI* (Figure 18).

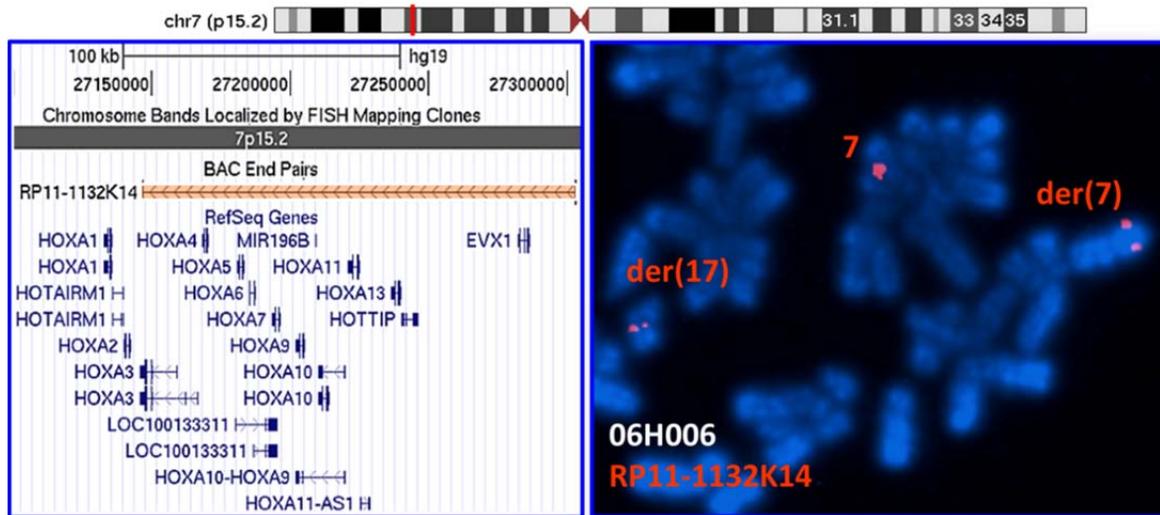


Figure 18. Identification du réarrangement du locus *HOXA* par hybridation in situ en fluorescence dans la translocation $t(7;17)(p15;q2?2)$.

L'hybridation in situ en fluorescence (FISH) sur les métaphases obtenues à partir des cellules mononuclées du cas 06-H006 en phase blastique de la leucémie myéloïde chronique avec le BAC RP11-1132K14 (couleur rouge) ciblant le locus *HOXA*, démontre une hybridation sur le chromosome 7 normal ainsi que sur les chromosomes 7 et 17 réarrangés, der(7) et der(17), limitant la région à investiguer entre les gènes *HOXA3* et *EVXI*.

2.3. Caractérisation du point de cassure sur la bande chromosomique 17q22 et identification du réarrangement du gène *MSI2* dans la t(7;17)(p15;q22)

Nous avons ciblé le gène *MSI2* avec le BAC RP11-959D16 qui couvre la partie 3' du gène, soit de l'intron 6 jusqu'à l'exon 11 (Figure 19B). Il s'agit du point de cassure rapporté dans la littérature (Barbouti et al., 2003). Cependant, le point de cassure détecté dans notre cas au niveau du chromosome 17 est centromérique à la position rapportée (Barbouti et al., 2003). En effet, le BAC RP11-1089N22 indique que le point de cassure est localisé entre les exons 1 et 6 de *MSI2*. Nous avons donc identifié dans notre cas, un nouveau point de cassure localisé dans la partie 5' de *MSI2* (Figure 19A).

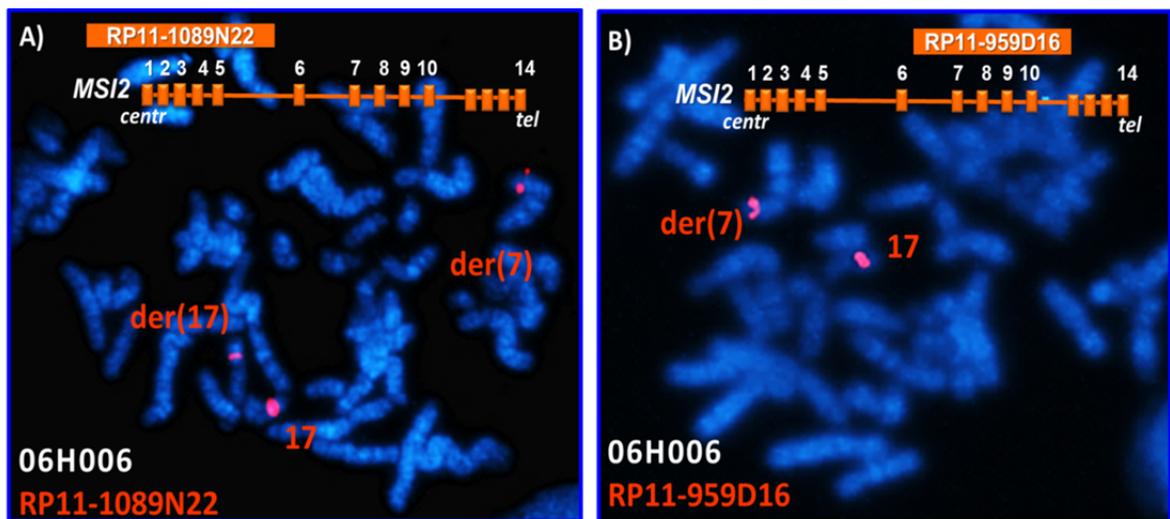


Figure 19. Identification du réarrangement du gène *MSI2* dans la translocation t(7;17)(p15;q22) par hybridation in situ en fluorescence.

A) L'hybridation in situ en fluorescence (FISH) sur métaphases obtenues à partir des cellules mononuclées du patient 06-H006 en phase blastique de la leucémie myéloïde chronique avec le BAC RP11-1089N22 (couleur orange), démontre un signal au niveau du chromosome 17 normal et au niveau des chromosomes réarrangés der(7) et der(17), indiquant un point de cassure dans la partie 5' de *MSI2* entre les exons 1 et 6. **B)** L'analyse par FISH sur métaphases avec le BAC RP11-959D16 (couleur orange) démontre un signal

au niveau du chromosome 17 normal et au niveau du chromosome dérivé 7, der (7), révélant un point de cassure centromérique par rapport à la position de ce BAC.

2.4. Identification des transcrits de fusion *MSI2-HOXA9* dans la translocation t(7;17)(p15;q22)

Les résultats de l'analyse FISH révèlent un nouveau point de cassure au niveau du gène *MSI2* entre les exons 1 et 6. Le gène *MSI2* (taille génomique : 424 kb) s'étend sur 14 exons et possède deux principaux transcrits, le variant 1 (NM_138962.2) et le variant 2 (NM_170721.1) comprenant 14 et 11 exons respectivement. L'absence des derniers exons dans le transcrit variant 2 n'affecte pas la structure de la protéine puisque les exons 12, 13 et 14 ne sont pas traduits. *MSI2* possède deux domaines RRM « RNA Recognition motifs ». Le premier domaine RRM commence à partir du deuxième nucléotide de l'exon 2 et couvre les exons 2, 3, 4 et les trois premiers nucléotides de l'exon 5. Le deuxième domaine RRM débute au 19^{ème} nucléotide de l'exon 6 et couvre les exons 6, 7, 8 et une partie de l'exon 9 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/25121991?report=graph>). Nous avons identifié par RT-PCR et séquençage la présence des exons correspondant au premier domaine RRM de *MSI2* au niveau des deux nouveaux transcrits de fusion *MSI2-HOXA9*. Ces nouveaux transcrits chimériques fusionnent l'exon 5 ou l'exon 6 alternatif de *MSI2* avec l'exon 1 de *HOXA9* (Figure 20). Le gène *HOXA9* d'une taille de 3.09 kb, comprend 2 exons et possède une seule séquence référence représentative du transcrit principal de *HOXA9* (NM_152739.3). Nous avons identifié dans notre cas avec la t(7;17), un point de cassure au début de l'exon 1b (nucléotides TT), l'exon 1 de *HOXA9* étant anciennement subdivisé en exons 1a et 1b (Kim et al., 1998), tel que rapporté dans la majorité des translocations ciblant *HOXA9* (Barbouti et al., 2003; Borrow et al., 1996) (Figure 20B). Malgré un point de cassure commun au niveau de *HOXA9*, les fusions *MSI2-HOXA9* détectées dans notre cas ne respectent pas le cadre de lecture contrairement aux translocations impliquant *HOXA9* rapportées précédemment (Barbouti et al., 2003; Borrow et al., 1996). Suite à la fusion *MSI2-HOXA9* détectée dans notre cas, il y a un décalage du cadre de lecture pour les deux transcrits chimériques ce qui mène à l'absence du domaine homéobox caractéristique des gènes *HOX*, localisé au niveau de l'exon 2 (Figure 20). Les

fusions identifiées représentent donc des formes tronquées de MSI2 avec présence du premier domaine RRM seulement.

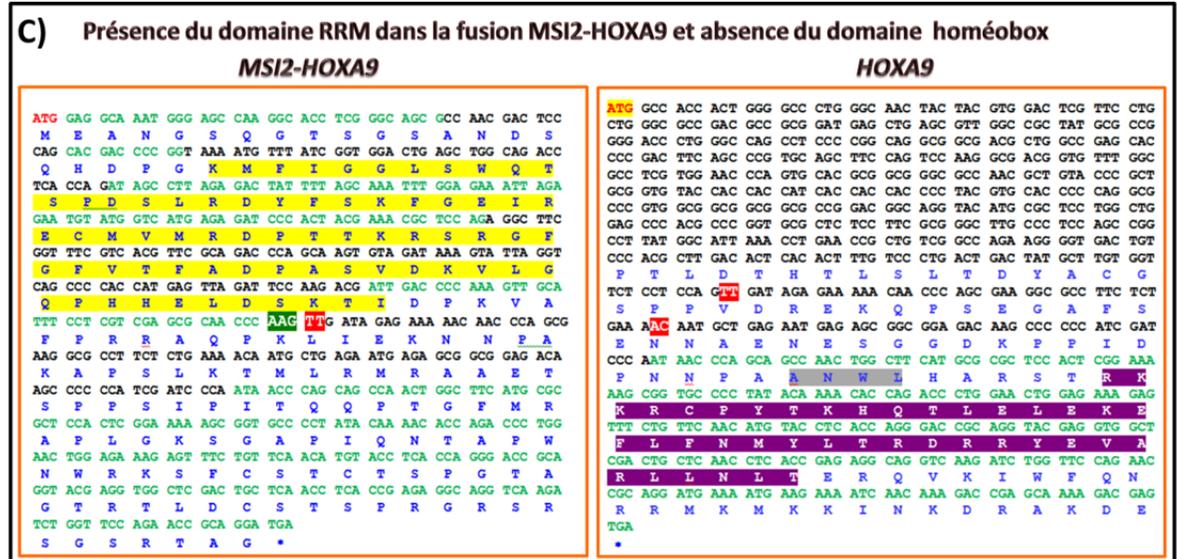
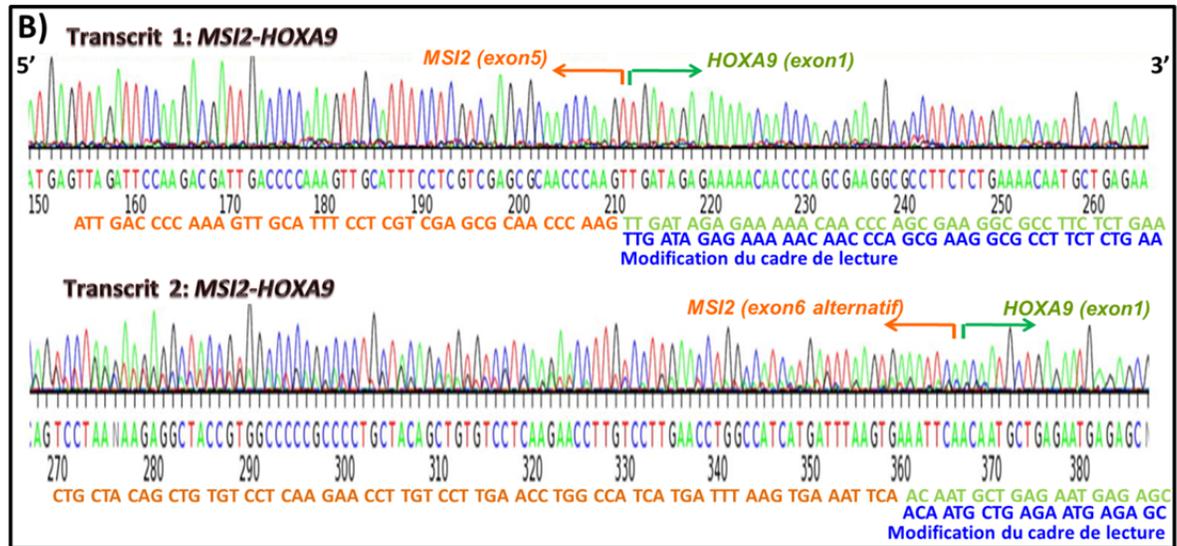
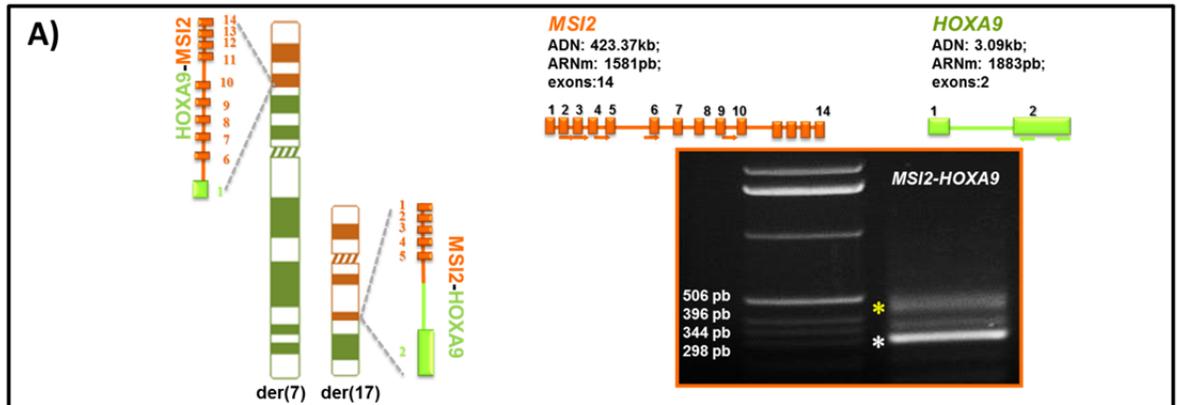


Figure 20. Identification des transcrits de fusion *MSI2-HOXA9* dans la translocation t(7;17).

A) Les résultats du FISH suggèrent une fusion de la partie 5' de *MSI2* avec la partie 3' de *HOXA9* sur le chromosome dérivé der(17) et une fusion réciproque potentielle *HOXA9-MSI2* sur le chromosome dérivé der(7). Le gel de bromure d'éthidium à 2% montre des produits d'amplification d'une fusion *MSI2-HOXA9* par RT-PCR, obtenus à partir des cellules mononuclées du patient 06H006 avec la t(7;17) en phase blastique de la leucémie myéloïde chronique. Les amorces utilisées sont localisées dans l'exon 2 de *MSI2* (amorce 135, sens) et dans l'exon 1 de *HOXA9* (amorce 138, antisens). Les deux produits séquencés sont le produit principal de 308 pb (bande intense avec l'étoile blanche) et le produit de 413 pb (bande moins intense avec l'étoile jaune). **B)** Séquences partielles des deux transcrits de fusions *MSI2-HOXA9*. Un premier transcrit chimérique (transcrit principal) fusionne l'exon 5 de *MSI2* avec l'exon 1 de *HOXA9* et un deuxième transcrit chimérique fusionne l'exon 6 alternatif de *MSI2* avec l'exon 1 de *HOXA9*. **C)** Analyse de la séquence de fusion du transcrit 1 principal *MSI2-HOXA9* comparée à la séquence de *HOXA9* sauvage. Les exons de *MSI2-HOXA9* et de *HOXA9* sont alternés en vert et en noir. Le cadre de lecture n'est pas respecté et le premier domaine RRM « RNA Recognition Motif » de *MSI2* (surligné en jaune) est présent dans le produit prédit résultant de cette fusion. Au niveau de la jonction (point de cassure de la translocation), les trois derniers nucléotides de l'exon 5 de *MSI2*, AAG (surlignés en vert), et les deux nucléotides TT du triplet GTT (surlignés en rouge) de l'exon 1 de *HOXA9* sont présents. Le décalage de lecture est donc causé par l'absence d'un nucléotide G. Le domaine homéobox (surligné en mauve) codé par l'exon 2 de *HOXA9* sauvage, ainsi que le motif d'interaction avec MEIS1 (surligné en gris) ne sont pas présents dans la fusion *MSI2-HOXA9*. Les deux points de cassure de la translocation t(7;17) au niveau de *HOXA9* sont surlignés en rouge.

2.5. Identification de deux nouvelles fusions *MSI2-HOXA10* et *MSI2-HOXA11* dans notre cas avec la translocation t(7;17)/*MSI2-HOXA9*

Plusieurs gènes du locus *HOXA* sont transloqués dans les leucémies, tels que *HOXA9*, *HOXA11* et *HOXA13*, avec le gène partenaire *NUP98* dans la t(7;11)(p15;p15) (Borrow et al., 1996; Fujino et al., 2002; Mizoguchi et al., 2009; Taketani et al., 2002a). Afin d'investiguer la possibilité d'une altération d'un autre gène *HOXA* en fusion avec *MSI2* dans notre cas avec la t(7;17), nous avons tenté d'amplifier d'autres fusions potentielles *MSI2-HOXA*. En RT-PCR nous avons utilisé des amorces localisées au niveau de l'exon 2 de *MSI2* (amorce 135) et au niveau des exons 2 ou 3 de *HOXA5*, *HOXA6*, *HOXA7*, *HOXA10*, *HOXA11* et *HOXA13* (amorces : 353, 355, 357, 140, 361, 365 respectivement). Nous avons isolé deux nouveaux transcrits de fusion, soit *MSI2-HOXA10* et *MSI2-HOXA11*. Au niveau du locus *HOXA*, les gènes *HOXA9*, *HOXA10* et *HOXA11* se succèdent dans la même orientation, dans une région de 25 kb (Figure 21A). Les gènes *HOXA11* et *HOXA10* sont de 3.7 kb et 9.63 kb respectivement. Ils sont composés de deux exons et leur domaine homéobox est situé au niveau de l'exon 2. Un transcrit représentatif majeur *HOXA11* (NM_005523.5) code pour la protéine homéobox. Pour *HOXA10*, trois transcrits majeurs sont connus, le transcrit variant 1 (NM_018951.3), le transcrit variant 2 (NR_037939.1) non codant, ainsi que le transcrit résultant de l'épissage alternatif entre *HOXA9* et *HOXA10* non codant et récemment validé (USCS RefSeq, Mar 2011 : <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?hgsid=288302817>). Les deux fusions chimériques *MSI2-HOXA10* et *MSI2-HOXA11* détectées dans notre cas, fusionnent l'exon 5 de *MSI2* avec l'exon 2 de *HOXA10* et *HOXA11* (Figure 21B). Comme pour la fusion *MSI2-HOXA9*, *MSI2-HOXA10* et *MSI2-HOXA11* ne respectent pas le cadre de lecture. En effet, l'exon 2 de *HOXA11* fusionne avec *MSI2* à partir du deuxième nucléotide. Le premier nucléotide de l'exon 2 de *HOXA11* étant absent de la fusion, le cadre de lecture n'est pas respecté (Figure 21B). Dans la fusion *MSI2-HOXA10*, l'exon 5 de *MSI2* fusionne avec l'exon 2 de *HOXA10*. Le cadre de lecture est encore une fois décalé à cause de l'absence d'un nucléotide au niveau du point de fusion avec *HOXA10*. Donc, les trois

fusions identifiées dans notre cas, *MSI2-HOXA9*, *MSI2-HOXA10* et *MSI2-HOXA11* sont caractérisées par l'absence du domaine homéobox du gène *HOXA* impliqué et la présence du premier domaine RRM de *MSI2*. Les trois fusions représentent des formes tronquées de *MSI2* avec présence d'un seul domaine RRM.

Figure 21. Identification des transcrits de fusions *MSI2-HOXA10* et *MSI2-HOXA11* dans la translocation t(7;17).

A) Translocation des gènes *HOXA9*, *HOXA10* et *HOXA11* sur le dérivé du chromosome 17, der(17) en aval de la partie 5' de *MSI2*. Une partie du locus *HOXA*, incluant *HOXA9*, *HOXA10* et *HOXA11*, est transloquée à la partie 5' de *MSI2* au niveau du chromosome dérivé 17. À gauche, le gel de bromure d'éthidium à 2% montre le produit d'amplification *MSI2-HOXA10* (~ 360 pb) de la RT-PCR, obtenu à partir des cellules mononuclées du patient 06H006 présentant la t(7;17) en phase blastique de la leucémie myéloïde chronique. Les amorces utilisées sont localisées dans l'exon 2 de *MSI2* (amorce sens, 135) et dans l'exon 2 de *HOXA10* (amorce anti-sens, 358). À droite, le gel de bromure d'éthidium à 2% montre le produit d'amplification *MSI2-HOXA11* (~ 350 pb) de la RT-PCR, obtenu à partir des cellules mononuclées du patient 06H006 présentant la t(7;17) en LMC-PB. Les amorces utilisées sont localisées dans l'exon 2 de *MSI2* (amorce sens, 135) et dans l'exon 2 de *HOXA11* (amorce anti-sens, 140). Le marqueur moléculaire utilisé pour les deux gels est le 1 kb. **B)** Séquences partielles des transcrits de fusion *MSI2-HOXA10* et *MSI2-HOXA11*. Le premier transcrit chimérique fusionne l'exon 5 de *MSI2* avec l'exon 2 de *HOXA10* et le deuxième transcrit chimérique fusionne l'exon 5 de *MSI2* avec l'exon 2 de *HOXA11*. **C)** Analyse de la séquence de fusion du transcrit *MSI2-HOXA11* comparée à la séquence de *HOXA11* sauvage. Les exons de *MSI2-HOXA11* et de *HOXA11* sont alternés en vert et en noir. Le cadre de lecture n'est pas respecté et le premier domaine RRM « RNA Recognition Motif » de *MSI2* (surligné en jaune) est présent dans le produit prédit résultant de cette fusion. Au niveau de la jonction (point de cassure de la translocation), les trois derniers nucléotides de l'exon 5 de *MSI2* AAG (surlignés en vert) et les deux nucléotides GT (surlignés en rouge) du triplet AGT de l'exon 2 de *HOXA11* sont présents. Le décalage de lecture est causé par l'absence d'un nucléotide A. La séquence de *HOXA11* sauvage est démontrée sur le schéma de droite. Le domaine homéobox codé par l'exon 2 (surligné en mauve) n'est pas présent dans la fusion *MSI2-HOXA11*. Le point de cassure au niveau de *HOXA11* est surligné en rouge.

2.6. Activation des gènes *HOXA* et épissage alternatif de *HOXA9* dans la translocation t(7;17)(p15;q22)

Suite à la translocation t(7;17) et au positionnement de *MSI2* en 5' des gènes *HOXA*, ces derniers peuvent être activés sous la dépendance de la région promotrice de *MSI2*. D'autre part, un changement du statut de la chromatine des gènes *HOXA* pourrait être causé par un repositionnement des domaines chromatinien lors de l'échange de matériel chromosomique entre les chromosomes 7 et 17. En effet, suite à la translocation chromosomique t(7;17) les éléments régulateurs *cis* et/ou *trans* et les modifications de la chromatine en conformation moins condensée peuvent aussi être à l'origine de l'activation des gènes *HOXA*. La majorité des gènes *HOXA* sont préférentiellement exprimés au niveau des populations enrichies de CSHs et des progéniteurs immatures. Leur expression diminue avec la différenciation (Argiropoulos and Humphries, 2007). Afin d'investiguer l'expression des gènes *HOXA* et les conséquences de la t(7;17) sur leur épissage, nous avons amplifié par PCR les cDNA de *HOXA5*, *HOXA6*, *HOXA7*, *HOXA9*, *HOXA10*, *HOXA11*, *HOXA13*. Pour les gènes *HOXA9*, *HOXA10* et *HOXA11*, nous avons étudié l'allèle normal (allèle non fusionné avec *MSI2*) en utilisant des amorces ciblant l'exon 1 absent dans les trois fusions. Les résultats révèlent une activation des gènes *HOXA6*, *HOXA7*, *HOXA10* ainsi que trois transcrits de *HOXA9*. Cependant, les gènes *HOXA5*, *HOXA11* et *HOXA13* ne sont pas exprimés. Ces résultats suggèrent que le point de cassure le plus probable au niveau génomique est dans l'intron 1 du gène *HOXA11* (Figures 22A, B). Suivant cette hypothèse, *MSI2* ne peut activer *HOXA13* qui est resté sur le chromosome dérivé 7 ainsi que *HOXA11* sauvage. La juxtaposition de *MSI2* dans cette position pourrait induire l'activation des transcrits en 3' de *HOXA11*, soit *HOXA6*, *HOXA7*, *HOXA9* et *HOXA10* dans notre cas.

Le séquençage a confirmé la présence des transcrits de *HOXA6*, *HOXA7* et *HOXA9*. Le transcrit *HOXA10* n'a pas été testé. Les transcrits 1 et 2 de *HOXA9*, (Figure 22C) ont une séquence identique à partir du 30ème nucléotide. Les 30 nucléotides manquants en 5' de la séquence pourraient expliquer la différence de taille entre les deux bandes amplifiées. De façon intéressante, nous avons détecté un troisième transcrit de *HOXA9* (nommé

HOXA9T), récemment identifié en 2012 par He et collaborateurs dans des leucémies avec réarrangements du gène *MLL* (He et al., 2012). L'épissage alternatif au niveau de ce transcrit cause un codon STOP prématuré entraînant l'absence du domaine homéobox (Figures 22C et 23). Il s'agit du même site d'épissage alternatif que le transcrit *HOXA9-HOXA10* non codant, rapporté récemment sur le site UCSC. Il est intéressant de noter que le point de fusion de *MSI2-HOXA9* est localisé au niveau du site d'épissage alternatif de *HOXA9* (Figure 23).

MSI2-HOXA9, *HOXA9* transcrit 1 et *HOXA9* transcrit 2. La séquence du transcrit *HOXA9-HOXA10* (<http://genome.ucsc.edu/>) est indiquée pour comparaison avec les trois transcrits détectés dans les cellules du cas 06H006 avec la translocation t(7;17). Un site commun d'épissage alternatif (flèche rouge) est partagé par les transcrits *MSI2-HOXA9*, transcrit 1 *HOXA9* sauvage et transcrit 2 *HOXA9* sauvage (*HOXA9T*). Le transcrit chimérique *HOXA9-HOXA10* publié partage le même site d'épissage que les trois transcrits identifiés dans notre cas. À droite, séquence nucléotidique du transcrit 1 principal de *HOXA9* et épissage alternatif du transcrit 2 de *HOXA9*. Les nucléotides dans le cadre orange sont absents du transcrit 2. Cet épissage produit un codon STOP prématuré TGA (étoile rouge). Les nucléotides TT et AC surlignés en rouge sont les deux points de cassure de la translocation t(7;17). Le domaine homéobox (surligné en mauve) codé par l'exon 2 de *HOXA9*, ainsi que le motif d'interaction avec MEIS1 (surligné en gris) sont absents du transcrit 2 de *HOXA9*.

2.7. Expression des gènes *HOXA* dans d'autres leucémies

Plusieurs gènes *HOXA* sont exprimés dans le cas 06H006 en phase blastique de la LMC avec la t(7;17). Nous avons aussi évalué par RT-PCR, l'expression de ces gènes dans 7 autres cas de leucémies (Tableau VIII et Figure 24). Tel que démontré à la figure 24, un autre échantillon de patient en LMC-PB (08H037) sur trois étudiés, exprime les gènes *HOXA6*, *HOXA7* et *HOXA9*. Les trois échantillons de LAM de type M1 testés expriment également ces gènes. Une LAM de type M2 (04H041) avec présence d'une mutation du gène *NPM1* exprime ces trois gènes *HOXA*, alors que leur expression est absente dans une LAM de type M4 (05H050) sans mutation de *NPM1*. Une corrélation entre la présence d'une mutation au niveau de l'exon 12 de *NPM1* et la surexpression de certains gènes *HOX* a été rapportée précédemment (Verhaak et al., 2005). On note que les trois LAM M1 (04H112, 08H053 et 09H002) qui expriment *HOXA6*, *HOXA7* et *HOXA9* (Figure 24) ont des caryotypes normaux.

Tableau VIII. Liste des échantillons utilisés pour l'étude de l'expression des gènes *HOXA6*, *HOXA7* et *HOXA9* par RT-PCR.

Code BCLQ	Diagnostic	Blastes (%)	Caryotype
06H006	LMC-PB	35	46,XY,t(7;17)(p15,q2?2),t(9;22)(q34.1;q11.2)[9]/47,idem,+der(22),t(9;22)(q34.1;q11.2)[14]
04H027	LMC-PB (lymphoblastique)	88	Quantité de cellules insuffisante
04H049	LMC-PB	49	46,XY,t(9;22)(q34.1;q11.2) [18]/47,idem,+8[2]
08H037	LMC-PB	71	46,XY,t(9;22)(q34.1;q11.2) [20]
04H112	LAM-M1	90	46,XX[21]
08H053	LAM-M1	95	46,XX[21]
09H002	LAM-M1	78	46,XX[23]
05H050	LAM-M4	94	46,XY[20] / <i>NPM1</i> non muté
04H141	LAM-M2	60	46,XY[20]/ <i>NPM1</i> muté

Tableau VIII. Liste des échantillons utilisés pour l'étude de l'expression des gènes *HOXA6*, *HOXA7* et *HOXA9* par RT-PCR. Différents types morphologiques et génétiques de leucémies sont représentés. Leucémie myéloïde aiguë (LAM) de type M1 : 04H112, 08H053 et 09H002, M4 : 05H050 et M2 : 04H141. Les cas 06H006, 04H027, 04H049, 08H037 sont des leucémies myéloïdes chroniques en phase blastique (LMC-PB) incluant un cas de LMC en phase blastique de type lymphoblastique (04H027).

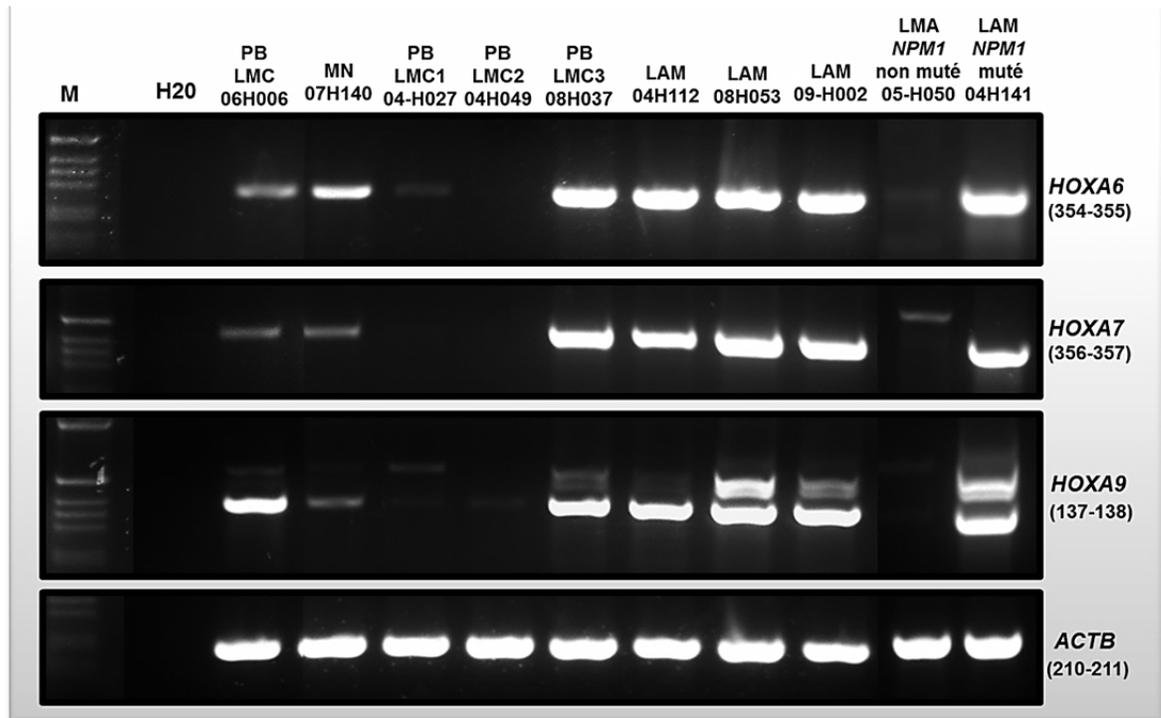


Figure 24. Expression des gènes *HOXA6*, *HOXA7* et *HOXA9* dans la phase blastique de la leucémie myéloïde chronique et dans la leucémie aiguë myéloïde.

Le gel de bromure d'éthidium à 2% montre les produits amplifiés par RT-PCR obtenus à partir des cellules mononuclées de patients en phase blastique de la leucémie myéloïde chronique (LMC-PB) et de patients avec des leucémies aiguës myéloïdes (LAM). Puits de gauche à droite : marqueur de poids moléculaire 1Kb; produit d'amplification de *ACTB* (gène contrôle) avec les amorces 210 et 211, contrôle sans ARN (H2O); cas 06H006 en LMC-PB avec la translocation t(7;17); moelle normale (MN) 07H140; cas 04H027, 04H049 et 08H037 (LMC-PB); cas 04H112, 08H053, 09H002, 05H050 et 04H141 (LAM). La première ligne horizontale correspond au produit d'amplification de *HOXA6* avec les amorces 354 et 355 (258 pb), la deuxième ligne horizontale correspond au produit d'amplification de *HOXA7* avec les amorces 356 et 357 (385 pb) et la troisième ligne horizontale correspond au produit d'amplification de *HOXA9* avec les amorces 137 et 138 (transcrit 1 *HOXA9* : 531 pb, transcrit 2 : 500 pb, transcrit 3 : 358 pb). La dernière ligne horizontale correspond au produit d'amplification de *ACTB* (gène contrôle) avec les amorces 210 et 211 (192 pb).

3. Investigation de la translocation t(8;17)(q11;q22) en phase accélérée de la leucémie myéloïde chronique (cas 02H037)

3.1. Présentation clinique et analyses cytogénétiques

Le patient âgé de 40 ans s'est présenté en mars 2001 avec une leucocytose importante, une perte de vision subite à l'œil gauche secondaire à une thrombose rétinienne et une splénomégalie importante. Sa formule sanguine démontrait $332,000 \times 10^9/L$ globules blancs, une hémoglobine à 123g/L et un décompte plaquettaire à $548 \times 10^9/L$. Le frottis sanguin périphérique montrait une myélémie étagée et une basophilie. Les résultats du médullogramme et de la cytogénétique ont confirmé le diagnostic de LMC en phase chronique avec une formule chromosomique à $46,XY,t(9;22)(q34;q11.2)[22]$. En raison de la leucocytose sévère avec complication vasculaire oculaire, le patient a subi une leucaphérèse, puis il a été traité avec une chimiothérapie (Hydroxyurée). Le patient a ensuite subi une allogreffe de cellules hématopoïétiques avec un donneur apparenté, qui s'est compliquée d'une maladie du greffon contre l'hôte sévère. Un caryotype standard effectué en juillet 2002 a montré la formule chromosomique suivante : $47,XY,t(8;17)(q11;q22),t(9;22)(q34.1;q11.2),+der(22)t(9;22)(q34.1;q11.2)[21]$ (Figure 25), révélant la présence d'une translocation t(9;22), un deuxième Ph et une translocation t(8;17) additionnelle dans toutes les métaphases analysées. L'analyse FISH a révélé la présence de la fusion *BCR-ABL1* dans 95% des cellules interphasiques. La présence d'une blastose sanguine à 15%, d'une blastose médullaire à 14% avec 36% de basophiles, ainsi que l'analyse cytogénétique, ont confirmé le diagnostic de LMC en transformation. Le patient est décédé des complications de la greffe et d'une progression de sa maladie le 23 septembre 2002.

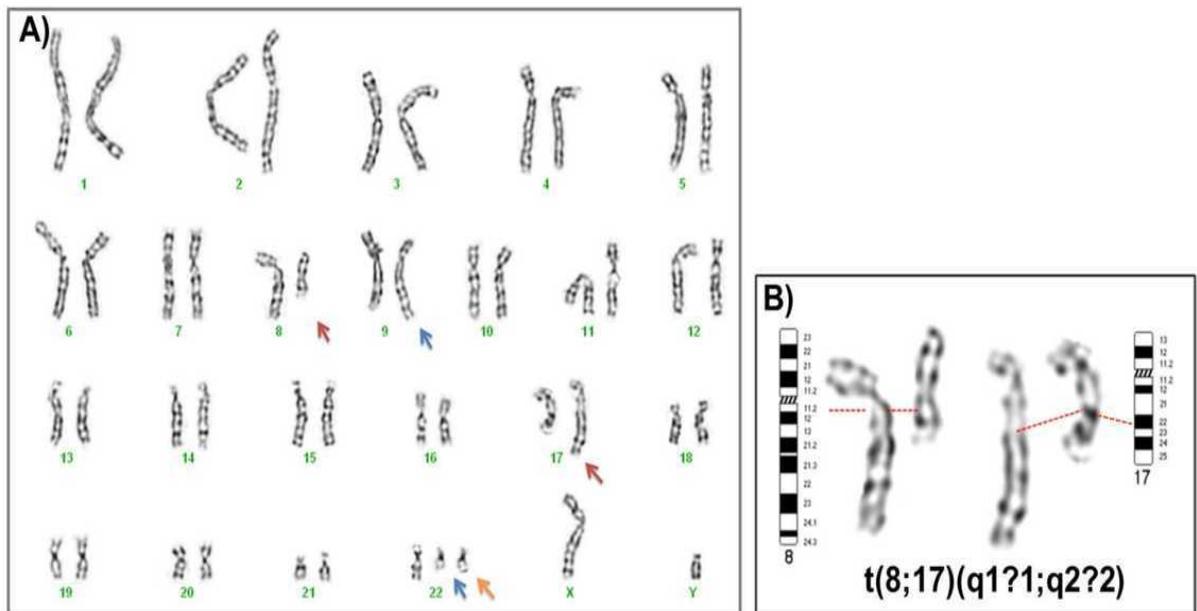


Figure 25. Caryotype en bandes GTG révélant la présence des translocations chromosomiques $t(9;22)$ et $t(8;17)$ chez le patient 02H037.

A) Caryotype en bandes GTG avec une résolution de 500 bandes, effectué à partir des cellules mononuclées du patient 02H037 en phase accélérée de la leucémie myéloïde chronique révèle une translocation $t(9;22)(q34.1;q11.2)$ (flèches bleues), un deuxième Ph (flèche orange), ainsi qu'une translocation chromosomique entre les bras longs des chromosomes 8 et 17 (flèches rouges). **B)** Caryotype partiel et idiogrammes des chromosomes 8 et 17, suggérant des points de cassure au niveau des bandes chromosomiques 8q1?1 et 17q2?2.

3.2. Identification du point de cassure sur la bande chromosomique 8q11-8q12 et altération du locus *SOX17* dans la $t(8;17)$

La translocation $t(8;17)$ impliquant les bras longs des chromosomes 8 et 17 a été rapportée deux fois dans la littérature avec des points de cassure au niveau des bandes chromosomiques 8q13 et 17q23. Il faut cependant noter que le profil du marquage chromosomique en bandes G au niveau des régions impliquées dans la $t(8;17)$ montre une similarité des bandes qui peut ne pas donner une estimation précise des points de cassure cytogénétiques. Il est intéressant de noter que les deux cas rapportés sont des LMC en

transformation et que les gènes impliqués n'ont pas encore été identifiés (Mashal et al., 1990; Swolin et al., 1983). Au niveau du chromosome 8, grâce à l'analyse FISH nous avons délimité la région à investiguer de 10Mb à moins de 1 Mb. Nous avons ciblé en premier le gène candidat *PLAG1* en 8q12.1 qui est impliqué dans des réarrangements chromosomiques dans les lipoblastomes (Hibbard et al., 2000). Le FISH métaphasique ciblant le gène *PLAG1* avec le BAC RP11-122D2 a révélé une position centrométrique du point de cassure. Un deuxième BAC en 8q12.1, RP11-246M7 qui couvre le gène *TGS1* et une partie du gène *LYN* indique un point de cassure centromérique à cette position (Figure 26). L'hybridation *in situ* avec les BACs RP11-13I4 et RP11-845K20, localisés sur la bande 8q11.2, montre une position télomérique du point de cassure. Ces résultats délimitent la région d'intérêt à 1 Mb entre les bandes chromosomiques 8q11.23 et 8q12.1 (Figure 26). Dans cette région, au niveau de la sous-bande chromosomique 8q11.23 nous avons ciblé le gène *SOX17* impliqué dans l'hématopoïèse néonatale chez la souris (Kim et al., 2007). Le BAC RP11-30G11 a montré un réarrangement du locus *SOX17* qui a ensuite été confirmé avec un deuxième BAC, le RP11-359F18. À noter que ces deux BACs couvrent seulement le gène *SOX17* (Figure 27).

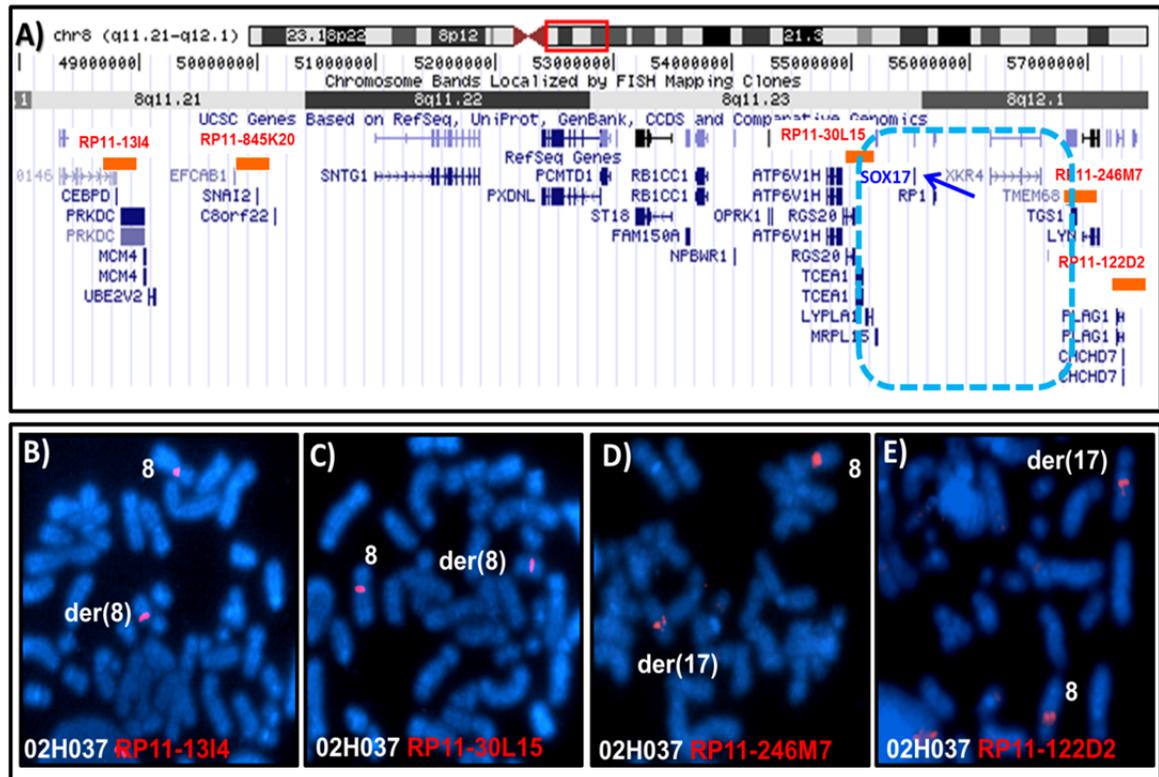


Figure 26. Délimitation de la région chromosomique 8q11-8q12 impliquée dans la translocation $t(8;17)(q1?1;q2?2)$ par hybridation *in situ* en fluorescence.

A) Régions et gènes ciblés par les BACs (notés en orange) localisés au niveau des bandes chromosomiques 8q11 et 8q12. **B) et C)** Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) sur les métaphases obtenues à partir des cellules mononuclées du patient 02H037 en phase accélérée de la leucémie myéloïde chronique. Les BACs RP11-1314 et RP11-30L15 ciblant la région 8q11.21 donnent un signal d'hybridation localisé au niveau du chromosome 8 normal et du chromosome dérivé 8, der(8), indiquant une position télomérique du point de cassure. **D) et E)** FISH sur les métaphases obtenues à partir des cellules mononuclées du patient 02H037. Les BACs RP11-122D2 et RP11-246M7 ciblant les gènes *PLAG1* et *LYN* respectivement, donnent un signal d'hybridation localisé au niveau du chromosome 8 normal et du chromosome dérivé 17, der(17), indiquant une position centromérique du point de cassure. La région qui reste à investiguer (cadre bleu pointillé) est localisée entre les bandes chromosomiques 8q11.23 et 8q12.1. Le gène candidat dans cette région est le gène *SOX17* (pointé avec une flèche bleue).

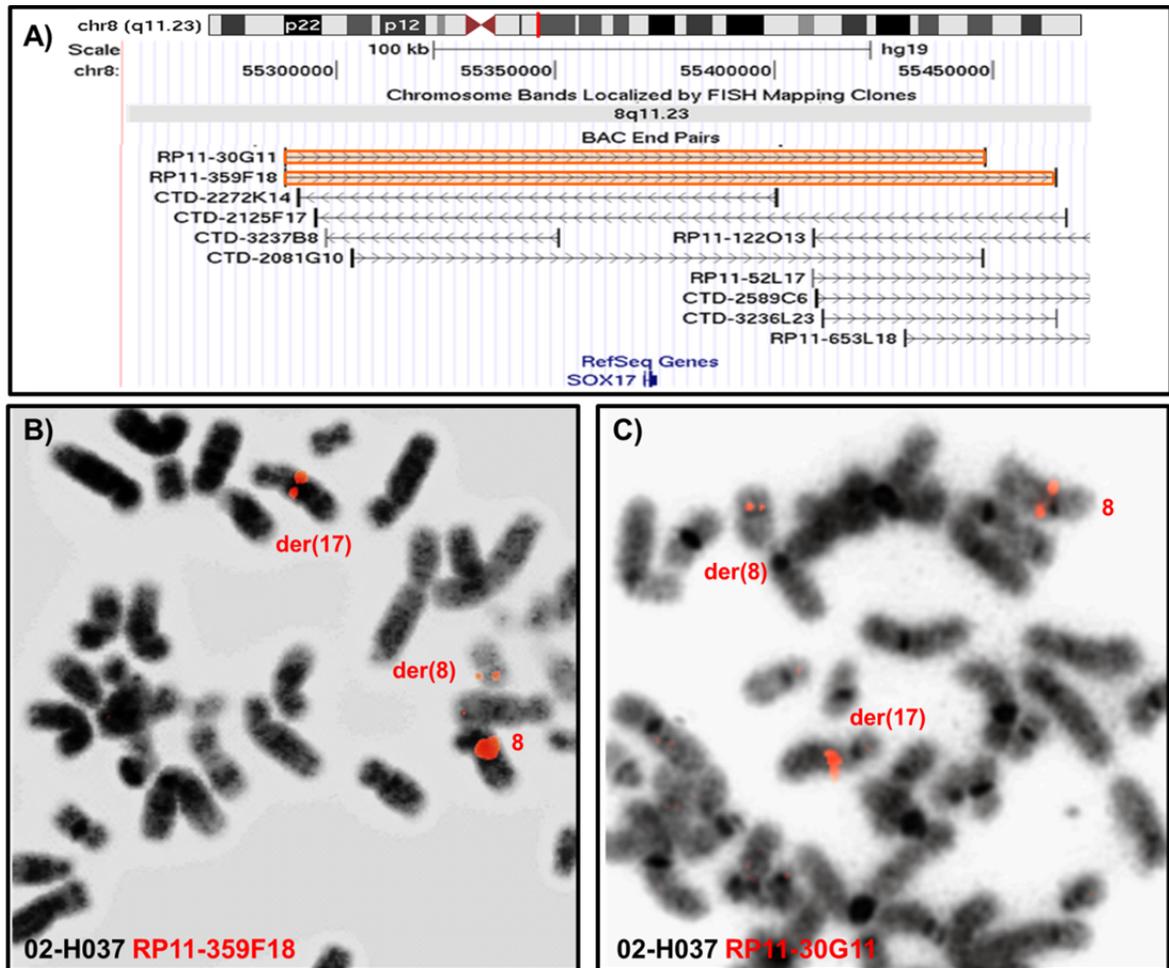


Figure 27. Identification du réarrangement du locus *SOX17* dans la translocation t(8;17) par hybridation in situ en fluorescence.

A) Localisation des BACs utilisés en hybridation in situ en fluorescence (FISH) au niveau du locus *SOX17* sur la bande chromosomique 8q11.23. **B)** et **C)** Analyse par FISH sur les métaphases obtenues à partir des cellules mononuclées du patient 02H037 en phase accélérée de la leucémie myéloïde chronique avec les BACs RP11-359F18 et RP11-30G11 couvrant le locus *SOX17* (région de 150kb approximativement). Les deux BACs hybrident sur le chromosome 8 normal et sur les deux chromosomes réarrangés, der(8) et der(17), révélant un réarrangement du locus *SOX17*.

3.3. Identification du point de cassure sur la bande chromosomique 17q22 et altération du gène *MSI2* dans la t(8;17)

Lors de l'investigation de la t(8;17), nous avons étudié plusieurs gènes candidats sur le chromosome 17 entre les bandes chromosomiques 17q22 et 17q24.2. Nous avons d'abord ciblé la partie 5' de *MSI2* avec le BAC 1089N22, qui a indiqué un point de cassure télomérique à cette position. Les autres BACs étudiés, localisés sur les bandes chromosomiques 17q24 et 17q23 hybridait au niveau du chromosome 17 normal et du chromosome 8 réarrangé suggérant une position centromérique du point de cassure (Figure 28). Nous nous sommes rapprochés jusqu'à la position du locus *MSI2* (Fig. 28). Le BAC RP11-22E20 en position 3' du gène *MSI2* a révélé un point de cassure entre l'intron 7 et l'exon 14 de ce gène (Figure 29). Les deux BACs réarrangés au niveau des chromosomes 8 (RP11-30G11) et 17 (RP11-22E20) ont ensuite été hybridés ensemble afin de confirmer la fusion au niveau génique. Deux signaux de fusion sont observés sur les chromosomes dérivés der(8) et der(17) (Figure 30) avec le BAC couvrant les exons 7 à 14 de *MSI2* et le BAC couvrant le gène *SOX17*.

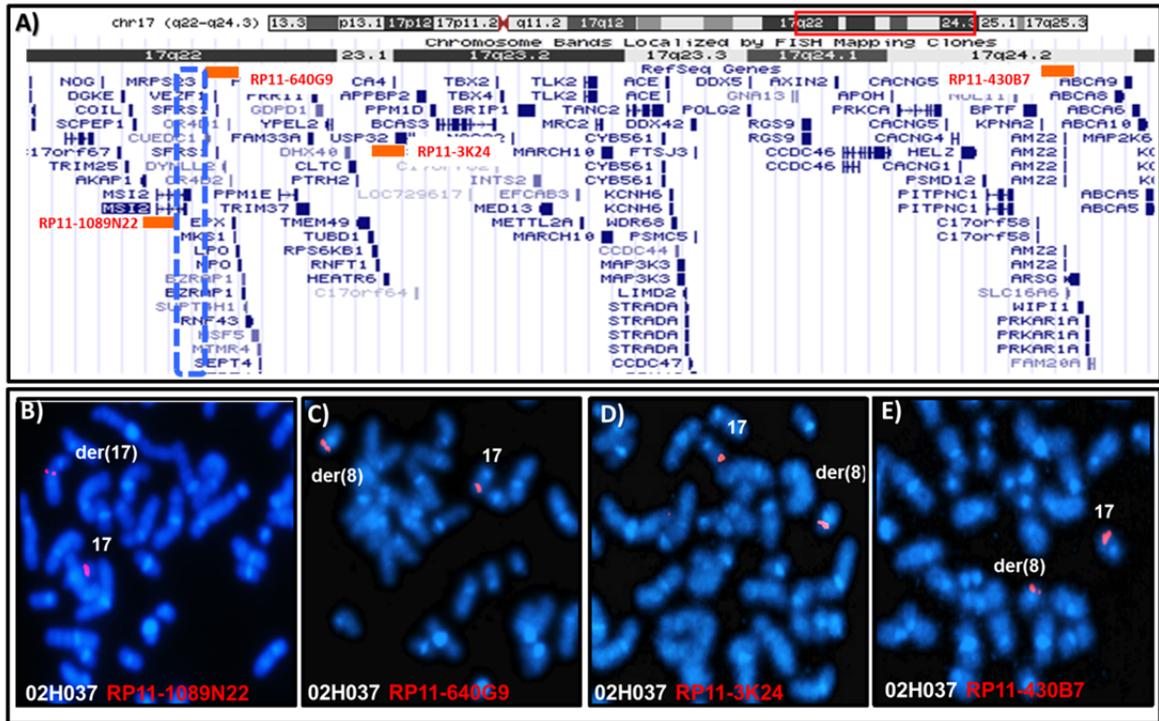


Figure 28. Délimitation de la région chromosomique au niveau des bras longs du chromosome 17, impliquée dans la translocation $t(8;17)$ par hybridation *in situ* en fluorescence.

A) Régions et gènes ciblés par les BACs (notés en orange) localisés au niveau des bandes chromosomiques 17q22-q24.3. **B)** Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) sur les métaphases obtenues à partir des cellules mononuclées du patient 02H037 en phase accélérée de la leucémie myéloïde chronique. Les BACs RP11-430B7, RP11-3K24 et RP11-640G9, localisés respectivement sur les bandes chromosomiques 17q24.2, 17q23.1 et 17q22, donnent un signal d'hybridation (couleur rouge) sur le chromosome 17 et sur le chromosome dérivé 8 indiquant une position centromérique du point de cassure. Le BAC RP11-1089N22 (couleur rouge) qui couvre les exons 1 à 6 de *MSI2*, hybride sur le chromosome 17 et sur le chromosome dérivé 17, der(17), indiquant une position télomérique du point de cassure.

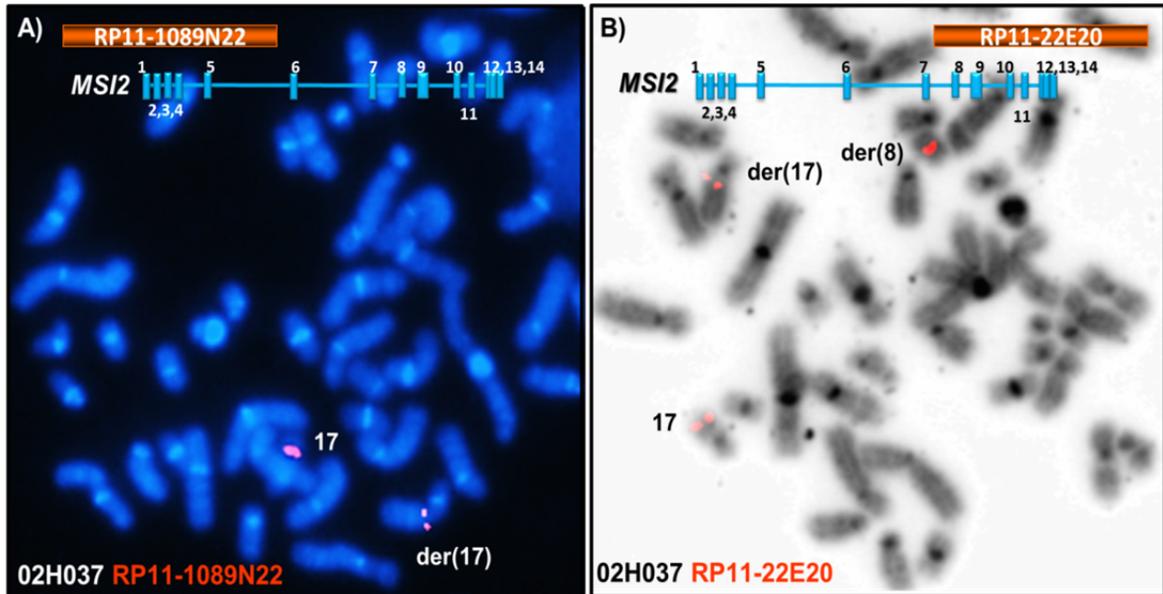


Figure 29. Identification du réarrangement du gène *MSI2* dans la translocation *t(8;17)* par hybridation in situ en fluorescence.

A) Hybridation in situ en fluorescence (FISH) sur les métaphases obtenues à partir des cellules mononuclées du patient 02H037 en phase accélérée de la leucémie myéloïde chronique avec le BAC RP11-1089N22 (couleur rouge) ciblant les exons 1 à 6 du gène *MSI2*. Les signaux d'hybridation au niveau du chromosome 17 normal et du chromosome dérivé 17, der(17), révèlent une position télomérique du point de cassure. **B)** Analyse par FISH avec le BAC RP11-22E20 (couleur rouge) sur les métaphases obtenues à partir des cellules mononuclées du patient 02H037. Les signaux d'hybridation démontrent un signal d'hybridation au niveau des chromosomes réarrangés, der(8) et der(17), révélant un point de cassure de la translocation *t(8;17)* entre l'intron 7 et l'exon 14 de *MSI2*.

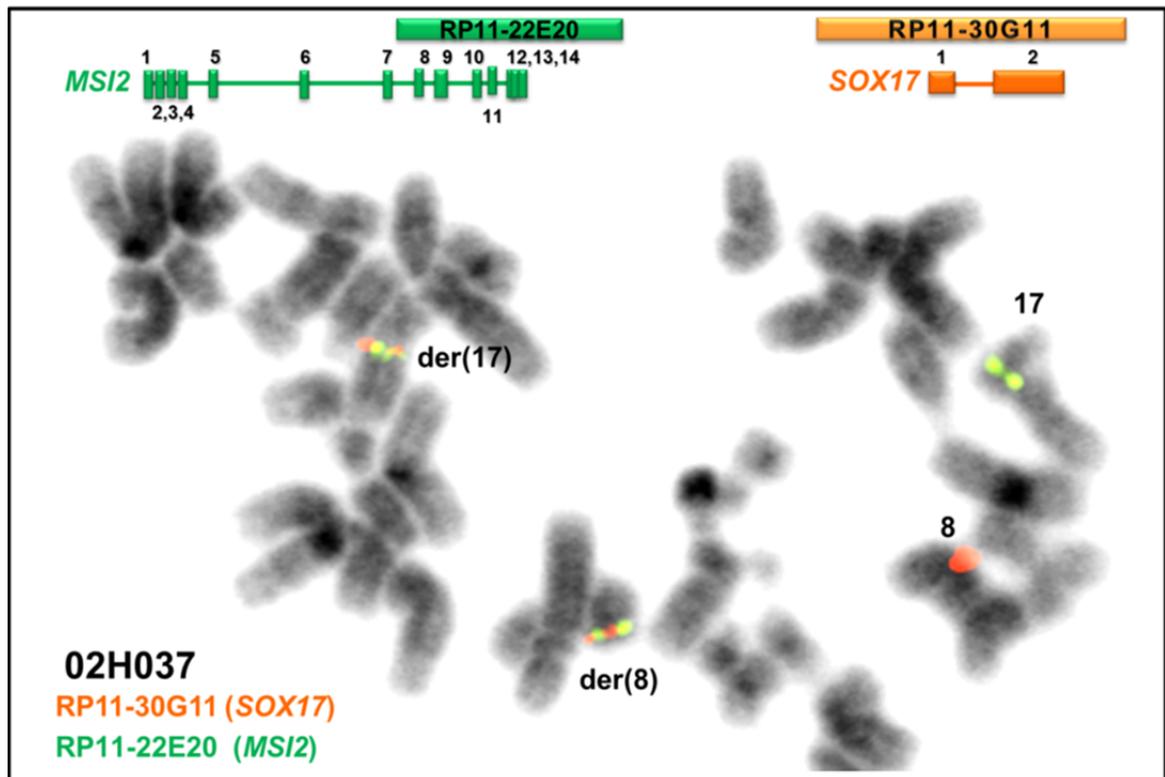


Figure 30. Identification de la fusion *MSI2-SOX17* dans la translocation t(8;17) par hybridation in situ en fluorescence.

Hybridation in situ en fluorescence (FISH) sur les métaphases obtenues à partir des cellules mononuclées du patient 02H037 en phase accélérée de la leucémie myéloïde chronique avec les BACs RP11-22E20 (couleur verte) et RP11-30G11 (couleur orange). Les BACs RP11-22E20 et RP11-30G11 qui couvrent les exons 7 à 14 du gène *MSI2* et le gène *SOX17* respectivement, montrent la présence de deux signaux de fusion au niveau des deux chromosomes réarrangés, der(8) et der(17), un signal vert au niveau du chromosome 17 normal et un signal orange au niveau du chromosome 8 normal.

3.4.Activation d'un nouveau transcrit de *SOX17* dans le cas avec la translocation t(8;17)

Plusieurs essais en RT-PCR et en RACE-PCR ont été réalisés pour tenter d'amplifier de possibles transcrits de fusion *MSI2-SOX17* et/ou *SOX17-MSI2* issus de la translocation t(8;17)(q11.23;q22). Cependant aucun transcrit chimérique n'a été obtenu par ces techniques avec les amorces que nous avons utilisées (amorces listées dans la section matériel et méthode Tableau V). L'implication de *MSI2* dans une translocation chromosomique qui n'engendre pas la formation d'un transcrit de fusion a déjà été rapportée et sera discutée ultérieurement (De Weer et al., 2008). Nous avons donc émis l'hypothèse que *SOX17* pourrait être activé suite à sa juxtaposition avec *MSI2*. Nos résultats démontrent que *SOX17* est activé suite à la t(8;17) et qu'il s'agit d'un nouveau transcrit alternatif de *SOX17*. Ce nouveau transcrit respecte le cadre de lecture et conserve le domaine HMG « High Mobility Group » caractéristique des protéines SOX (Figure 31). Ce domaine est codé par une partie de l'exon 1 ainsi qu'une partie de l'exon 2 (Figure 31C) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/145275218?report=graph>. Une seule séquence référence de *SOX17* existe à ce jour (NM_022454.3). Le gène *SOX17* est normalement exprimé lors de l'hématopoïèse embryonnaire mais il n'est pas exprimé dans les cellules souches hématopoïétiques adultes (Kim et al., 2007). Son expression aberrante dans notre cas avec la t(8;17) pourrait être causée par sa juxtaposition avec la région promotrice de *MSI2* et/ou par un changement de conformation de la chromatine suite à la t(8;17).

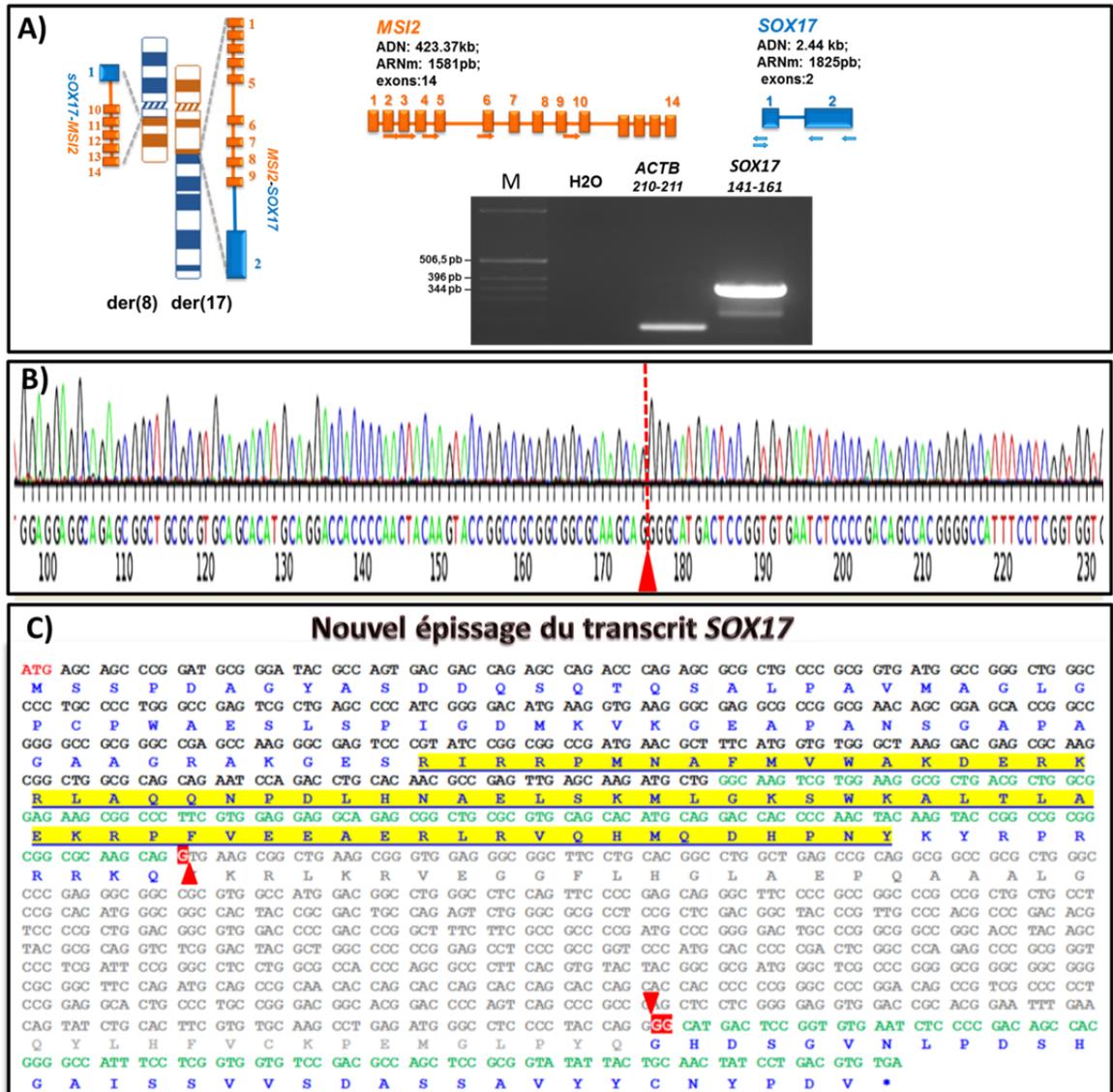


Figure 31. Activation d'un nouveau transcrit de *SOX17* dans la translocation t(8;17) détectée par RT-PCR et analysé par séquençage.

A) Les résultats de l'analyse FISH suggèrent une fusion *MSI2-SOX17* sur le chromosome dérivé 17, der(17), et une fusion potentielle *SOX17-MSI2* sur le chromosome dérivé 8, der(8). Différentes combinaisons d'amorces ont été utilisées en RT-PCR pour l'amplification des transcrits de fusion possibles *MSI2-SOX17* et *SOX17-MSI2* et pour l'amplification de *SOX17* à partir des cellules mononuclées du patient 02H037. Le gel de bromure d'éthidium à 2% montre le produit d'amplification de *SOX17* (quatrième puits) obtenu avec une combinaison d'amorces localisées dans l'exon 1 (amorce sens, 141) et dans l'exon 2 (amorce antisens, 161) de *SOX17* (366 pb). Le premier puits correspond au marqueur du poids moléculaire 1kb, le deuxième puits correspond à l'amplification du

gène contrôle *ACTB* avec les amorces 210 et 211, contrôle sans ARN (H2O), le troisième puits correspond au produit d'amplification de *ACTB* obtenu avec les amorces 210 et 211 (192 pb). **B)** Séquençage partiel de *SOX17* en utilisant les amorces 141 (sens) et 161(anti-sens) révélant un transcrit alternatif au niveau de l'exon 2 de *SOX17*. La flèche rouge montre la position de l'épissage. **C)** Analyse de la séquence de *SOX17* révélant que le cadre de lecture est respecté dans le nouveau transcrit alternatif avec présence du domaine HMG « High Mobility Group » (surligné en couleur jaune). Les nucléotides surlignés en rouge forment un nouveau triplet nucléotidique GGG (point d'épissage) correspondant à l'acide aminé (aa) Guanine, le même aa étant présent dans le transcrit principal. Les nucléotides de l'exon 1 de *SOX17* sont en noir et les nucléotides de l'exon 2 sont en vert. Les nucléotides en gris ne sont pas présents dans le nouvel épissage du transcrit *SOX17* amplifié. Les flèches en rouge indiquent les sites d'épissage.

4. Investigation de la translocation t(2;12) dans la phase blastique de la leucémie myéloïde chronique (cas 02H052)

4.1. Présentation clinique et analyses cytogénétiques

Il s'agit d'un patient de 49 ans ayant reçu un diagnostic de LMC en phase chronique en novembre 2000 avec présence de la fusion *BCR-ABL1* (b3-a2) confirmée par RT-PCR. Le patient a d'abord été traité par l'interféron puis l'imatinib. En juillet 2002, il est sous imatinib et on note à ce moment, une absence de la fusion *BCR-ABL1* en FISH et en RT-PCR. Malheureusement, le patient progresse en LMC-PB dès octobre 2002. Le médullogramme démontre 90% de blastes et l'analyse cytogénétique effectuée sur ces cellules démontre la formule chromosomique suivante : 45,XY,t(2;12)(q31;p13),der(9)t(9;22)(q34;q11.2),-22[3]/47,XY,t(2;12)(q31;p13),t(9;22)(q34;q11.2),+der(22)t(9;22)(q34;q11.2)[15]/46,XY[3]. Le caryotype suggère que les points de cassure de la t(2;12) sont localisés sur les bandes chromosomiques 12p13 et 2q31 (Figure 32). Après un traitement de chimiothérapie associée avec l'imatinib, le patient est traité en mars 2003 par une greffe allogénique. Il est décédé en novembre 2003 d'une maladie du greffon contre l'hôte et de complications infectieuses.

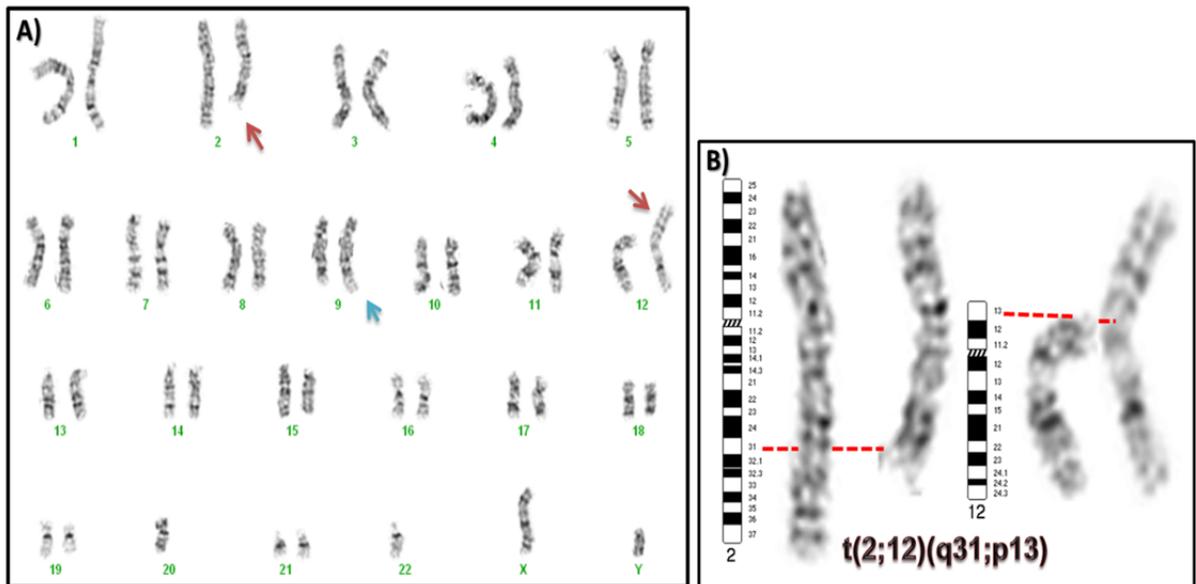


Figure 32. Caryotype en bandes GTG révélant la présence des translocations chromosomiques t(9;22) et t(2;12) chez le patient 02H052.

A) Caryotype en bandes GTG avec une résolution de 500 bandes, effectué à partir des cellules mononuclées du patient 02H052 en phase blastique de la leucémie myéloïde chronique révélant la présence d'un chromosome dérivé 9 résultant de la translocation $t(9;22)(q34.1;q11.2)$ (flèche bleue) ainsi qu'une translocation chromosomique entre les bras longs d'un chromosome 2 et les bras courts d'un chromosome 12 (flèches rouges). **B)** Caryotype partiel et idiogrammes des chromosomes 2 et 12, suggérant des points de cassure au niveau des bandes chromosomiques 2q31 et 12p13.

4.2. Réarrangement du gène *ETV6* au niveau de la bande chromosomique 12p13

Nous avons ciblé en premier le gène candidat *ETV6* localisé sur la bande chromosomique 12p13, un gène fréquemment réarrangé dans les hémopathies malignes (Bohlander, 2005). Deux sondes spécifiques ciblant *ETV6* ont été utilisées. La première est une sonde de type « Break apart » couplée à deux fluorochromes : le spectrum orange pour la sonde (490 Kb) couvrant la partie 5' du locus *ETV6* et le spectrum vert pour la sonde (630Kb) couvrant sa partie 3' (Figure 33). Cette sonde a révélé que la partie 5' du locus *ETV6* était transloquée sur le chromosome dérivé 2, der(2), et que la partie 3' demeurait sur le chromosome dérivé 12, der(12). Afin de préciser le point de cassure, nous avons utilisé la sonde *ETV6-RUNXI* qui couvre les exons 1 à 4 du gène *ETV6*. Cette sonde a confirmé que le point de cassure de la $t(2;12)$ est situé entre les exons 1 à 4 de *ETV6*.

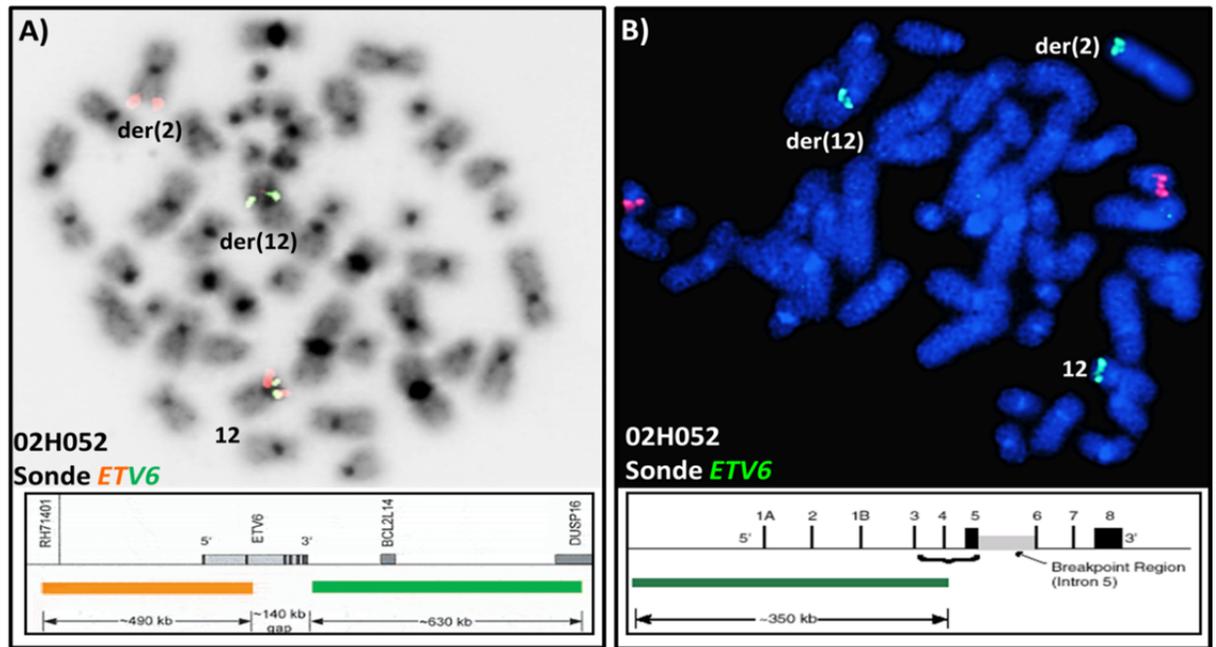


Figure 33. Identification d'un réarrangement du gène *ETV6* par hybridation in situ en fluorescence dans la $t(2;12)(q31;p13)$ chez le patient 02H052.

A) Analyse par hybridation in situ en fluorescence (FISH) sur les métaphases obtenues à partir des cellules mononuclées du patient 02H052 en phase blastique de la leucémie myéloïde chronique révélant un réarrangement du locus *ETV6* avec une sonde de type « Break apart » de *ETV6*. Sur métaphase, on note un signal de fusion correspondant à l'allèle normal de *ETV6* au niveau du chromosome 12 normal et un signal séparé avec la partie 5' de *ETV6* (couleur orange) au niveau du chromosome dérivé 2, der(2), et la partie 3' de *ETV6* (couleur verte) sur le chromosome dérivé 12, der(12). **B)** Analyse FISH avec la sonde *ETV6/RUNX1* (sonde *ETV6* : couleur verte, sonde *RUNX1* : couleur orange) révélant un point de cassure localisé entre les exons 1A et 4 de *ETV6* avec hybridation de la sonde au niveau des deux chromosomes dérivés, der(2) et der(12).

4.3. Identification du point de cassure sur la bande chromosomique 2q31 et altération du locus *HOXD* dans la $t(2;12)$

Au niveau de la bande chromosomique 2q31, *HOXD11* et *HOXD13* sont des gènes candidats impliqués dans des translocations associées aux leucémies (Shimada et al., 2000;

Taketani et al., 2002c). Nous avons ciblé en premier le locus *HOXD* avec le BAC RP11-203G19 qui a donné un signal d'hybridation au niveau du chromosome 2 normal et du chromosome dérivé 12, der(12), indiquant une position centromérique du point de cassure (Figure 34). L'utilisation d'un BAC centromérique à RP11-203G19, le BAC RP11-99I21, qui couvre la majorité des gènes du locus *HOXD*, a donné un signal d'hybridation sur les chromosomes dérivés, der(2) et der(12), confirmant l'implication de ce locus (Figure 35).

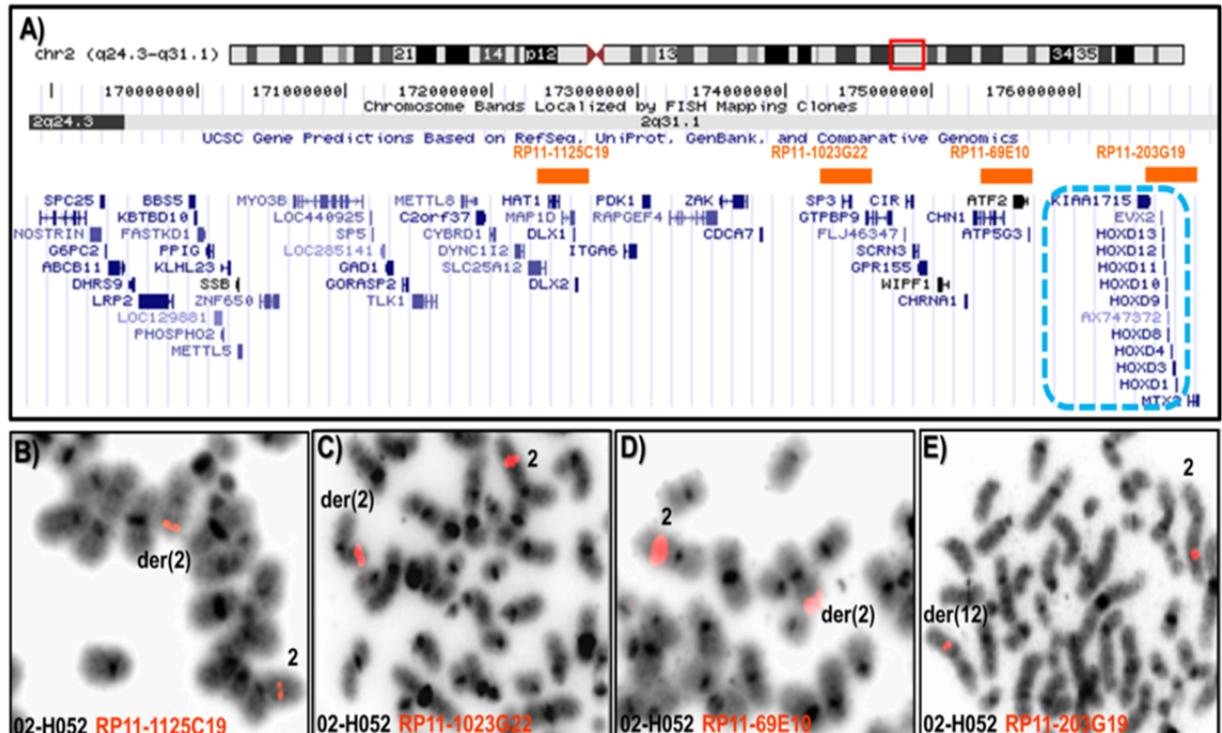


Figure 34. Délimitation de la région impliquée dans la translocation t(2;12) au niveau de la bande chromosomique 2q31 par hybridation in situ en fluorescence.

A) Régions et gènes ciblés par les BACs (notés en couleur orange) au niveau de la bande chromosomique 2q31. **B) C) et D)** Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) sur les métaphases obtenues à partir des cellules mononuclées du patient 02H052 en phase blastique de la leucémie myéloïde chronique avec les BACs RP11-1125C19, RP11-1023G22, RP11-69E10. Les trois BACs ciblent respectivement les loci *DLX1*, *SP3* et *ATF2* et hybrident au niveau du chromosome 2 normal et au niveau du chromosome dérivé 2, der(2), indiquant une position télomérique du point de cassure. **E)** Analyse FISH avec le BAC RP11-203G19 ciblant le locus *HOXD* qui hybride au niveau du chromosome 2 normal et du chromosome dérivé 12, der(12), indiquant une position centromérique du point de cassure.

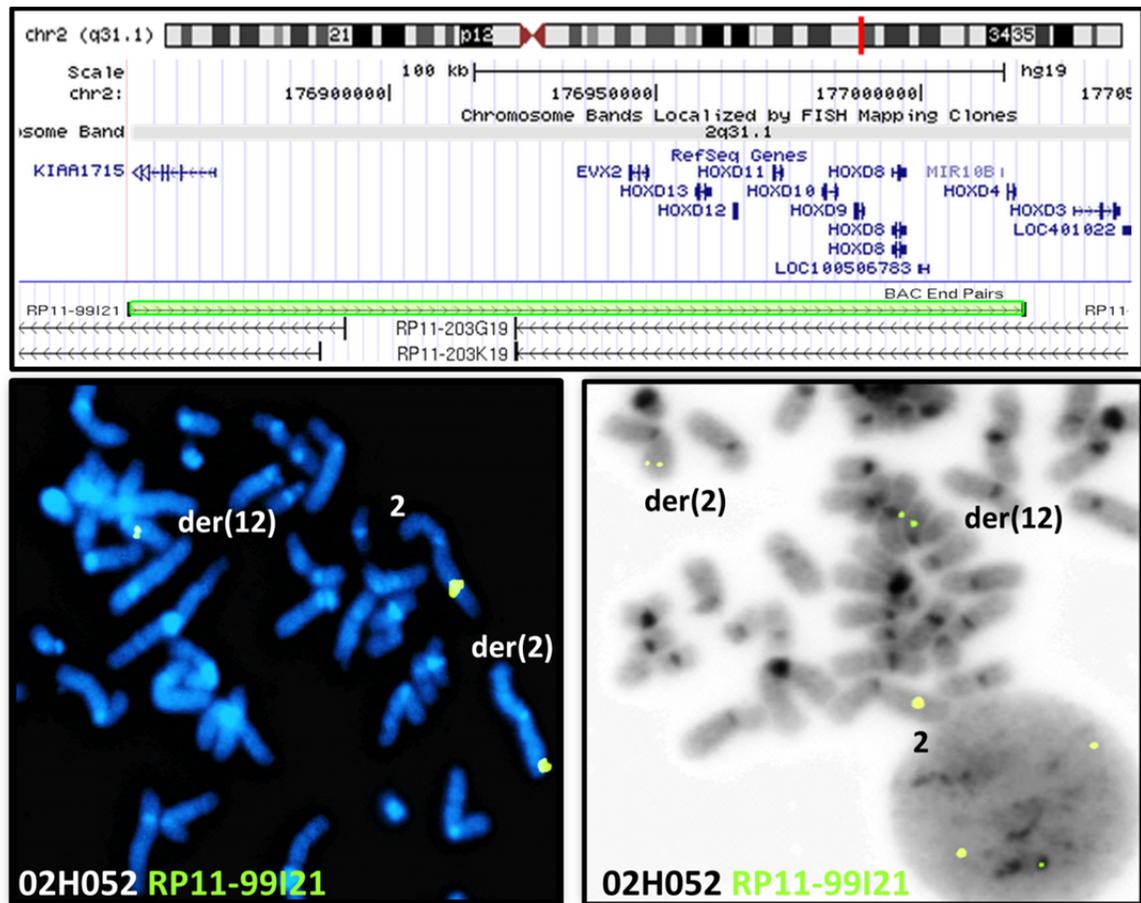


Figure 35. Identification d'un réarrangement du locus *HOXD* dans la translocation $t(2;12)$.

Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) sur les métaphases obtenues à partir des cellules mononuclées du patient 02H052 en phase blastique de la leucémie myéloïde chronique avec le BAC RP11-99I21 qui couvre les gènes *HOXD4*, *HOXD8*, *HOXD9*, *HOXD10*, *HOXD11*, *HOXD12*, *HOXD13* et *EVX2*. On note un signal d'hybridation sur le chromosome 2 normal et sur les chromosomes dérivés, der(2) et der(12), identifiant un point de cassure dans ce locus.

4.4. Formation d'une forme tronquée de *ETV6* suite à la fusion *ETV6-HOXD11*

Suite à l'identification des réarrangements du gène *ETV6* et du locus *HOXD* dans la $t(2;12)$, nous avons procédé à l'amplification des fusions potentielles *ETV6-HOXD* et

HOXD-ETV6. Au niveau du locus *HOXD*, les gènes *HOXD11* (Taketani et al., 2002c) et *HOXD13* (Shimada et al., 2000) ont été identifiés comme étant fusionnés à *NUP98* dans la translocation chromosomique t(2;11)(q31;p15) détectée dans la LAM. Par RT-PCR nous n'avons pas obtenu de transcrits de fusion *ETV6-HOXD11* ou *ETV6-HOXD13* avec plusieurs combinaisons d'amorces. Nous avons donc utilisé la technique de la 3' RACE PCR qui nous a permis de confirmer la présence d'un transcrit de fusion *ETV6-HOXD11* (Figure 36). Les résultats du FISH ayant révélé un point de cassure entre les exons 1 et 4 de *ETV6*, nous avons placé les amorces spécifiques ciblant *ETV6* dans les exons 1 et 2. La séquence partielle de ce produit obtenu par RACE PCR correspond à la séquence de l'exon 2 de *ETV6*, une portion de la séquence génomique de l'intron 2 de *ETV6*, ce qui donne un exon 2 alternatif, ainsi qu'une courte séquence spécifique au gène *HOXD11* (Figure 37A). Malheureusement la quantité limitée de matériel cellulaire disponible n'a pas permis une investigation plus approfondie de ce cas.

HOXD11 s'étend sur deux exons et son domaine homéobox est codé par l'exon 2 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/23510367?report=graph>). Il possède un seul transcrit représentatif (NM_021192.2). Pour le gène *ETV6*, un seul transcrit composé de 8 exons traduits est décrit (NM_001987.4). Au niveau de la protéine, le domaine SAM est codé par l'exon 3 et une partie de l'exon 4, tandis que le domaine ETS est codé par les exons 6, 7 et une partie de l'exon 8. Le site d'initiation de la transcription de *ETV6* est localisé au niveau de l'exon 1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/153267458?report=graph>). Au niveau du point de cassure de la translocation t(2;12)/fusion *ETV6-HOXD11* un codon stop est produit à la fin de l'exon 2 alternatif de *ETV6* (Figure 37B). La présence des deux premiers exons de *ETV6* comportant un site d'initiation de la transcription adjacent au locus *HOXD*, pourrait activer un ou plusieurs gènes de ce locus, tel que décrit dans plusieurs des translocations chromosomiques impliquant *ETV6* qui n'entraînent pas la formation de transcrits de fusion (voir discussion).

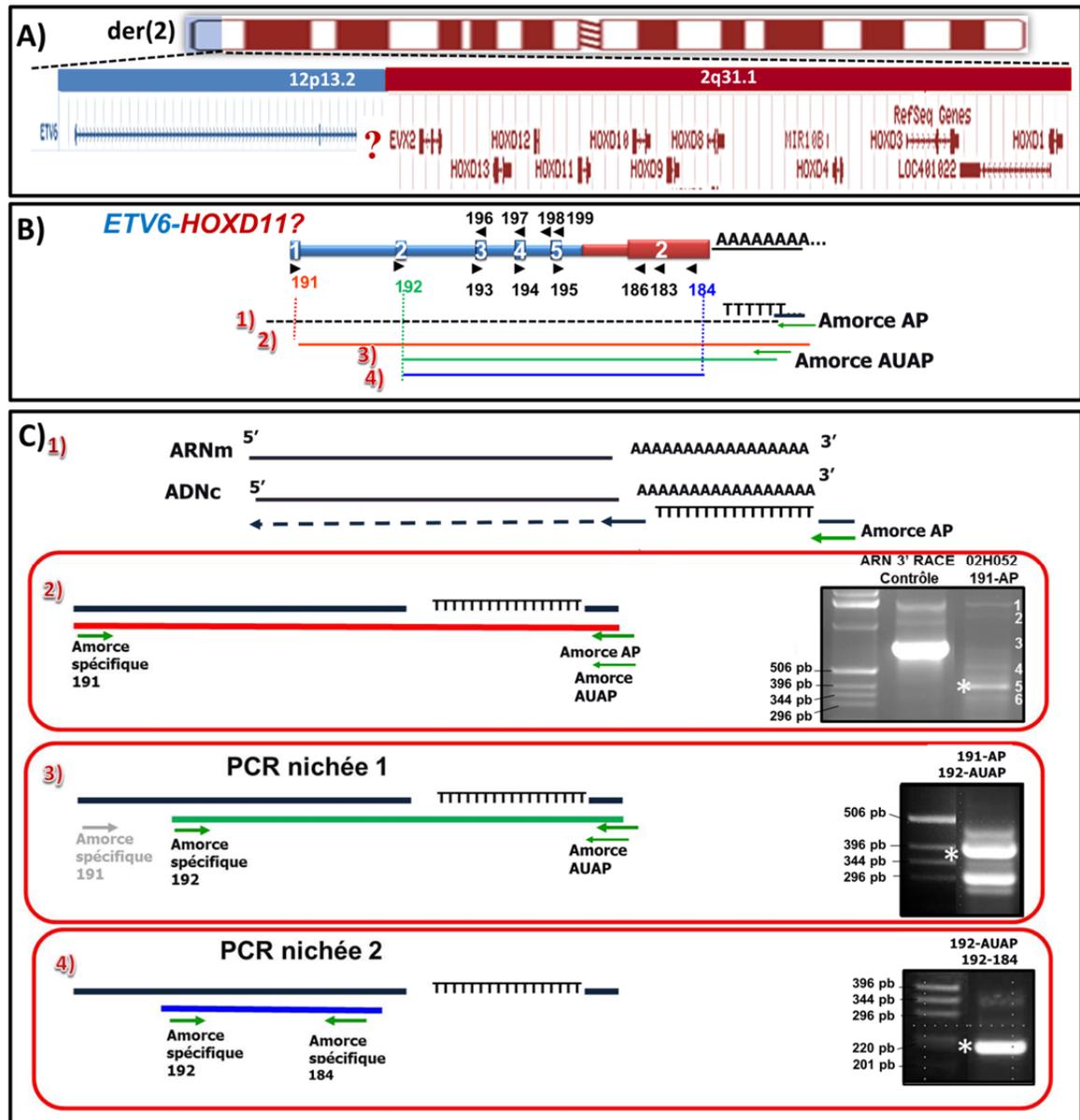


Figure 36. Identification d'une forme tronquée de *ETV6* et d'une fusion *ETV6-HOXD11* par amplification rapide des extrémités 3' des acides désoxyribonucléiques complémentaires - Réactions en chaîne par polymérisation.

A) Suite à la translocation t(2;12), la partie 5' de *ETV6* est transloquée au niveau du chromosome dérivé 2, der(2), et juxtapose le locus *HOXD* dans les cellules leucémiques du patient 02H052 en phase blastique de la leucémie myéloïde chronique. **B)** Position des amorces pour l'amplification rapide des extrémités 3' des acides désoxyribonucléiques complémentaires - Réactions en chaîne par polymérisation (3' RACE PCR) et pour la PCR nichée à partir des cellules mononuclées du patient 02H052 afin d'identifier le partenaire

du gène *ETV6* dans la t(2;12). **C)** Étapes de la 3' RACE PCR et de la PCR nichée pour l'identification de la jonction *ETV6-HOXD11*. **1)** L'ARNm total est transcrit en ADNc grâce à l'amorce universelle AP « *adapter primer* » qui reconnaît les poly(A). **2)** L'utilisation d'une amorce spécifique de *ETV6* (amorce sens 191) localisée dans l'exon 1 et de l'amorce universelle AUAP « *Abridged Universal Amplification Primer* », permet d'amplifier spécifiquement par PCR ce qui suit l'exon 1 de *ETV6*, dont l'allèle sauvage, l'allèle transloqué et d'autres formes d'épissage. Les produits d'amplification ont été détectés sur un gel d'agarose de 2% (puits de droite : bandes 1 à 6, bande principale 5 (indiquée par une étoile) de ~ 390 pb). **3)** Pour chaque bande une PCR nichée est réalisée avec une amorce localisée dans l'exon 2 de *ETV6* (amorce sens 192) ainsi que l'amorce AUAP. Deux produits d'amplification principaux ont été obtenus, une première bande (indiquée par une étoile) de ~ 390 pb et une deuxième bande de ~ 296 pb. **4)** Une seconde PCR nichée est réalisée à partir de la première bande (indiquée par une étoile) du gel 2 avec l'amorce sens 192 de *ETV6* et l'amorce anti-sens 184, localisée au niveau de l'exon 2 de *HOXD11*. Un produit d'amplification principal de 233 pb (indiqué par une étoile) a été obtenu. Ce produit a ensuite été séquencé.

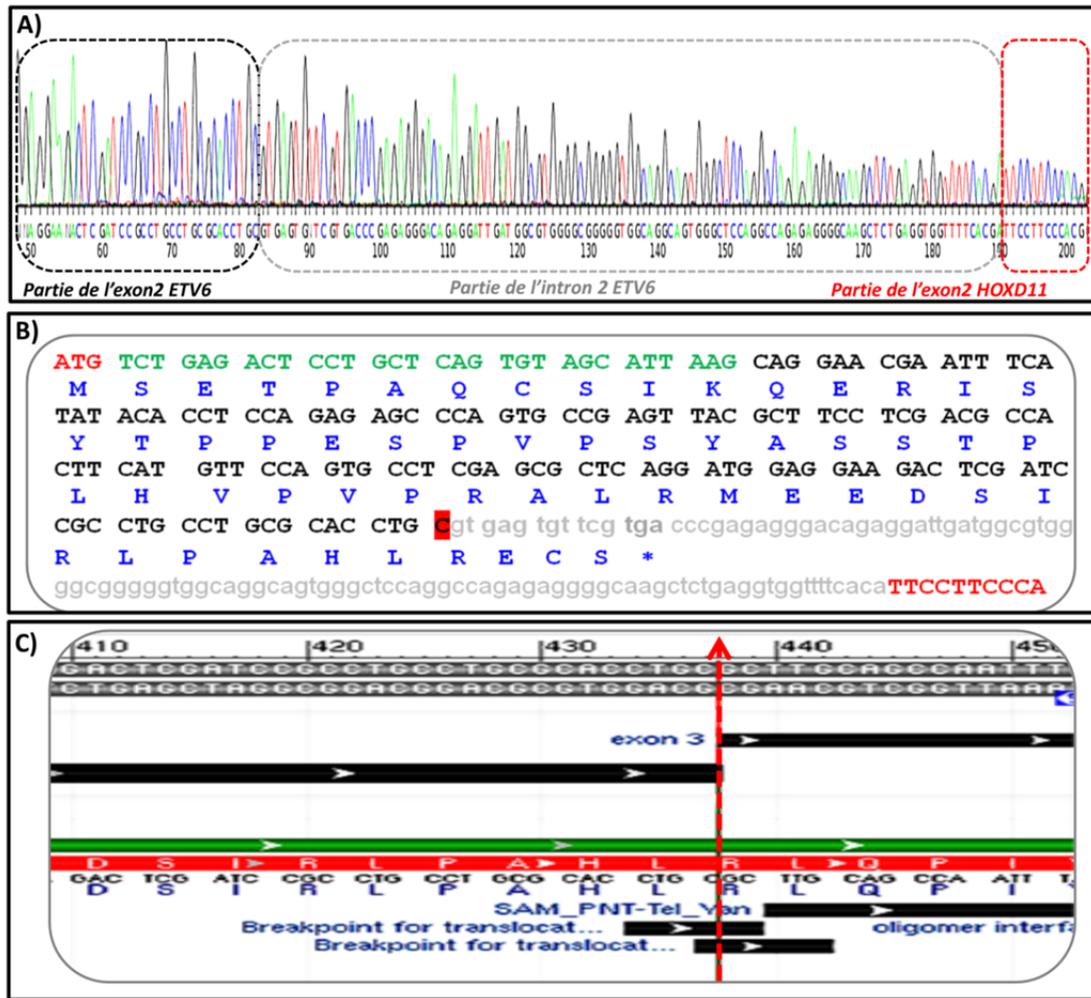


Figure 37. Identification d'une forme tronquée de *ETV6* et d'un site d'épissage alternatif commun aux translocations chromosomiques impliquant *ETV6*.

A) Séquence partielle du produit d'amplification *ETV6* exon 2 (amorce sens 192)/*HOXD11* exon2 (amorce antisens 184) obtenu à partir des cellules mononuclées du patient 02H052.

La séquence comprend l'exon 2 de *ETV6*, l'intron 2 de *ETV6* et une partie de l'exon 2 de *HOXD11*. **B)** Analyse de la séquence *ETV6*-*HOXD11*. Les nucléotides de l'exon 1 de *ETV6* sont en vert et ceux de l'exon 2 de *ETV6* sont en noir. Les nucléotides introniques qui sont inclus dans ce transcrit sont en lettres minuscules en gris. Les acides aminés correspondants sont en bleu. Un codon STOP prématuré est produit peu après l'exon 2 de *ETV6* (indiqué par une étoile bleue). Le nucléotide C surligné en rouge est celui qui est impliqué dans l'épissage intragénique suite à la translocation chromosomique. **C)** Point de cassure commun (dans l'exon 2) identifié dans les translocations chromosomiques impliquant

le gène *ETV6* (flèche rouge)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/153267458?report=graph>.

4.5. Activation de *HOXD9* au niveau du locus *HOXD* dans la t(2;12)

Une des conséquences possibles de la translocation t(2;12) est l'activation de un ou plusieurs gènes du locus *HOXD*. Suite à l'amplification par PCR du cDNA des gènes adjacents à *HOXD11*, soit *HOXD10*, *HOXD9* et *HOXD8*, une bande spécifique a été obtenue correspondant à l'amplicon de *HOXD9* (Figure 38B). Des amorces ciblant l'exon 2 ont été utilisées. Rappelons qu'auparavant nous avons testé plusieurs combinaisons d'amorces afin d'amplifier une fusion probable *ETV6-HOXD* (*HOXD13*, *HOXD11*, *HOXD9*, *HOXD8*). Cependant, la seule séquence obtenue est celle d'*ETV6* avec *HOXD11* décrite précédemment. En ciblant l'exon 2 de *HOXD9*, nous avons obtenu une bande ayant la taille attendue de la séquence ciblée de *HOXA9* (Figure 38). Cependant nous ne pouvons pas exclure une fusion probable avec *ETV6*, et la possibilité que la combinaison d'amorce utilisée ne fonctionne pas. Malheureusement, nous n'avons pu compléter le séquençage en raison de matériel biologique insuffisant pour ce cas. Cependant la taille du produit obtenu correspond à la taille prédite, soit 381 pb (Figure 38). De façon similaire aux gènes *HOXA*, *HOXD9* comprend deux exons et son domaine homéobox est codé par l'exon 2 avec un seul transcrit représentatif (NM_014213.3). Il n'est pas exprimé lors de l'hématopoïèse normale mais son activation a été rapportée récemment dans les cellules de gliomes et dans les cellules souches de gliomes (Tabuse et al., 2011) (voir discussion).

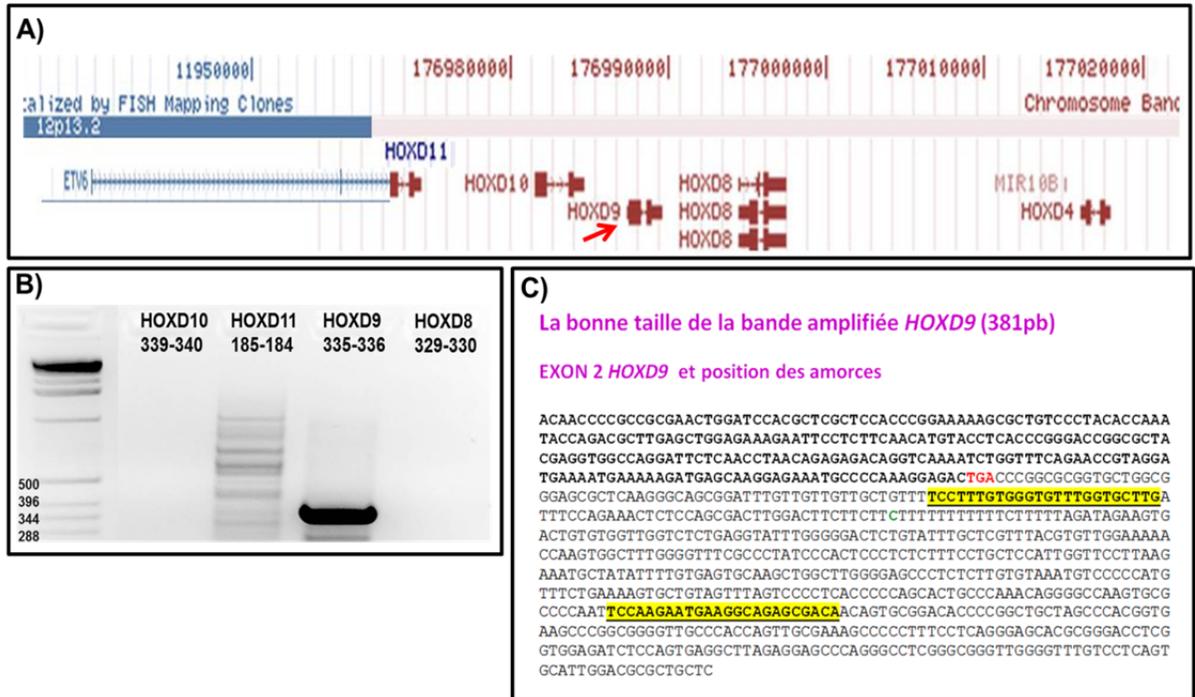


Figure 38. Activation de *HOXD9* dans les cellules du patient 02H052 avec la translocation t(2;12).

A) Gènes du locus *HOXD* adjacents à *HOXD11* et positionnement de *ETV6* en 5' de ces gènes dans la translocation t(2;12). La flèche rouge pointe le gène *HOXD9*. **B)** Gel de bromure d'éthidium 2% démontrant les produits d'amplification par PCR du cDNA de *HOXD8*, *HOXD9*, *HOXD10* et *HOXD11* obtenu à partir des cellules mononuclées du patient 02H052, avec les combinaisons d'amorces 329-330, 335-336, 339-340, 185-184 respectivement. On note la présence d'un produit d'amplification significatif seulement avec la combinaison d'amorces 335-336 ciblant *HOXD9*. **C)** Séquence et taille prédites du produit d'amplification de *HOXD9*. Les amorces 335 et 336 sont surlignées en jaune au niveau de la séquence de *HOXD9*. La taille prédite du produit amplifié avec les amorces 335 et 336 est de 381 pb.

DISCUSSION

1. Caractérisation de la translocation t(1;21) et identification des fusions *RUNX1-PRDM16*, des formes tronquées de *RUNX1* et activation de *PRMD16*

Dans la translocation chromosomique cryptique t(1;21)(p36.3;q22), nous avons identifié et rapporté un réarrangement des gènes *RUNX1* (antérieurement nommé *AML1*) et *PRDM16* (antérieurement nommé *MEL1*) ((Hazourli et al., 2006) et Annexe). Le facteur de transcription *RUNX1* « runt-related transcription factor 1 » est la sous-unité alpha du CBF « Core Binding Factor ». Le complexe protéique CBF α /CBF β se lie à l'ADN cible aux séquences *enhancer* (TGTGGT) au niveau des régions régulatrices de plusieurs gènes importants pour la différenciation hématopoïétique, dont *CSF1R* (Zhang et al., 1994), *CSF2* (Frank et al., 1995; Takahashi et al., 1995), *CD4* (Taniuchi et al., 2002), *IL3* (Uchida et al., 1997) et *BLK* (Libermann et al., 1999). Quant à *PRDM16* (PR domain containing 16), il code pour une protéine en doigts de zinc avec un domaine PR (PRDI-BF1-RIZ1 homologous). Cette famille de gènes comprend aussi *MDS1-EVII/MECOM* (3q26), *RIZ1/PRDM2* (1p36), *BLIMP-1/PRDM1* (6q21) et *PFM1/PRDM4* (12q23). Cette famille serait impliquée dans les cancers humains de deux façons différentes dépendamment de la présence ou de l'absence du domaine PR. Le produit PR-plus est inactivé ou sous-exprimé, alors que le produit PR-moins est présent ou surexprimé dans les cellules cancéreuses. Ce déséquilibre dans la quantité des deux produits aurait un rôle important dans la leucémogénèse (Jiang and Huang, 2000).

RUNX1 est fréquemment altéré dans les leucémies par des remaniements chromosomiques, des mutations ponctuelles ou une amplification associées à différents types de leucémie dont la LAM, la LAL, ainsi que la LMC en phase blastique. Cependant les réarrangements chromosomiques les plus fréquents de *RUNX1* sont les translocations. Les translocations

les plus fréquentes et les gènes de fusions impliquant *RUNX1* sont la translocation t(8;21)(q22;q22)/*RUNX1-RUNX1T1* (Gao et al., 1991; Miyoshi et al., 1993; Miyoshi et al., 1991; Rowley, 1973a) et la translocation t(3;21)(q26.2;q22)/*RUNX1-MECOM* (Nucifora, 1997; Nucifora et al., 1994) dans les LAM, ainsi que la translocation t(12;21)(p13;q22)/*ETV6-RUNX1* dans les LAL pédiatriques (Golub et al., 1995; Romana et al., 1995; Zelent et al., 2004). Des mutations somatiques ont aussi été identifiées au niveau du domaine RHD de *RUNX1* dans les SMD ainsi que les LAM (Harada et al., 2004; Matsuno et al., 2003; Osato et al., 1999; Preudhomme et al., 2000; Taketani et al., 2003). À noter aussi que des mutations germinales de *RUNX1* causent la maladie appelée FPD « familial platelet disorder », de transmission autosomale dominante, qui prédispose au développement de SMD et de LAM (Owen et al., 2008; Song et al., 1999).

Dans notre translocation t(1;21), la fusion des exons 5 et 6 de *RUNX1* avec le gène partenaire, suggère que le point de cassure génomique est localisé au niveau de l'intron 5 et/ou 6 du gène *RUNX1*, un des points de cassure communs de plusieurs translocations *RUNX1* dans les leucémies. En effet, il a été identifié dans les translocations chromosomiques les plus fréquentes, soit la t(8;21)(q22;q22) et la t(3;21)(q26;q22). Cette région a été associée à des sites de fixation de l'enzyme topoisomérase II ou des sites d'hypersensibilité à la DNase (Hromas et al., 2000; Roulston et al., 1998; Webb et al., 2002; Zhang and Rowley, 2006). Nous avons identifié le point de cassure au niveau du gène *PRDM16* par technique FISH dans l'intron 1. En RT-PCR, la fusion implique l'exon 2 de *PRDM16*, ce qui suggère qu'au niveau génomique, le point de cassure est localisé dans l'intron 1. D'une façon intéressante, il a été démontré par *Du et al.* (Du et al., 2005) que l'intron 1 de *Prdm16* est une cible fréquente d'intégration rétrovirale du « murine stem cell virus » (MSCV) dans les lignées de progéniteurs myéloïdes. Suite à cette insertion, les cellules hématopoïétiques qui normalement ont un autorenouvellement limité, deviennent immortalisées. Une insertion rétrovirale au niveau de *Prdm16* comme seul « hit » causant la leucémie chez la souris, a par la suite été confirmée par Modlich U et al. (Modlich et al., 2008). Les protéines de fusions prédites *RUNX1-PRDM16*, issues des deux transcrits de fusion respectant le cadre ouvert de lecture dans notre leucémie, contiennent le domaine RHD de *RUNX1* qui est le site de liaison à l'ADN des gènes cibles de *RUNX1*, et le site d'hétérodimérisation avec *CBFβ* (Figures 13 et 39). Une hypothèse possible est que le rôle de *RUNX1* dans la différenciation hématopoïétique pourrait être affecté suite à

l'interaction de RUNX1 (allèle transloqué) avec CBF β . En effet, si CBF β a plus d'affinité avec RUNX1 muté, le fonctionnement de RUNX1 normal pourrait être perturbé.

La fusion RUNX1-PRDM16 démontre une grande homologie avec la fusion RUNX1-MECOM. En plus de la similarité de la partie 5' de RUNX1 impliquée dans la translocation, l'homologie entre PRDM16 et MECOM-MDS1/EVI1 est de 64.3% en nucléotides et 64.2% en séquences d'acide aminés, et les domaines de structure sont les mêmes (Mochizuki et al., 2000). Un exemple de similarité fonctionnelle entre MECOM et PRDM16 est leur rôle suppresseur au niveau de la voie de signalisation TGF β en interagissant avec les protéines SMADs, ce qui va diminuer l'effet répresseur de la voie TGF β sur la prolifération cellulaire (Bjork et al., 2010; Kurokawa et al., 1998a; Kurokawa et al., 1998b; Takahata et al., 2009; Warner et al., 2007). La fusion RUNX1-PRDM16 pourrait donc avoir un rôle dans la prolifération comme c'est le cas pour la fusion RUNX1-MECOM (Kurokawa et al., 1998a) (Figure 39).

Dans la fusion *RUNX1-PRDM16* identifiée dans ce travail, *PRDM16* est présent presque dans sa totalité et comprend les régions codant pour les sites de liaison à l'ADN en doigts de zinc, ainsi que le domaine de répression (Kajimura et al., 2008; Mochizuki et al., 2000) (Figures 13 et 39). Il a été démontré que PRDM16 forme un complexe avec CtBP1 et CtBP2, qui est recruté au niveau des régions promotrices des gènes spécifiques des cellules adipeuses blanches comme le gène *RETN/resistin* (Kajimura et al., 2009; Kajimura et al., 2008b; Seale et al., 2011; Seale et al., 2007). Ceci va réprimer toute une cascade responsable du phénotype des cellules adipeuses blanches qui stockent l'énergie surtout sous forme de triglycérides causant l'obésité. PRDM16 est maintenant reconnu comme un régulateur important de la graisse brune. En effet, en présence de PGC-1 α et PGC-1 β , ces derniers interagissent avec PRDM16 à la place de CtBP, induisant une activation des gènes impliqués dans le programme transcriptionnel spécifique des cellules adipeuses brunes qui dépendent l'énergie stockée sous forme de chaleur (Kajimura et al., 2009; Kajimura et al., 2008; Seale et al., 2011; Seale et al., 2007). Donc un changement de transcription dépendant de ces cofacteurs impliquerait PRDM16. Dans les cellules hématopoïétiques, l'interaction entre PRDM16 et CtBP est importante pour la répression transcriptionnelle des gènes cibles impliqués dans la différenciation hématopoïétique myéloïde (Nishikata et al., 2011). Sa fusion avec le domaine RHD de RUNX1 pourrait donc induire une

répression de la transcription des gènes cibles de RUNX1 impliqués aussi dans la différenciation hématopoïétique (Figure 39).

En plus des deux transcrits qui respectent le cadre de lecture, nous avons identifié 6 autres transcrits de fusion qui donnent des formes tronquées de *RUNX1* en raison du décalage de lecture (Hazourli et al., 2006). Ces transcrits fusionnent les exons 5 ou 6 de *RUNX1* avec les exons 2, 3 ou 3b de *PRDM16* donnant des formes tronquées de *RUNX1* avec des codons stop prématurés (Figure 13). Le domaine RHD de RUNX1 codé par les exons 3, 4 et 5 est toujours présent dans ces produits. Toutefois la région codant pour le domaine de transactivation est absente. Dans les cellules normales, trois ARNm majeurs de *RUNX1* sont présents, soit *RUNX1a*, *RUNX1b* et *RUNX1c*. Les protéines codées par *RUNX1b* et *RUNX1c* possèdent le domaine RHD en N terminal ainsi que le domaine de transactivation en C terminal. Par contre, la protéine codée par *RUNX1a* possède le domaine RHD mais ne contient pas le domaine de transactivation. La fonction de RUNX1 est principalement assurée par RUNX1b et RUNX1c qui sont considérés comme ayant les mêmes fonctions (Mikhail et al., 2006). Des études utilisant des transfections transitoires ont démontré que RUNX1b, mais non RUNX1a, active les récepteurs des cellules T (Fujii et al., 1998; Meyers et al., 1995) et le GM-CSF (Frank et al., 1995). La protéine RUNX1a n'a pas en elle-même des fonctions transactivatrices. Toutefois, elle inhibe l'activité transcriptionnelle de RUNX1b par compétition au niveau des séquences d'ADN des gènes cibles avec une grande affinité (Tanaka et al., 1995). La surexpression de RUNX1a inhibe la différenciation des précurseurs myéloïdes 32Dcl3 induite par le G-CSF (Liu et al., 2009). Des évidences récentes ont démontré que l'expression de *RUNX1a* est plus élevée chez les patients atteints de leucémie aiguë que dans les contrôles normaux (Liu et al., 2009). Ceci suggère que RUNX1a perturbe les fonctions normales de RUNX1 et pourrait contribuer à la leucémogénèse similairement aux fusions RUNX1. Donc suite à la t(1;21), de nouveaux transcrits *RUNX1* et une surreprésentation de la forme *RUNX1a* sont générés. La présence du domaine RHD permet aux protéines prédites de compétitionner au niveau des gènes cibles de RUNX1 et de ce fait ces produits pourraient être oncogéniques en compétitionnant avec les formes RUNX1b et RUNX1c, induisant un arrêt de différenciation.

Deux produits de PRDM16 ont initialement été identifiés par Nishikata et al., soit l'isoforme long PRDM16 (ou MEL1), qui contient le domaine PR entre l'exon 2 et l'exon

5, et l'isoforme court sPRDM16 (ou MEL1s) sans le domaine PR (Nishikata et al., 2003). Initialement, trois sites d'initiation de la transcription ont été identifiés pour PRDM16, le premier dans l'exon 1 et les deux autres dans l'exon 2, ce qui donne deux types de produits traduits de 170 kDa (MEL1) et 150 kDa (MEL1S) respectivement (Nishikata et al., 2003). Il a aussi été démontré dans les cellules de LAM avec la translocation t(1;3)(p36;q21), que MEL1S est traduit d'un codon initial interne ATG597 dans l'exon 4 et est dépourvue du domaine PR (Nishikata et al., 2003). Dans notre cas, suite à la t(1;21)/*RUNX1-PRDM16*, la forme courte de *PRDM16* est surexprimée alors que l'expression de la forme longue de *PRDM16* est absente en phase blastique de la LMC. Toutefois, chez la même patiente en phase chronique de la maladie, l'expression des deux formes de *PRDM16* est absente. Cette augmentation d'expression pourrait être reliée à la présence de la région promotrice de *RUNX1* en 5' de la fusion. Ceci est similaire à la t(1;3) identifiée dans des LAM et des SMD impliquant un réarrangement de *PRDM16*, qui est surexprimé suite à sa juxtaposition aux séquences régulatrices *enhancers* du gène *RPNI* localisé au niveau de la bande chromosomique 3q21 (Shing et al., 2007). Nous avons aussi détecté une augmentation de l'expression de *PRDM16* dans plusieurs cas de LAM (9 des 90 patients étudiés) en absence de translocation chromosomique ou d'amplification génique de *PRDM16* par technique FISH. Suite à notre étude, le groupe de Shing et al. (Shing et al., 2007) a étudié l'expression de *PRDM16* dans une autre cohorte de 45 patients porteurs de LAM. Tel que rapporté dans notre étude, ces auteurs ont noté que l'expression de *PRDM16* n'était pas détectée dans les LAM avec translocations récurrentes mais qu'une surexpression était observée dans les LAM avec caryotype normal (CN) (9 des 28 cas qui surexpriment *PRDM16*; 32%). Dans les LAM-CN surexprimant *PRDM16*, 7 des 9 cas étaient porteurs d'une mutation du gène *NPM1*, 4 d'une mutation *FLT3-ITD* et 4 cas avaient les deux mutations. Les cas surexprimant *PRDM16* ne démontraient pas d'amplification au niveau génomique et tous les cas surexprimaient les deux formes de *PRDM16*. Les spécimens avec surexpression de *PRDM16* démontraient une déméthylation de la région promotrice de *PRDM16* ce qui suggère que la méthylation différentielle du promoteur peut contrôler l'expression de *PRDM16*. De plus, une augmentation de l'expression de *PRDM16s* associée à une hypométhylation a aussi été décrite dans les leucémies aiguës à cellules T (Yoshida et al., 2004).

Il a été démontré que la surexpression de la forme courte de *sPRDM16/MEL1s* bloque la différenciation granulocytaire induite par les facteurs stimulant les colonies granulocytaires

tel que le G-CSF, dans les cellules murines IL3-dépendantes L-G3. Par contre la forme longue, *PRDM16*, ne peut bloquer la différenciation (Nishikata et al., 2003). Récemment le même groupe a démontré que l'activité répressive de *sPRDM16* est essentielle pour inhiber la différenciation granulocytaire et se fait par le recrutement du complexe HDAC via CTBP1 (Nishikata et al., 2011). D'une façon intéressante, l'inhibiteur de l'histone déacetylase, le trichostatin A, abolit la différenciation myéloïde induit par le facteur G-CSF (Nishikata et al., 2011). D'autre part, dans les cellules murines enrichies en CSHs et en progéniteurs lin-, la surexpression de *sPRDM16* augmente la taille et le nombre des cellules immatures dans un milieu de méthylcellulose. Il y a alors prolifération des cellules immatures et blocage de maturation. Ceci a aussi été confirmé dans les essais de CFU à long terme (Shing et al., 2007). Au niveau de l'hématopoïèse, *PRDM16* est exprimé sélectivement au niveau de la CSH et des progéniteurs et récemment, *Prdm16* a été identifié comme un régulateur important au niveau de la CSH dans un modèle murin *Prdm16*^{-/-} (Aguilo et al., 2011). En effet, la délétion de *Prdm16* augmente l'apoptose des CSHs. Les analyses d'expression montrent que *Prdm16* régule un nombre remarquable de gènes comme *Evi1*, *Bmi1*, *Gata2*, *Pbx1* et *p53*. Le mécanisme par lequel *Prdm16* régule la CSH semble complexe et affecte différentes voies comme la quiescence, l'apoptose, la prolifération et l'autorenouvellement.

Sur le plan clinique, sept cas avec la t(1;21)/*RUNX1-PRDM16* ont été publiés à ce jour (Tableau IX). Toutefois, cette translocation est possiblement plus fréquente car elle n'est pas détectée facilement en cytogénétique standard. Les cas décrits ont un mauvais pronostic, mais un plus grand nombre de cas rapportés sera nécessaire pour bien établir l'impact de cette anomalie génétique sur la survie des patients. De plus, le dépistage de ce réarrangement associé à la LMC-PB est important pour l'orientation thérapeutique de ces patients.

Tableau IX. Patients leucémiques avec une fusion *RUNX1-PRDM16* rapportés dans la littérature.

Type de leucémie	Caryotype	Publication	Traitement
LAM-M4	46,XX,t(1;21)(p36;q22)[20]	(Sakai et al., 2005)	<i>de novo</i>
LMC-PB	46,XX,t(9;22)(q34;q11),t(1;21)(p36;q22)[20]	(Hazourli et al., 2006)	Chimio, INF, allogreffe, IM
LAM avec différenciation minimale	46,XX,t(1;21)(p36;q22)[20] qui a évolué en: 46,XX,t(1;21)(p36;q22),del(7)(q?34)[7]/47,idem,+13[3]	(Stevens-Kroef et al., 2006)	Chimio et radiothérapie antérieures (cancer du sein), allogreffe
LAM avec dysplasie des trois lignées	45,XX,t(1;21)(p36;q22),-7	(Shing et al., 2007)	Décédée en dedans de 23 jours du diagnostic
LMC-PC	47,XY,t(9;22)(q34;q11),+21[20]	(Roche-Lestienne et al., 2008)	Hydroxyurée, allogreffe
LMC-PB	51,XY,-6,+8,+9,t(9;22)(q34;q11)x2, add(12)(p11),-17,+19,+21,+der(22)t(9;22),+2 mar[4] / 46,XY [16]	(Roche-Lestienne et al., 2008)	IFN, IM, allogreffe
LAL	50,XX,+4,i(7)(q10),t(9;22)(q34;q11),del(12)(p11;p13),+20,+21,+der(22)t(9;22) 6 / 46,XX [2]	(Roche-Lestienne et al., 2008)	Dasatinib

Tableau IX. Patients leucémiques avec une fusion *RUNX1-PRDM16* rapportés dans la littérature. La première colonne correspond au diagnostic morphologique des patients rapportés avec la fusion *RUNX1-PRDM16* : leucémie myéloïde chronique (LMC) en phase chronique (PC-LMC) ou en phase blastique (LMC-PB), leucémie aigüe myéloïde (LAM) classée selon la classification FAB : M4. La deuxième colonne indique la formule chromosomique des cellules leucémiques. La troisième colonne indique la publication. La quatrième colonne indique le traitement : chimio pour chimiothérapie, INF (Interféron), IM (Imatinib).

A ce jour, les partenaires identifiés de *PRDM16* sont les gènes *RPNI* dans la t(1;3) sans formation de gène de fusion (Lahortiga et al., 2004; Mochizuki et al., 2000; Shing et al., 2007; Xinh et al., 2003), *RUNX1* dans la t(1;21) avec formation du transcrite de fusion *RUNX1/PRDM16* (Hazourli et al., 2006; Sakai et al., 2005; Shing et al., 2007; Stevens-Kroef et al., 2006), *BACH2* dans la t(1;6)(p36;q15) avec formation du transcrite de fusion *BACH2/PRDM16* (Shing et al., 2007) et *AHII* dans la t(1;6)(p36;q23) sans formation transcrite de fusion (Shing et al., 2007). Dans ces translocations, les deux formes de *PRDM16* peuvent être surexprimées ou seulement la forme courte de *PRDM16*.

Récemment, dans une série de 120 patients avec réarrangements de la bande chromosomique 1p36, les groupes francophone et belge de cytogénétique hématologique ont suggéré d'inclure les translocations du gène *PRDM16* comme une entité distincte de LAM avec mauvais pronostic (Duhoux et al., 2012). Dans cette étude, 39 cas de LAM et SMD impliquaient des aberrations chromosomiques du locus 1p36 dont la majorité (30 cas) implique un réarrangement de *PRDM16* avec le locus *RPNI* (3q21). D'autres locis ont aussi été décrits (9 cas), dont un cas de LAM M7 secondaire qui présentait la t(1;21) avec une fusion impliquant *RUNXI* comme gène partenaire et un cas de LAM M4 avec une t(1;12)(p36;p13) générant une nouvelle fusion *ETV6-PRDM16* avec un cadre de lecture respecté. D'autres gènes ou locus partenaires ont été identifiés par FISH dans cette étude, tels que *IKAROS1 (IKZF1)* en 7p12.2 dans un cas de SMD, *WNT3* ou *NSF* en 17q21 dans une LAM, *CDH4* en 20q13 dans une LAM M2, et une séquence non codante (FLJ30838) dans une LAM M4 avec t(1;2)(p36;p12). De plus, l'altération de *THADA* (2p21) et du locus *IGL@* en 22q11 a été rapportée dans des translocations impliquant la bande 1p36 associées à des néoplasies lymphoïdes. Cependant ces dernières fusions n'ont pas été confirmées par RT-PCR et séquençage. Dans ces cas l'activation de la forme longue et courte de *PRDM16* a été décrite sauf pour un cas avec une t(1;7) impliquant un gène ayant une orientation opposée à celle de *PRDM16* et localisé en 5' de *PRDM16*. Ce gène, *FLJ42875*, a aussi été rapporté comme étant surexprimé conjointement avec *PRDM16* en phase blastique de la LMC (Storlazzi et al., 2008).

En conclusion, l'effet oncogénique de la fusion *RUNXI-PRDM16* n'a été étudié que sur un seul angle, soit celui de l'activation de la forme courte de *PRDM16*. Tel que déjà mentionné, la surexpression de *PRDM16s* pourrait bloquer la différenciation des cellules immatures (CSHs/progénéiteurs), et/ou augmenter la survie et l'autorenouvellement de ces cellules. D'autres mécanismes potentiels, détaillés dans la figure 39, sont aussi possibles. Des études fonctionnelles seront nécessaires pour étudier les effets oncogéniques de cette nouvelle fusion.

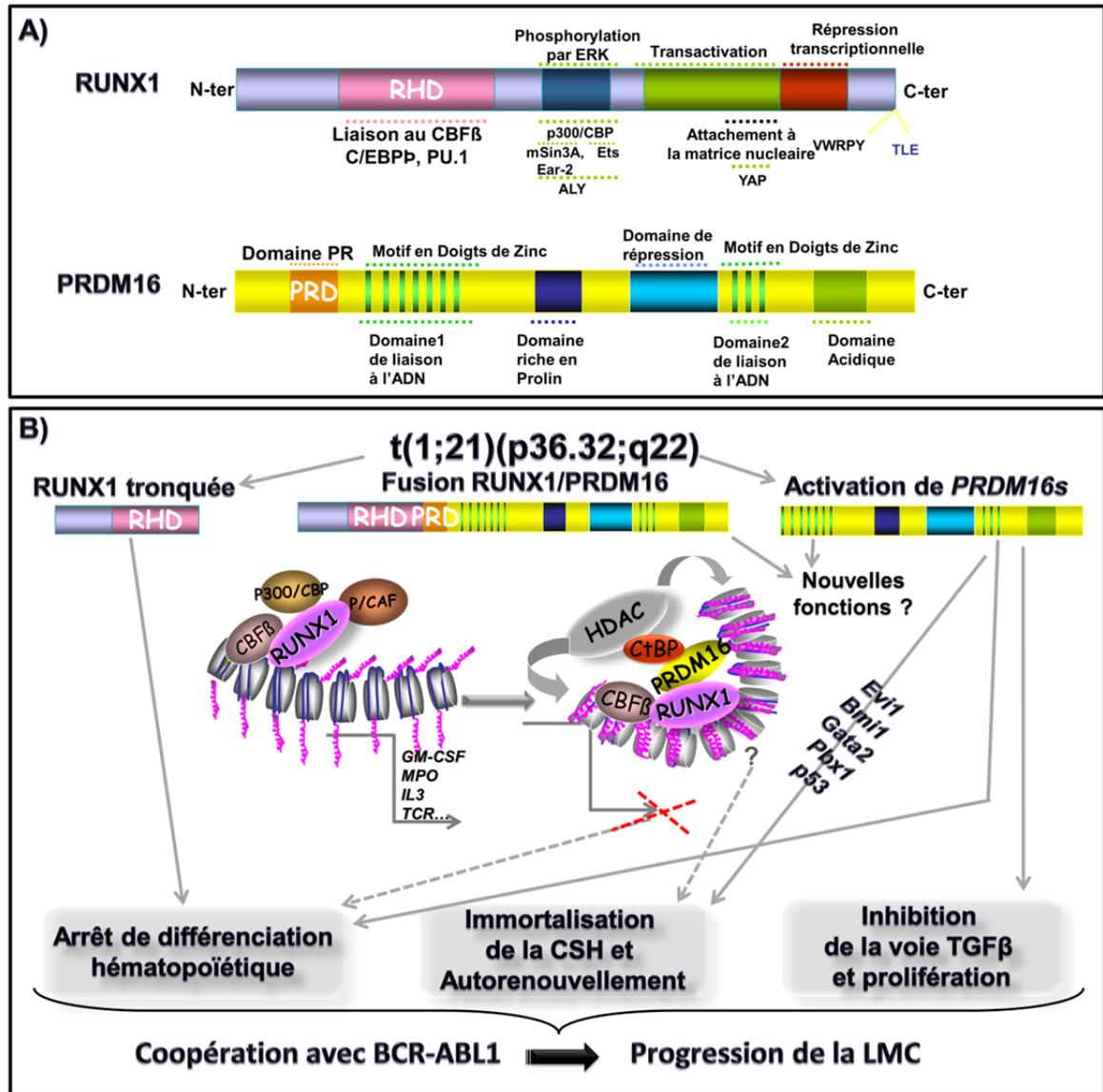


Figure 39. Modèle proposé du rôle oncogénique de la t(1;21) dans la progression de la leucémie myéloïde chronique.

A) Structure de RUNX1 et PRDM16. RUNX1 possède en N terminal un domaine RHD (Runt Homology Domain) de liaison à l'ADN et d'interaction avec CBF β , CEBP α et PU.1, suivi d'un domaine d'interaction avec plusieurs autres protéines (p300, CBP, mSin3A) et de phosphorylation par ERK. En C terminal, un domaine de transactivation, d'attachement à la matrice nucléaire, suivi d'un domaine de répression transcriptionnelle sont identifiés. PRDM16 possède en N terminal un domaine PR (PRDI-BF1-RIZ1 homologous), suivi d'un premier domaine de liaison à l'ADN en doigts de zinc, d'un domaine riche en proline, d'un domaine de répression transcriptionnelle, d'un deuxième domaine de liaison à l'ADN en doigts de zinc et enfin d'un domaine acide en C terminal. **B)** Suite à la t(1;21), il y a formation de formes tronquées de RUNX1 qui peuvent engendrer des protéines prédites avec un domaine RHD. Il y a également la formation d'un transcrite de fusion RUNX1-PRDM16 qui peut donner une protéine chimérique fonctionnelle incluant le domaine RHD

de RUNX1 et la quasi-totalité de PRDM16. De plus, la forme courte de PRDM16 est activée avec absence de son domaine PR. Les formes tronquées de RUNX1 pourraient induire un arrêt de différenciation myéloïde. La fusion RUNX1-PRDM16 pourrait aussi recruter CtBP, ce qui va entraîner un remodelage de la chromatine qui deviendra plus compacte suite au recrutement des HDACs (histones déacétylases), affectant ainsi la transcription des gènes cibles de RUNX1. L'activation de PRDM16s pourrait affecter également la différenciation hématopoïétique et l'expression d'un grand nombre de gènes tel que rapporté dans un modèle murin (*Evi1*, *Bmi1*, *Gata2*, *Pbx1*, *p53*). Cela entraînerait l'altération de plusieurs voies menant à l'augmentation de la prolifération et de l'autorenouveaulement de la cellule souche hématopoïétique (CSH). L'activation de *PRDM16s* peut induire un arrêt de différenciation granulocytaire. Ces altérations pourraient coopérer avec la fusion BCR-ABL1 dans la progression de la leucémie myéloïde chronique (LMC).

2. Caractérisation de la translocation t(7;17) et identification des fusions *MSI2-HOXA*, des formes tronquées de *MSI2* et activation de plusieurs gènes du cluster *HOXA*

L'investigation de la t(7;17) a révélé l'implication de quatre gènes, dont *MSI2* au niveau de la bande chromosomique 17q22 et trois gènes du cluster *HOXA*, *HOXA9*, *HOXA10* et *HOXA11*, au niveau de la bande chromosomique 7p15 dans la phase blastique de la LMC. Les gènes *HOX* codent pour des facteurs de transcription avec un total de 39 gènes qui sont répartis en 4 clusters chromosomiques différents : *HOXA* (7p15.2), *HOXB* (17q21.32), *HOXC* (12q13.13) et *HOXD* (2q31.1). Leur domaine homéobox (HD) de liaison à l'ADN présente une homologie significative avec les facteurs HOM-C chez la *Drosophila melanogaster* qui sont impliqués dans la subdivision embryonnaire en segments (gènes de segmentation) durant le développement. L'activation anormale d'un seul de ces gènes provoque des effets phénotypiques aberrants, comme la croissance d'une patte à la place d'une antenne chez la drosophile (Krumlauf, 1994; Owens and Hawley, 2002). La position de 3' à 5' d'un gène *Hox* au sein du cluster correspond à son expression chez la drosophile tout au long de son axe A-P. Ceci est connu comme étant la colinéarité temporo-spatiale (Gaunt, 1991; Krumlauf, 1994). Au niveau de l'hématopoïèse, les analyses d'expression effectuées dans les échantillons de moelle osseuse murine et humaine ont révélé que la majorité des gènes *Hox/HOX* des clusters *A*, *B* et *C* (mais non *D*) sont exprimés au niveau des cellules hématopoïétiques et préférentiellement dans les populations de CSHs ainsi qu'au niveau des progéniteurs immatures. Par la suite leur expression diminue lors de la différenciation et de la maturation (Giampaolo et al., 1994; Pineault et al., 2002; Sauvageau et al., 1994). Le locus *HOXA*, spécifiquement *HOXA9*, a été le plus étudié dans les modèles murins en raison de son rôle central dans les leucémies (Armstrong et al., 2002; Ferrando et al., 2003; Thorsteinsdottir et al., 2002). *Hoxa9* a été démontré comme induisant spontanément des LAM dans le modèle murin BXH2, suite à une intégration rétrovirale endogène (Moskow et al., 1995). *Hoxa9* induit l'expansion des cellules souches hématopoïétiques. Son expression ectopique induit l'autorenouvellement des CSHs et des progéniteurs et induit une LAM avec une période de latence longue (Thorsteinsdottir et al., 2002). La diminution d'expression de *Hoxa9* est associée à une différenciation hématopoïétique (Pineault et al., 2002; Thorsteinsdottir et al., 2002). Les souris *Hoxa9*

déficientes présentent des défauts au niveau de l'hématopoïèse myéloïde, lymphoïde et érythroïde ainsi qu'une réduction de l'autorenouvellement des CSHs (Lawrence et al., 2005; Lawrence et al., 1997). Chez l'humain, les études d'expression ont démontré que *HOXA9* est surexprimé dans plusieurs LAM et est un marqueur de mauvais pronostic (Golub et al., 1999). Certains types de leucémie, particulièrement ceux avec des réarrangements du gène *MLL* (*Mixed Lineage Leukemia*) montrent une forte expression des gènes du cluster *HOXA* (Armstrong et al., 2002; Casas et al., 2003; Ferrando et al., 2003), qui sont essentiels pour la transformation induite par les protéines de fusion *MLL* (Ayton and Cleary, 2003; Zeisig et al., 2004).

Le rôle de *Hoxa9* dans l'autorenouvellement a été documenté par Sauvageau et al., dans un modèle murin. Cette équipe a démontré que la surexpression des gènes *Hoxb4* et *Hoxa9* dans les cellules de la moelle osseuse augmente l'autorenouvellement au niveau de la cellule souche hématopoïétique. Toutefois, seulement *Hoxa9* est oncogénique (Lawrence et al., 1996; Sauvageau et al., 1995).

Récemment, Wang et al. ont démontré que l'effet oncogénique de *Hoxa9* est directement lié à l'activation de la *Ctnnb1* (Wang et al., 2010). En effet, la voie de signalisation Wnt peut être activée soit à partir des CSHs (modèle 1) ou à partir des progéniteurs GMPs (modèle 2) en introduisant des vecteurs exprimant *Hoxa9* et *Meis1*. Les cellules acquièrent alors des caractéristiques de CSLs avec activation de l'autorenouvellement. De plus, la perte de l'activation de la *Ctnnb1* limite la capacité des gènes *Hox* à transformer les GMPs (Wang et al., 2010). Les gènes cibles de *HOXA* ne sont pas bien connus. Cependant certaines interactions protéiques impliquant *HOXA9* ont été étudiées, par exemple, avec les protéines Smads (Shi et al., 2001) et spécifiquement *Smad4*, impliquées dans le contrôle de la croissance cellulaire. En effet, il a été démontré que l'abolition de l'interaction entre *Hoxa9/Nup98-Hoxa9* et *Smad4* induit l'apoptose de la CSL (Quere et al., 2011).

Suite au réarrangement du locus *HOXA* et au positionnement des gènes *HOXA* en aval de *MSI2* l'effet des éléments régulateurs en *cis* et en *trans* du locus *HOXA* pourrait être altéré. Comme exemple, mentionnons *HOTTIP*, un ARN intergénique non codant (lincRNA) qui a été identifié comme un élément activateur des gènes *HOXA*, crucial durant le développement. *HOTTIP* recrute le complexe WDR5-MLL1 qui induit la triméthylation de l'histone H3K4 et active l'expression des gènes *HOXA* (Wang et al., 2011). Par contre d'autres lincRNA pourraient aussi recruter des protéines du complexe PRC2 et induire la

triméthylation des histones H3K27 ce qui entraînerait une diminution de l'expression des gènes *HOXA* (Wang et al., 2009). Suite à la t(7;17), des modifications de ces éléments régulateurs de la chromatine pourraient potentiellement affecter l'expression des gènes du locus *HOXA*.

Dans les néoplasies hématologiques, seulement trois translocations impliquant les gènes *HOXA* ont été rapportées. La translocation t(7;11)(p15;p15) implique une fusion entre le gène *NUP98* (localisé à la bande chromosomique 11p15 et codant pour une composante d'un complexe de pore nucléaire) et les gènes *HOXA9*, *HOXA11* et *HOXA13* (bande chromosomique 7p15). Elle a été décrite dans les LAM, les syndromes myélodysplasiques et la LMMC. La fusion la plus fréquente et la mieux étudiée est la fusion *NUP98-HOXA9* qui agit comme un facteur de transcription aberrant (Borrow et al., 1996; Hatano et al., 1999; Nakamura et al., 1996a; Wong et al., 1999a). La seconde translocation est la t(7;17), rapportée dans un seul cas de LMC transformée. Elle génère une fusion *MSI2-HOXA9* avec un point de cassure qui diffère de notre cas (Barbouti et al., 2003). Une troisième translocation ou inversion chromosomique, t(7;7)(p15;q34)/inv(7)(p15q34)/ *TCRB-HOXA* (fusion génomique avec absence de transcrite de fusion) a été décrite chez des patients avec une LAL T (Cauwelier et al., 2007; Soulier et al., 2005).

Les transcrits chimériques identifiés suite aux fusions *NUP98-HOXA9*, *NUP98-HOXA11* et *NUP98-HOXA13* comprennent en 5' la partie de *NUP98* contenant les séquences codant pour des motifs de répétitions FG qui interagissent avec les transporteurs nucléoplasmiques des protéines (Fontoura et al., 2000; Radu et al., 1995a; Radu et al., 1995b; Yaseen and Blobel, 1997), ainsi que le motif GLEBS qui joue un rôle dans l'export des ARNs en interagissant avec le facteur d'export RAE1 (Pritchard et al., 1999). Un domaine d'activation transcriptionnelle est aussi présent. La partie 3' de la fusion implique des séquences de *HOXA9* qui codent pour le domaine homéobox ainsi que pour un motif court ANWL du domaine HD qui peut interagir avec les cofacteurs de transcription de la famille PBX (Nakamura et al., 1996b). Dans la fusion, il y aura donc une perte de la portion N-terminale de *HOXA9* où se trouve le site d'interaction avec MEIS1, un cofacteur important dans l'activité transcriptionnelle hématopoïétique de *HOXA9* (Shen et al., 1999). Ceci pourrait expliquer du moins en partie, la différence dans la latence pour induire une leucémie chez la souris entre la fusion *NUP98-HOXA9* et la surexpression de *HOXA9*. Le point de cassure au niveau des gènes *HOXA* semble donc déterminant pour l'effet

oncogénique de la fusion, avec présence ou absence du domaine HD et du motif d'interaction avec les cofacteurs de *HOXA*.

Dans les fusions *MSI2-HOXA* étudiées dans ce travail, nous perdons également les motifs d'interaction avec PBX1 et MEIS1 ainsi que le domaine homéobox caractéristique des gènes *HOX*, car le cadre de lecture n'est pas respecté. Toutefois, le point de cassure de la translocation au niveau des gènes *HOXA9* et *HOXA11* est le même que celui rapporté dans la littérature soit au niveau de l'exon 1 (anciennement nommé exon 1b) exactement à la position de la valine (GTT) (Figures 20 et 21). Nous avons décrit que le point de jonction dans la translocation t(7;17) correspond au site d'épissage de *HOXA9* et aussi au site d'épissage du transcrit *HOXA9-HOXA10*. Au niveau de ce site d'épissage, le site accepteur AG est localisé juste avant les nucléotides TT qui représentent le début de *HOXA9* dans les fusions (Figure 23). De plus, les points de cassure de la t(7;17) au niveau du gène partenaire de *HOXA9*, *MSI2*, démontrent une hétérogénéité (soit dans l'exon 5 dans notre cas vs l'exon 9 dans le cas rapporté dans la littérature), générant des produits qui peuvent respecter ou non le cadre de lecture.

Comment expliquer l'effet oncogénique des fusions en absence du domaine homéobox caractéristique des gènes *HOXA*? Plusieurs évidences suggèrent que l'effet oncogénique de la fusion NUP98-HOXA9 ne se limite pas au domaine homéobox. Récemment il a été démontré par Yassin *et al.*, que l'effet de la fusion NUP98-HOXA9 sur la différenciation dépend principalement de la portion NUP98 (Yassin *et al.*, 2009). Ceci a été démontré en comparant la capacité de transformation des cellules primaires hématopoïétiques humaines CD34+ de NUP98-HOXA9 avec une mutation N51S au niveau du domaine homéobox, avec celle du mutant NUP98-HOXA9 qui ne possède pas la partie NUP98 et celle de la fusion NUP98-HOXA9 intacte. Les résultats ont démontré que la différenciation n'est pas abolie lorsque le domaine homéobox est muté et que la fusion semble réguler la transcription sans liaison à l'ADN (Yassin *et al.*, 2009). Plusieurs autres fusions décrites contiennent cette partie N terminale de NUP98 et le domaine homéobox de HOXA9 est absent (Su *et al.*, 2006). Ceci suggère qu'il existe un effet indépendant de ce domaine qui contribue à la leucémogénèse, et qui est relié à la portion NUP98 de la fusion.

D'autre part, l'effet oncogénique des fusions peut aussi être relié à l'activation des gènes *HOXA*. Ce mécanisme a été décrit dans l'étude de Soulier *et al.*, chez des patients avec LAL T porteur de l'inversion inv(7)(p15q34) ou de la translocation t(7;7)(p15;q34) avec une fusion génomique *TCRB-HOXA*, qui entraîne une surexpression de plusieurs gènes

HOXA. Dans cette étude, les gènes *HOXA* surexprimés sont localisés des deux côtés des points de cassure entre *HOXA9* et *HOXA10*. Aucun transcrite de fusion *TCRB-HOXA* n'a pu être identifié chez ces patients (Soulier et al., 2005). Dans notre translocation t(7;17), nous avons une formation de différents transcrits de fusion *MSI2-HOXA* qui activent l'expression de plusieurs gènes du locus *HOXA*. L'activation des gènes du locus *HOXA* pourrait être secondaire à la juxtaposition de ce locus avec la partie 5' de *MSI2*. Un autre mécanisme possible est une surexpression secondaire à des changements épigénétiques reliés à l'échange de matériel chromosomique entre les chromosomes 7 et 17 (modifications de la chromatine, effet de nouveaux éléments régulateurs en *cis* ou en *trans*).

L'effet oncogénique de l'activation des gènes du cluster *HOXA* au niveau du système hématopoïétique a été démontré en comparant les conséquences de l'expression induite de ces gènes. Bach et al., (Bach et al., 2010) ont démontré dans les cellules primaires hématopoïétiques de la souris transfectées par des vecteurs rétroviraux contenant les gènes *HOXA* humains, que l'expression de tous les gènes *HOXA*, à l'exception de *HOXA5*, induit un retard dans la différenciation hématopoïétique. Dans cette étude, l'induction de la leucémie par les gènes *HOXA* en présence de leur cofacteur *Meis1* est accélérée. Lorsque *HOXA9* et *Meis1* sont coexprimés, ce temps de latence diminue et les souris développent une leucémie au jour 52. L'effet oncogénique des gènes *HOXA7*, *HOXA9* et *HOXA10* a aussi été confirmé dans d'autres études (Bjornsson et al., 2001; Nakamura et al., 1996b). De plus, il a été rapporté que trois autres gènes *HOXA* ont un potentiel transformant, soit *HOXA1*, *HOXA4* et *HOXA6* (Bach et al., 2010). *HOXA9* serait l'oncogène le plus fort, mais un effet plus important relié à l'altération concomitante de plusieurs gènes *HOXA* est possible. Dans notre cas avec la t(7;17), l'activation des gènes *HOXA6*, *HOXA7*, *HOXA9* et *HOXA10*, mais non de *HOXA5*, *HOXA11* et *HOXA13* a été démontrée.

Il est aussi possible que le microARN mir-196b, localisé entre les gènes *HOXA9* et *HOXA11*, fusionnés avec *MSI2* dans notre cas, soit surexprimé (non étudié). De façon intéressante, une surexpression de mir-196b a été démontrée dans les cellules de moelle osseuse transformées par la fusion *MLL-AF9*, surexpression qui est nécessaire pour l'effet oncogénique de la fusion *MLL*. De plus, l'inactivation de ce microARN abolit l'immortalisation des cellules souches et des progéniteurs induite par la fusion *MLL* (Popovic et al., 2009). Dans notre cas, *HOXA9* semble être le gène *HOXA* le plus activé

mais l'activation des gènes *HOXA6*, *HOXA7* et *HOXA10* pourrait avoir un effet potentialisateur.

L'implication simultanée de deux gènes *HOXA* dans une même translocation chromosomique n'a été rapportée qu'une seule fois par Fujino T et al., 2002 (Fujino et al., 2002) chez deux patients avec la translocation chromosomique t(7;11)(p15;p15). Dans le premier cas le point de cassure était dans l'intron 1 de *HOXA11* et dans le deuxième cas dans l'intron 1 de *HOXA13*, donnant des fusions *NUP98-HOXA11* et *NUP98-HOXA13*. Chez les deux patients, il y avait aussi présence d'une fusion *NUP98-HOXA9* au niveau de l'ARN. Ceci suggère que la t(7;11) peut produire plus qu'un transcrite de fusion *NUP98-HOXA* suite à un épissage alternatif. De façon similaire, dans notre cas avec la t(7;17) nous avons une seule translocation, impliquant plusieurs gènes *HOXAs* différents avec le même gène partenaire, *MSI2*.

L'expression des différents transcrits *MSI2-HOXA* pourrait être la conséquence d'un épissage alternatif aberrant. En effet, suite à la translocation chromosomique, il y aurait sélection d'un site d'épissage additionnel au niveau de *HOXA9*. Par conséquent, ce site d'épissage accepteur au niveau de *HOXA9* pourrait être un candidat pour la machinerie transcriptionnelle produisant différents épissages au niveau du cluster *HOXA*. Cette hypothèse a été proposée par Fujino et al., en 2002 (Fujino et al., 2002) dans une étude portant sur la t(7;11) avec différentes fusions *NUP98-HOXA*. Nos résultats démontrent un site d'épissage commun entre notre cas avec la fusion *MSI2-HOXA9* et le transcrite *HOXA9T* que nous avons identifié (Figure 23), ainsi que le nouvel épissage alternatif impliquant *HOXA9* et *HOXA10* récemment décrit.

Dans la t(7;17), nous avons identifié que la partie 5' de *MSI2* (exons 1 à 5 ou 6) est présente dans les transcrits de fusion. *MSI2* possède deux domaines RRM, aussi nommé RBD « RNA binding domain » ou RNP « ribonucleoprotein domain » qui est le domaine le plus abondant de liaison à l'ARN chez les vertébrés (Venter et al., 2001). Le premier domaine RRM de *MSI2* est codé par l'exon 2 à partir du deuxième nucléotide puis par les exons 3, 4 et les 3 premiers nucléotides de l'exon 5. Le deuxième domaine RRM est codé par l'exon 6 à partir du 19^{ème} nucléotide puis par les exons 7, 8 et une partie de l'exon 9. Le point de cassure génomique de notre translocation est possiblement localisé dans l'intron 5 ou 6 de *MSI2*. Le domaine RRM hétérodimérise avec d'autres domaines RRM de plusieurs protéines et peut également interagir avec l'ADN et la topoisomérase 1 (Clery et al., 2008; Ishikawa et al., 2012; Trzcinska-Daneluti et al., 2007). *MSI2*, conjointement avec *MSI1*,

fait partie de la famille des Musashis impliquée dans la régulation de la division cellulaire asymétrique des organes précurseurs sensoriels chez la *Drosophila* (Nakamura et al., 1994). Des études ont aussi identifié les membres de cette famille comme ayant un rôle dans la localisation, la stabilisation, la polyadénylation et la régulation de la traduction des ARNm et cela grâce à leur deux motifs qui reconnaissent l'ARN (Lai and Li, 1999; Okabe et al., 2001). Chez la souris, un rôle de ces gènes dans le développement du système nerveux central et plus spécifiquement au niveau de la prolifération et du maintien de la cellule souche neuronale et des précurseurs a été rapporté (Kaneko et al., 2000; Sakakibara et al., 2001; Sakakibara et al., 2002). *MSI2* est préférentiellement exprimé au niveau de la CSH. Il a été démontré qu'il est un régulateur positif important de la CSH murine (Hope et al., 2010). En effet, sa déplétion par shRNA (Short hairpin) altère significativement la repopulation des CSHs et entraîne la différenciation, contrairement au phénotype observé lors de la surexpression de *Msi2*. Ces résultats suggèrent un rôle de *Msi2* au niveau de l'autorenouvellement de la CSH murine. De plus, tel que mentionné dans l'introduction, des travaux récents appuient un rôle de *Msi2/MSI2* dans l'autorenouvellement de la CSH et la progression de la LMC ainsi que dans la voie *MSI2-Numb-Notch* (Hope et al., 2010; Hope and Sauvageau, 2011; Moore, 2010).

L'allèle normal de *MSI2* pourrait aussi être activé par *HOXA9* suite à la t(7;17). En effet, rappelons que Ito et al., ont montré que la protéine murine HoxA9 peut se lier à la région promotrice de *Msi2* et activer son expression directement. Les auteurs ont aussi démontré dans les cellules LSKs que l'expression de la fusion NUP98-HOXA9 active aussi l'expression de *Msi2* (Ito et al., 2010).

Nous émettons donc l'hypothèse que suite à la translocation t(7;17), un des deux allèles de *MSI2* est altéré par fusion avec différents gènes *HOXA* et que l'activation de ces gènes, dont *HOXA9*, pourrait ensuite altérer l'allèle sauvage de *MSI2*.

Enfin, dans les cellules leucémiques avec la t(7;17), la présence de plusieurs formes courtes de *MSI2* comprenant un seul domaine RRM pourrait avoir plusieurs effets aberrants et/ou nouvelles fonctions au niveau des ARN ou ADN cibles (Clery et al., 2008).

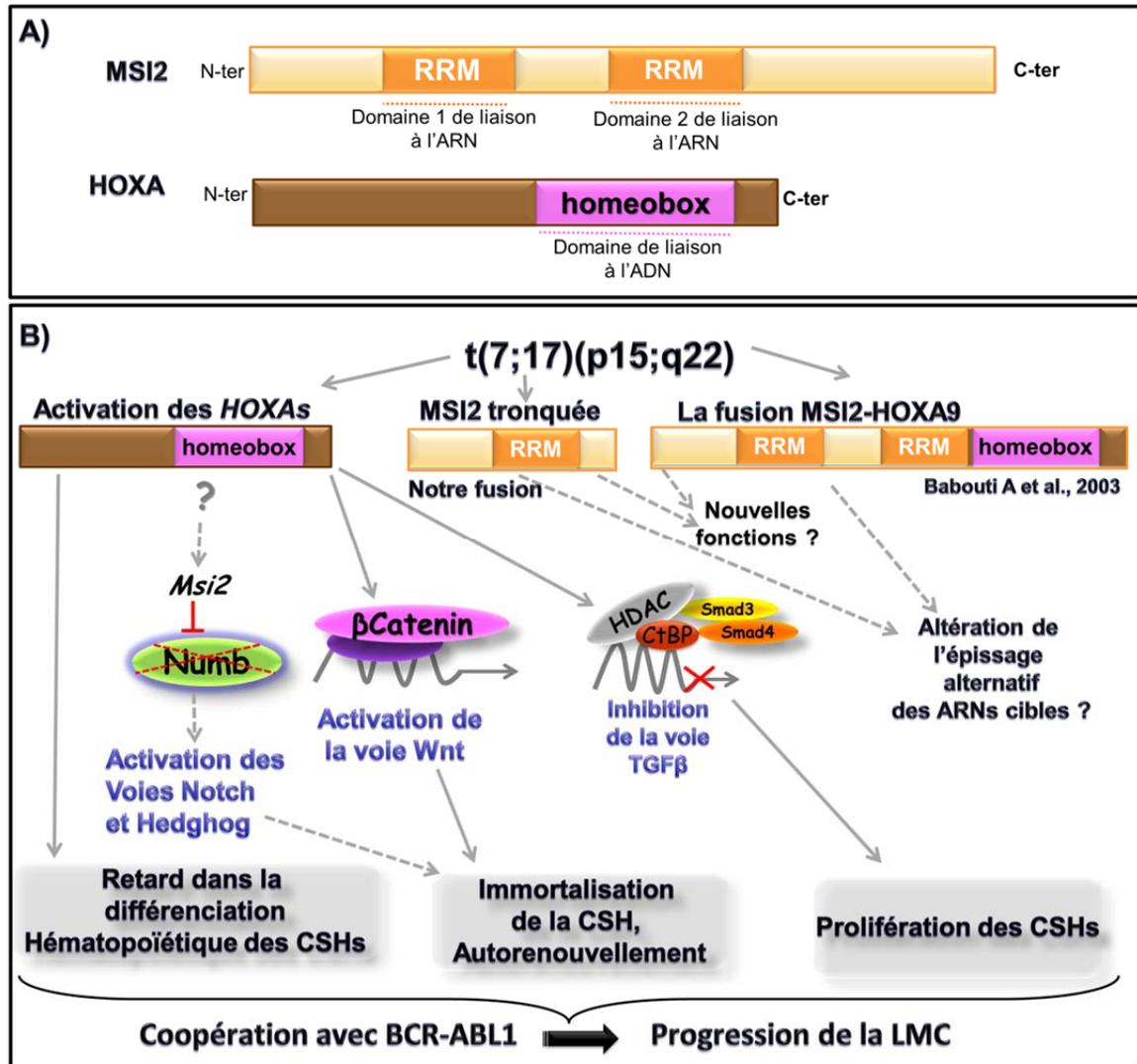


Figure 40. Modèle proposé du rôle oncogénique de la t(7;17) dans la progression de la leucémie myéloïde chronique.

A) Structure des protéines MSI2 et HOXA et domaines présents. MSI2 possède deux domaines de liaison à l'ARN, les domaines RRM (RNA recognition motif). Les protéines HOXA possèdent un domaine de liaison à l'ADN, le domaine homéobox. **B)** Suite à la t(7;17), il y a formation d'une forme tronquée de MSI2 qui pourrait être traduite en une protéine prédite avec un seul domaine RRM. Cette protéine pourrait potentiellement affecter l'épissage alternatif des ARN cibles, avoir de nouvelles fonctions et/ou être impliquée dans l'immortalisation et/ou la prolifération des cellules souches hématopoïétiques (CSHs). L'activation des gènes HOXA pourrait affecter la différenciation hématoïétique et être impliquée dans l'augmentation de la prolifération et de l'autorenouvellement des CSHs par différentes voies comme la voie Wnt ou l'activation des voies Notch et Hedghog. Ces altérations pourraient coopérer avec la fusion BCR-ABL1 dans la progression de la leucémie myéloïde chronique (LMC).

3. Caractérisation de la translocation t(2;12) et identification de la fusion *ETV6-HOXD11*, d'une forme tronquée de *ETV6* et activation de *HOXD9*

Dans la translocation t(2;12)(q31;p13) nous avons identifié pour la première fois un réarrangement du gène *ETV6* et du locus *HOXD* ainsi qu'une fusion *ETV6-HOXD11*. Deux cas avec cette même translocation ont été rapportés antérieurement. Le premier cas décrit est un patient porteur d'un lymphome non-hodgkinien dont le réarrangement de *ETV6* a été confirmé par FISH mais le gène partenaire n'a pas été identifié (Sato et al., 1997). Le deuxième cas est un patient avec une leucémie myéломocyttaire chronique et les gènes impliqués n'ont pas été identifiés (Huret, 2006). Dans notre cas les deux premiers exons de *ETV6* sont transloqués sur le chromosome dérivé 2, et la séquence obtenue inclut ces deux exons suivie d'un codon stop. Au niveau de ces deux exons, les deux sites d'initiation de la transcription de *ETV6* sont inclus, ce qui pourrait activer le locus ou certains membres du locus *HOXD*. Les gènes *HOXD* ne sont normalement pas exprimés lors de l'hématopoïèse définitive. Dans notre cas nous avons détecté une expression anormale de *HOXD9* par RT-PCR dans les cellules avec la t(2;12).

Le gène *ETV6* (ETS variant gene 6) code pour un répresseur de la transcription. Il fait partie de la famille des facteurs de transcription ETS (E-twenty six) essentiels pour l'hématopoïèse adulte. Lorsqu'altéré, il joue un rôle important dans plusieurs types de cancers, incluant les leucémies (Bohlander, 2005). Le rôle de *ETV6* au niveau de l'hématopoïèse adulte a été démontré par Wang et al. (Wang et al., 1998) chez les souris chimères générées à partir des cellules souches embryonnaires *Etv6*^{-/-}. Dans ce modèle murin, *Etv6* n'est pas impliqué au niveau de la prolifération et/ou la différenciation embryonnaire murine mais plutôt dans l'établissement de toutes les lignées hématopoïétiques à partir de la MO. Les embryons issus du « knockout » de *Etv6* meurent au jour 11 (E11) à cause d'une formation anormale des vaisseaux sanguins et des cellules hématopoïétiques (Wang et al., 1998). *Etv6* a été démontré comme étant essentiel pour l'hématopoïèse chez l'adulte et pour la différenciation hématopoïétique normale. Suite à l'inactivation d'*Etv6*, il a été démontré que les CSHs sont perdues au niveau de la MO adulte. Par contre, les progéniteurs ne sont pas affectés et continuent de se différencier. Les lignées hématopoïétiques ne semblent pas affectées par l'absence d'*Etv6* à l'exception de

la maturation des mégacaryocytes (Hock et al., 2004). Récemment un rôle crucial d'Etv6 au niveau de la CSH a été démontré lors de l'établissement de l'hématopoïèse définitive et cela via la régulation de l'expression de VegfA, un régulateur majeur pour le développement endothélial et hématopoïétique (Ciau-Uitz et al., 2010). Ceci suggère que l'altération d'un des deux allèles de *ETV6* lors d'une translocation chromosomique pourrait induire une différenciation hématopoïétique anormale mais aussi une anomalie du pool des CSHs. ETV6 partage avec d'autres membres de la famille ETS, le domaine conservé ETS de 88 acides aminés en C-terminal qui est un domaine spécifique de liaison à l'ADN mais qui permet aussi les interactions protéine-protéine. Il est hautement conservé et retrouvé chez les invertébrés comme la drosophile et *C.elegans* (Oikawa and Yamada, 2003; Wasyluk et al., 1993). Les membres de la famille ETS sont essentiels pour plusieurs processus cellulaires incluant la prolifération, la différenciation, la migration, le remodelage des tissus, l'angiogenèse, l'apoptose ainsi que l'hématopoïèse et la transformation cellulaire (Oikawa and Yamada, 2003; Wasyluk et al., 1993). L'autre domaine conservé, retrouvé chez plusieurs membre de la famille ETS, est le domaine hélice double hélice HLH (Helix-loop-helix) ou domaine pointed/SAM ou domaine PTN (pointed) de 652 acides aminés en N-terminal, impliqué dans l'homo et l'hétérodimérisation avec les facteurs de transcription et avec les protéines de signalisation (exemple dans la voie MAPK) (Grimshaw et al., 2004). *ETV6* possède 8 exons avec un exon alternatif 1b localisé au niveau de l'intron 2 à 12 kb en 5' de l'exon 3 (Baens et al., 1996), ainsi que deux sites d'initiation de la traduction ATG1 et ATG43, donnant deux isoformes protéiques d'ETV6 (Poirel et al., 1997). Dans la t(2;12) caractérisée dans ce travail, *ETV6* est altéré avec un point de cassure qui sépare les deux premiers exons des exons 3 à 8. La séquence obtenue *ETV6-HOXD11* donne un codon STOP prématuré après l'exon 2 de *ETV6*, ce qui pourrait affecter les fonctions normales de ETV6.

Dans les leucémies, *ETV6* est transloqué dans plusieurs types différents de cancers hématologiques. Une grande diversité de gènes partenaires de *ETV6* qui codent pour des facteurs de transcription ou des tyrosines kinases ont été identifiés (De Braekeleer et al., 2012). Les points de cassure au niveau de *ETV6* sont variables. Ils sont localisés au niveau de l'intron 1 (par exemple avec les gènes partenaires *CHIC2*, *ACSL5*, *TTL*, *PER1*), de l'intron 2 (fusion avec *MNI*, *MECOM*, *CHIC2*, *CDX2*, *PAX5*, *MNX1*, *MDS2*), de l'intron 3 (fusion avec *MNI*), de l'intron 4 (fusion avec *PDGFRB*, *ABL1*, *NTRK3*, *JAK*) et de l'intron 5 (fusion avec *RUNX1*, *JAK2*, *ABL1*, *ABL2*, *FGFR3* et *SYK*) (Bohlander, 2005; De

Braekeleer et al., 2012). Certaines fusions de *ETV6* avec les tyrosines kinases sont bien caractérisées. Ces études ont démontré que le domaine pointed/SAM de *ETV6* sert à la dimérisation pour la protéine de fusion, induisant une activation constitutive de la tyrosine kinase et la phosphorylation de plusieurs protéines impliquées dans différentes voies cellulaires (Carroll et al., 1996; Golub et al., 1996; Jousset et al., 1997; Okuda et al., 1996; Spiekermann et al., 2002). Par exemple, la t(9;12)/fusion *ETV6-ABL1* est retrouvée dans de cas rares de leucémie et ces patients ont une activation constitutive de *ABL1* sous l'effet de la région promotrice de *ETV6* ce qui explique leur réponse à l'IM (Perna et al., 2011).

ETV6 est aussi souvent fusionné avec des gènes codant pour des facteurs de transcription. Dans ce groupe, la fusion *ETV6-RUNX1* est la plus fréquemment détectée dans les LAL pédiatriques (25%) (Shurtleff et al., 1995). Dans ces cas, les domaines pointed/SAM de *ETV6* et la quasi-totalité de *RUNX1* y compris son domaine de liaison à l'ADN sont présents, ce qui va convertir *RUNX1* en un répresseur transcriptionnel, altérant la différenciation via le recrutement des corépresseurs comme *NCOR* et *Sin3A* (Guidez et al., 2000; Hiebert et al., 1996; Uchida et al., 1999). D'autres mécanismes oncogéniques ont aussi été proposés tel que l'altération de l'activité de *ETV6* par dimérisation via les domaines HLH (Gunji et al., 2004; McLean et al., 1996). Récemment, il a été démontré que *ETV6-RUNX1* interfère au niveau de l'apoptose en affectant des gènes anti-apoptotiques comme la survivin (Diakos et al., 2007; Fischer et al., 2005), ainsi qu'au niveau de l'autorenouvellement et la quiescence des CSLs (Hong et al., 2008; Schindler et al., 2009).

Donc l'effet oncogénique de *ETV6* altéré dépend d'une part, de son gène partenaire et d'autre part, des domaines de *ETV6* présents dans les fusions.

En phase blastique de la LMC, *ETV6* est transloqué avec *MECOM/EVII* dans la t(3;12) avec un point de cassure dans l'intron 2 de *ETV6*. Cette translocation génère une fusion de l'exon 2 de *ETV6* avec l'exon 2 de *MECOM/EVII* (Nakamura et al., 2002). Des séquences de *ETV6-EVII* respectant le cadre de lecture ainsi qu'un épissage intergénique générant une fusion *ETV6-MDS1-EVII* ont été rapportées (Peeters et al., 1997).

Aucune translocation fusionnant le gène *ETV6* avec les gènes *HOX* n'a été décrite à ce jour. Cependant *ETV6* est transloqué dans les leucémies avec deux gènes homéobox ne faisant pas partie de la famille des gènes *HOX*, soit le gène *CDX2* dans la translocation

t(12;13)(p13;q12) et le gène *MNX1* dans la translocation t(7;12)(q36;p13). Dans la fusion *ETV6-CDX2* deux transcrits ont été identifiés qui peuvent respecter ou non le cadre de lecture (Chase et al., 1999). Dans cette étude, les auteurs rapportent deux autres patients avec la t(12;13) qui expriment le *CDX2* mais en absence de la fusion *ETV6-CDX2*. Pour la t(7;12)/fusion *MNX1-ETV6*, l'exon 1 de *MNX1* fusionne avec les exons 2 et 3 de *ETV6* avec présence des deux domaines principaux de *ETV6* et du domaine homéobox de *MNX1* (Beverloo et al., 2001). Ces études confirment la diversité des conséquences des translocations impliquant *ETV6*.

Les translocations chromosomiques incluant seulement les deux premiers exons de *ETV6* en 5' avec d'autres gènes partenaires ne sont pas fréquentes (Jalali et al., 2008) et impliquent les partenaires suivants : *MDS2* (Odero et al., 2002), *MECOM* (Nakamura et al., 2002; Peeters et al., 1997), *STL* (Suto et al., 1997), *GOT1* (Janssen et al., 2006), *BAZZA* (Panagopoulos et al., 2006) et *CDX2* (Chase et al., 1999). Ce groupe de translocations est associé à une augmentation de l'expression du gène partenaire de *ETV6* ou des gènes qui sont à proximité de *ETV6* transloqué. De façon intéressante, il a été démontré dans certaines translocations chromosomiques ayant un point de cassure dans l'intron 2 de *ETV6*, que la forme tronquée résultante (codée par les exons 1 et 2 de *ETV6*) augmente l'expression des gènes localisés près du point de cassure qui se transforment alors en oncogènes. C'est le cas par exemple, du gène homéobox *TLX3* dans la t(5;12) et ce, même si la séquence de *ETV6* (exon1-exon2) est en orientation opposée à celle de *TLX3* (Jalali et al., 2008).

Afin de vérifier si l'un des gènes du locus *HOXD* situé à proximité des exons 1 et 2 de *ETV6* transloqué était activé dans les cellules du patient avec la t(2;12), une étude de RT-PCR avec des amorces ciblant l'allèle normal et/ou transloqué de *HOXD9* a été effectuée. Nos résultats démontrent une activation de *HOXD9* (allèle normal et/ou transloqué). Nous n'avons pas réussi à amplifier une fusion *ETV6-HOXD9* avec la combinaison d'amorce utilisée, ce qui n'exclut pas cette possibilité. La quantité de matériel cellulaire insuffisant pour ce cas ne nous a pas permis d'étudier cette question de façon plus approfondie.

Récemment il a été démontré qu'une surexpression de *HOXD9* contribue à la prolifération et/ou la survie des cellules souches cancéreuses du gliome (Tabuse et al., 2011). L'inhibition de l'expression de *HOXD9* dans des lignées cellulaires de gliome induit l'apoptose avec réduction de l'expression de *BCL2*, suggérant que *HOXD9* est possiblement impliqué dans la survie de ces cellules. Il a aussi été rapporté que

l'expression de *HOXD9* peut être induite par la voie de signalisation Wnt (Ishikawa and Ito, 2009) et que *HOXD9* est impliquée dans le maintien des cellules souches neuronales (Willert et al., 2003) ainsi que des cellules de la crête neurale (Garcia-Castro et al., 2002). Les gènes du cluster *HOXD* ont aussi été impliqués dans des translocations chromosomiques avec *NUP98* comme partenaire, tel que dans les fusions *NUP98-HOXD13* (*ND13*) et *NUP98-HOXD11* dans la LAM avec la t(2;11)(q31;p15) (Emerenciano et al., 2011; Hidaka et al., 2007; Raza-Egilmez et al., 1998; Shimada et al., 2000). Les fusions *NUP98-HOXD* sont moins étudiées que les fusions *NUP98-HOXA*. Cependant des structures similaires sont impliquées, soit les domaines codés par la portion 5' de *NUP98* et le domaine homéobox codé par les gènes *HOX*. Il a été démontré chez la souris transgénique NHD13, qu'il y a un arrêt de la différenciation lymphoïde, myéloïde et érythroïde et que ce blocage est associé à une surexpression des gènes *Hoxa7*, *Hoxa9* et *Hoxa10*. Il a aussi été rapporté par ce groupe que l'expression de la fusion NHD13 dans les cellules murines bloque la différenciation hématopoïétique normale, mais que ce blocage était insuffisant pour la transformation maligne. Dans cette étude, la fusion BCR-ABL1 était capable de compléter l'effet de la fusion NHD13 pour induire une leucémie (Slape et al., 2007). Ce dernier modèle rappelle celui de la collaboration entre la fusion *NUP98-HOXA9* et la fusion BCR-ABL1 dans l'induction de la leucémie (Mayotte et al., 2002).

Dans les cellules de notre cas avec la t(2;12), les conséquences de cette translocation sont l'altération du gène *ETV6* et de son gène partenaire *HOXD11*, ainsi que l'activation du gène *HOXD9* (Figure 41). Ceci ressemble au modèle de la fusion *ETV6-CDX2* qui respecte ou non le cadre de lecture, plutôt qu'au modèle de la fusion *NUP98-HOXD* (Chase et al., 1999). Des études plus approfondies des translocations impliquant *ETV6* avec un point de cassure dans l'intron 2 aideront à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans ces réarrangements, incluant les facteurs épigénétiques associés (Jalali et al., 2008).

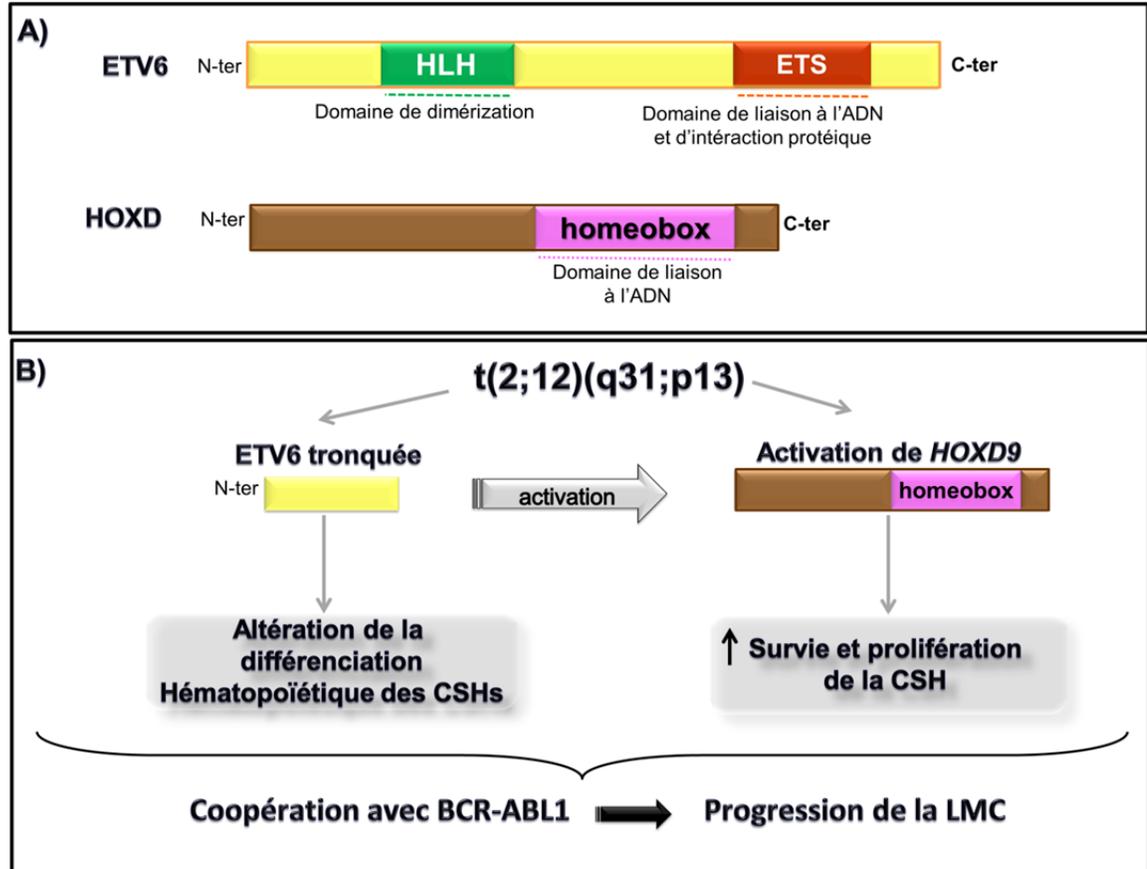


Figure 41. Modèle proposé du rôle oncogénique de la t(2;12) dans la progression de la leucémie myéloïde chronique.

A) Structure des protéines HOXD et ETV6 et domaines présents. Les protéines HOXD possèdent un domaine de liaison à l'ADN, le domaine homéobox. La protéine ETV6 possède en N terminal un domaine de dimérisation hélice double hélice (domaine HLH) et en C terminal un domaine de liaison à l'ADN et d'interaction protéique (domaine ETS). **B)** Suite à la t(2;12), il y a une activation de *HOXD9* qui pourrait augmenter la prolifération et la survie des cellules souches hématopoïétiques (CSHs). L'altération de ETV6 pourrait affecter la différenciation hématopoïétique. Ces altérations pourraient coopérer avec la fusion BCR-ABL1 dans la progression de la leucémie myéloïde chronique (LMC).

4. Caractérisation de la translocation t(8;17) et identification de l'altération des gènes *MSI2* et *SOX17*

L'investigation de la translocation chromosomique t(8;17)(q11;q22) a révélé une altération du gène *MSI2* et du locus *SOX17*. Notre travail présente pour la première fois la caractérisation moléculaire de cette translocation récurrente. La confirmation d'un autre réarrangement chromosomique impliquant *MSI2* dans la phase blastique de la LMC supporte son rôle dans cette leucémie. Le rôle de *MSI2* dans la progression de la LMC a été étudié dans un modèle murin ainsi que chez l'humain où son expression est augmentée chez les patients en phase blastique de la LMC par rapport à son expression en phase chronique (Ito et al., 2010; Kharas et al., 2010). Le point de cassure de la t(8;17) au niveau de *MSI2* est localisé dans la région 3' alors que celui identifié dans notre cas avec la t(7;17) se situe dans la région 5' du gène. Toutefois le deuxième domaine RRM de *MSI2* est absent dans ces deux fusions. Aucun transcrite de fusion *MSI2-SOX17* n'a été détecté dans notre travail. L'absence de transcrite de fusion dans une translocation chromosomique impliquant *MSI2* a déjà été décrite dans la t(3;17)(q26;q22) associée à des LAM et à la LMC-PB. Dans cette anomalie génétique, le point de cassure au niveau de *MSI2* est localisé dans sa partie 5' et le locus *MECOM/EVII* (bande chromosomique 3q26) est réarrangé et surexprimé suite à sa juxtaposition avec *MSI2* (De Weer et al., 2008). Lorsque *MSI2* est impliqué dans des translocations chromosomiques, il peut former ou non des transcrits de fusion et peut affecter l'expression des loci juxtaposés. Dans les cellules avec la t(8;17), *MSI2* est juxtaposé au locus *SOX17* et une expression aberrante de *SOX17*, normalement non exprimé dans les cellules hématopoïétiques adultes normales, est notée. *SOX17* est un membre de la famille SOX (SRY-related high mobility group box) qui sont des facteurs de transcription avec un domaine commun, le domaine HMG. Cette famille a un rôle dans plusieurs fonctions y compris l'identité des cellules souches de différents tissus (Schepers et al., 2002). *Sox17*, un membre du sous-groupe F qui comprend aussi *Sox7* et *Sox18*, est impliqué dans l'angiogenèse et la cardiogenèse et semble jouer un rôle redondant dans ces processus (Sakamoto et al., 2007). Toutefois, l'expression de *Sox17* et *Sox18* semble être différente au niveau de la différenciation hématopoïétique dans un modèle murin (Serrano et al., 2010). À différents stades de différenciation hématopoïétique précoce, *Sox7* et *Sox18* sont exprimés au niveau de la vésicule vitelline extra-embryonnaire et dans les CSHs embryonnaires de façon transitoire, suivi par l'expression

de Sox17 (Serrano et al., 2010). Ce dernier est essentiel pour le maintien du pool des CSHs embryonnaires murines, tel que démontré par Kim et al. (Kim et al., 2007). Il a aussi été rapporté que Sox17 est impliqué au niveau de la reprogrammation des cellules épithéliales matures des poumons chez la souris. L'expression ectopique de Sox17 au niveau de ces cellules cause la formation de cellules épithéliales à phénotype plus matures (progéniteurs épithéliaux), active le cycle cellulaire et inhibe la voie TGFB via Smad3 (Lange et al., 2009).

Un seul membre de la famille SOX a été impliqué dans une translocation détectée dans un cas de lymphome non-hodkinien, soit la t(X;12)(p22;p12)/fusion *P2RY8/SOX5*, induisant une surexpression de *SOX5* (Storlazzi et al., 2007). Cependant le rôle de *SOX5* dans cette fusion n'est pas bien défini.

Le nouvel épissage de *SOX17* identifié dans notre travail respecte le cadre de lecture et conserve le domaine HMG. Deux transcrits principaux de *SOX17* ont été identifiés initialement (Kato, 2002). Le gène *Sox17* murin possède plusieurs formes d'épissage différentes de celles décrites pour le gène humain. Cette différence entre les gènes humain et murin pourrait générer des protéines différentes qui interagissent avec des cofacteurs différents malgré l'homologie de séquences au niveau de l'ADN. Plusieurs travaux ont illustré l'implication de *SOX17* dans les tumeurs solides, soit dans le carcinome hépatocellulaire (Quintas-Cardama et al., 2010), le cancer colorectal (Zhang et al., 2008b), ainsi que dans le cancer du sein (Fu et al., 2010). Toutefois, seulement deux études ont démontré le rôle de Sox17 dans l'hématopoïèse et son implication dans la leucémie (He et al., 2011; Kim et al., 2007).

Sox17 semble être crucial au niveau de l'hématopoïèse car la délétion de *Sox17* induit plusieurs anomalies au niveau des CSHs et des progéniteurs hématopoïétiques embryonnaires et de la moelle osseuse néonatale. Ces effets incluent une absence totale de CSH ainsi qu'une augmentation importante dans l'expression du gène *Dkk1*, un régulateur négatif de la voie de signalisation Wnt. Ces résultats suggèrent que Sox17 est important pour l'autorenouvellement et/ou la prolifération de la CSH embryonnaire. Cependant Sox17 n'est pas exprimé au niveau de l'hématopoïèse murine adulte, et son absence ne semble pas affecter l'hématopoïèse adulte normale (Kim et al., 2007).

Contrairement au rôle suspecté de Sox17 comme activateur de la voie de signalisation Wnt dans l'hématopoïèse néonatale chez la souris, dans certains cancers *SOX17* semble inhiber la voie de signalisation Wnt par des mécanismes épigénétiques comme l'hyperméthylation

(Zhang et al., 2008b). Il a aussi été démontré par des études fonctionnelles que Sox17 induit la dégradation des protéines TCF/LEF et Ctnnb1, effet qui peut être bloqué par des inhibiteurs du protéasome, contrairement à son homologue Sox4 qui stabilise la Ctnnb1. Cependant les deux domaines d'interaction de Sox17 avec TCF et Ctnnb1 doivent être présents pour que cela antagonise la voie de signalisation Wnt (Sinner et al., 2007). Le domaine d'interaction de Sox17 avec TCF est le domaine HMG, et le domaine d'interaction avec la Ctnnb1 est en position de l'acide aminé 368 de la protéine murine (Sinner et al., 2007). La séquence commune conservée du domaine d'interaction avec Ctnnb1 nécessaire pour sa dégradation est la séquence protéique EFEQYLH. Cette séquence n'est pas présente dans la protéine prédite traduite par le nouveau transcrit *SOX17* détectée dans les cellules leucémiques de notre cas avec la t(8;17). Ce nouvel épissage a donc une structure qui se rapproche de celle de *SOX4*. Rappelons que Sox4 active Ctnnb1 (Sinner et al., 2007).

Avec les progrès du séquençage humain, plusieurs nouvelles formes différentes d'ARNm d'un même gène, reliées à l'épissage alternatif, ont été décrites et peuvent donner des isoformes protéiques ayant des rôles différents. Un exemple intéressant a été décrit pour le gène *FOXPI* (Gabut et al., 2011). Des fonctions différentes pour un même gène ont aussi été démontrées pour *Sox17* au niveau des tissus endodermiques où il est un facteur important de différenciation des cellules endodermales, contrairement à *Sox2* qui est essentiel pour le maintien des cellules endodermales pluripotentes. En induisant des mutations dans l'hélice 3 de *Sox17*, il y a reprogrammation en un état pluripotent tel que décrit pour *Sox2* (Jauch et al., 2011). Donc un changement affectant la transcription d'un gène par épissage alternatif ou par mutation peut modifier sa fonction et entraîner des changements dans le programme de différenciation cellulaire. En plus de l'épissage alternatif, les rôles divergents de *SOX17* dans les tumeurs solides vs les cellules hématopoïétiques embryonnaires, pourraient être expliqués en partie par le type cellulaire dans lequel *SOX17* est exprimé. En effet, plusieurs facteurs de transcription ont des fonctions bidirectionnelles et sont capables d'activer ou de réprimer leurs gènes cibles. Cette plasticité transcriptionnelle reflète la capacité de ces facteurs à recruter des protéines qui peuvent être des coactivateurs ou des corépresseurs contrôlant ainsi l'expression des gènes cibles (Goodson et al., 2011; Lonard and O'Malley B, 2007). Récemment, Morrison et al. ont démontré que la surexpression de *Sox17* par infection rétrovirale dans les cellules hématopoïétiques de souris adulte, peut convertir les progéniteurs multipotents adultes en

cellules qui acquièrent des propriétés de CSHs au stade fœtal ayant un potentiel d'autorenouveau (He et al., 2011). Ces progéniteurs donnent une hématopoïèse dans la moelle osseuse adulte qui ressemble à l'hématopoïèse du foie fœtal. Par ailleurs, des mutations additionnelles semblent nécessaires pour l'induction de leucémie par Sox17 (Chhabra and Mikkola, 2011; He et al., 2011). Dans notre leucémie avec la translocation t(8;17), les mutations qui ciblent *MSI2* et *SOX17* pourraient coopérer avec BCR-ABL1 dans la progression de la LMC en phase blastique.

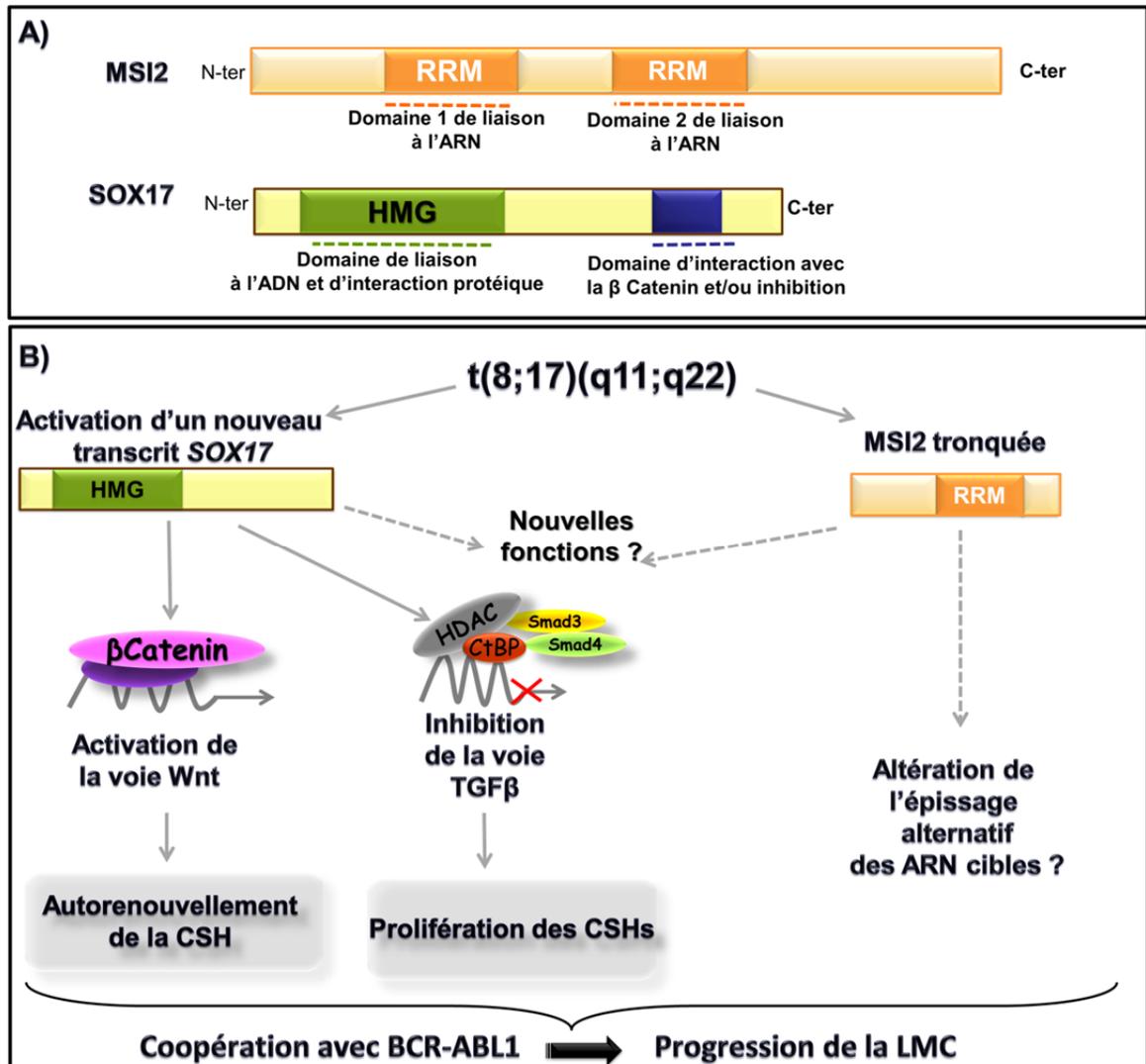


Figure 42. Modèle proposé du rôle oncogénique de la t(8;17) dans la progression de la leucémie myéloïde chronique.

A) Structure des protéines *MSI2* et *SOX17* et domaines présents. *MSI2* possède deux domaines de liaison à l'ARN, les domaines RRM (RNA recognition motif). *SOX17* possède un domaine de liaison à l'ADN, le domaine HMG (High mobility group) et un

domaine d'interaction avec la beta-catenine. **B)** Suite à la t(8;17), il y a la formation d'une forme tronquée de *MSI2* qui peut donner une protéine prédite avec un seul domaine RRM, qui pourrait affecter l'épissage alternatif des ARN cibles, avoir de nouvelles fonctions et/ou être impliquée dans l'immortalisation et/ou la prolifération des CSHs. L'activation de *SOX17* sous forme d'un nouveau transcrit, pourrait activer la voie de signalisation Wnt et augmenter l'autorenouvellement et la prolifération des cellules souches hématopoïétiques (CSHs). L'activation de *SOX17* pourrait aussi inhiber la voie de signalisation TGF β ce qui va entraîner une augmentation de la prolifération. Ces altérations pourraient coopérer avec la fusion BCR-ABL1 dans la progression de la leucémie myéloïde chronique (LMC).

5. Les mécanismes communs pouvant être altérés suite à ces quatre translocations détectées dans la progression de la leucémie myéloïde chronique

La LMC a servi comme modèle pour l'étude des leucémies avec différentes phases d'évolution dont la phase chronique qui dure plusieurs années et la phase blastique d'une durée de quelques mois seulement. L'anomalie génétique initiale de la LMC, la fusion *BCR-ABL1* générée suite à la t(9;22), fait partie des réarrangements impliquant des gènes codant pour des tyrosines kinases. Les deux caractéristiques principales de la LMC dans sa phase blastique sont l'arrêt de différenciation avec présence d'un excès de blastes, ainsi qu'une augmentation du potentiel d'autorenouvellement de la CSL. Il est intéressant de noter que toutes les translocations identifiées dans notre travail impliquent des facteurs de transcription ayant un rôle important dans l'hématopoïèse et/ou au niveau de la CSH. Les facteurs de transcription affectant la différenciation hématopoïétique qui sont altérés dans nos translocations sont *RUNX1*, *ETV6*, la forme courte de *PRDM16*, *MSI2* et les gènes *HOXA*. Les deux premiers sont essentiels pour l'établissement de l'hématopoïèse définitive (Ogawa and Yokomizo, 2000; Wang et al., 1998) et ils sont fréquemment réarrangés par des translocations chromosomiques dans les leucémies. Toutefois, les mécanismes moléculaires décrits dans les fusions *RUNX1* et *ETV6* sont très hétérogènes, d'où l'importance de caractériser chaque nouvelle fusion pour mieux comprendre son effet oncogénique potentiel. *PRDM16* affecte aussi la différenciation hématopoïétique et c'est l'activation de sa forme courte, *PRDM16s*, qui bloquerait la différenciation (Nishikata et al., 2011; Nishikata et al., 2003). L'activation des gènes *HOXA*, particulièrement *HOXA9*, cause un retard dans la différenciation hématopoïétique (Bach et al., 2010). Enfin la surexpression de *Msi2* induit chez la souris, un défaut au niveau de la différenciation hématopoïétique (Kharas et al., 2010).

L'altération des gènes impliqués dans les quatre translocations chromosomiques t(1;21), t(7;17), t(2;12) et t(8;17) pourrait aussi activer l'autorenouvellement des CSHs générant ainsi des CSLs résistantes aux traitements. En effet, les gènes *PRDM16*, *MSI2*, *SOX17* et les gènes *HOX* altérés dans ces translocations, sont impliqués via différentes voies dans l'autorenouvellement, l'immortalisation et/ou la prolifération de la CSH (Du et al., 2005; Eaves and Humphries, 2010; He et al., 2011; Sauvageau et al., 1995; Thorsteinsdottir et al., 2002; Thorsteinsdottir et al., 1997) (Figure 44). Ces différentes voies, notamment les voies

Wnt/ β catenin, Hedgehog, Notch et TGF β pourraient coopérer pour « reprogrammer » les cellules de LMC de la phase chronique à la phase blastique, ces cellules deviennent ainsi résistantes aux traitements. De plus, il est à noter que trois des quatre translocations coexistaient avec un deuxième Ph au niveau du caryotype, soit la t(7;17), t(8;17) et t(2;12), ce qui pourrait être lié à une augmentation de l'expression de la fusion *BCR-ABL1* et entraîner une instabilité génomique avec formation subséquente des translocations chromosomiques.

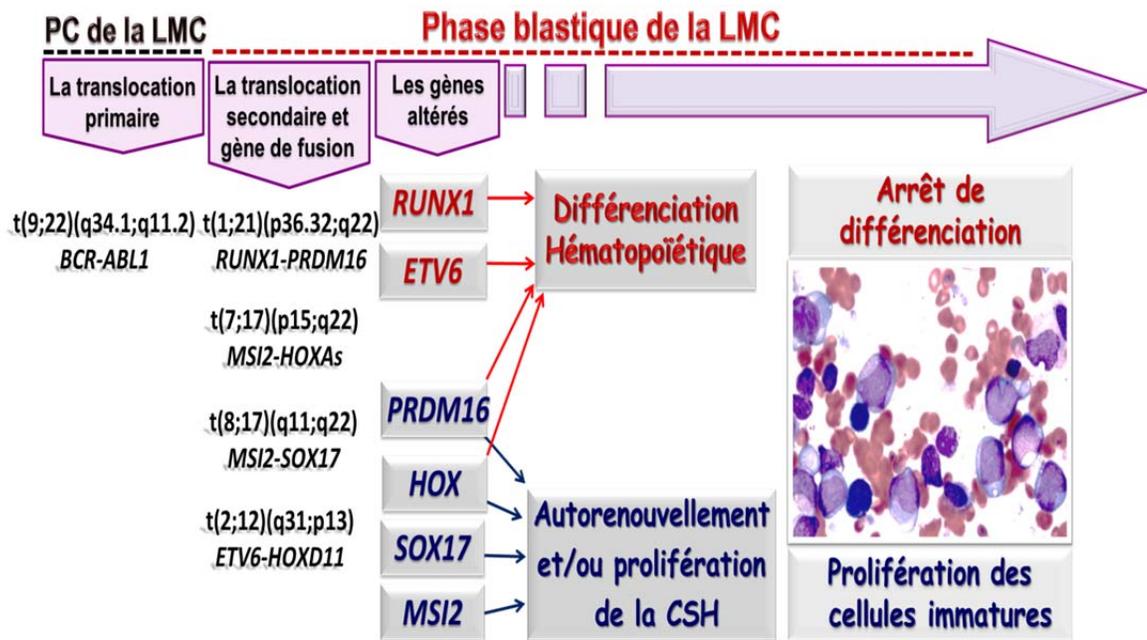


Figure 43. Modèle commun proposé pour les quatre translocations chromosomiques t(1;21), t(7;17), t(8;17) et t(2;12) dans la progression de la leucémie myéloïde chronique.

L'évènement primaire de la leucémie myéloïde chronique (LMC) dans sa phase chronique est la t(9;22)/*BCR-ABL1*. Suite à la progression de la LMC en phase blastique, il y a arrêt de différenciation avec excès de blastes et acquisition d'évènements secondaires. La translocation t(1;21)/*RUNX1-PRDM16* avec réarrangement des gènes *RUNX1* et *PRDM16* pourrait affecter la différenciation hématopoïétique et induire l'immortalisation des cellules souches leucémiques (CSLs) en activant l'autorenouveaulement de la cellule souche hématopoïétique (CSH). Suite à l'acquisition de la t(7;17)/*MSI2-HOXA*, la différenciation pourrait être altérée via *HOXA*, ainsi que la prolifération et l'autorenouveaulement (via la voie β catenin pour *HOXA* et les voies Hedgehog et Notch pour *MSI2*). L'acquisition de la t(8;17)/*MSI2-SOX17* pourrait affecter l'autorenouveaulement et augmenter la prolifération des CSLs via les voies TGF β et β catenin, en plus de l'effet de *MSI2* sur la différenciation et

l'autorenouveaulement. Enfin, la t(2;12)/*ETV6-HOXD* active *HOXD9* pouvant ainsi altérer la prolifération des CSLs. L'altération de *ETV6* pourrait aussi entraîner un arrêt de différenciation hématopoïétique.

Conclusion et perspectives

Dans notre projet nous avons caractérisé les points de cassure de quatre translocations chromosomiques additionnelles à la translocation t(9;22) dans la LMC en phase blastique. Ces réarrangements ont été identifiés par cytogénétique moléculaire chez des patients résistants au traitement. La caractérisation des points de cassure de ces translocations nous a permis d'identifier les gènes impliqués dans ces réarrangements. Les fonctions de ces gènes dans l'hématopoïèse normale et leur implication dans la leucémogénèse chez la souris ou l'humain, suggèrent qu'ils contribuent possiblement à la progression de la LMC et à la résistance aux traitements de ces patients. En effet nos résultats révèlent une altération des gènes *PRDM16*, *MSI2*, *HOXA/D* et *SOX17* qui ont en commun un rôle dans l'autorenouvellement et/ou la prolifération des CSHs chez l'humain et/ou dans un modèle murin, par des voies communes ou différentes. Le remaniement de ces gènes confère un avantage prolifératif aux progéniteurs leucémiques et/ou aux CSLs, cellules qui sont résistantes à la chimiothérapie. D'autre part, deux des translocations étudiées impliquent les gènes *RUNX1* et *ETV6*, deux facteurs de transcription importants pour la différenciation hématopoïétique. L'altération de ces gènes, de même que celle de *PRDM16* et des gènes *HOXA* pourrait avoir un rôle primordial dans l'arrêt de différenciation, une caractéristique importante de la transformation blastique de la LMC.

L'identification de différents types de transcrits de fusion, d'épissages alternatifs et/ou une expression aberrante des gènes réarrangés dans ces translocations chromosomiques nous a permis de distinguer trois conséquences possibles de ces translocations :

- 1) la formation de gènes de fusion avec des séquences qui correspondent à des domaines des deux gènes impliqués, générant une possible protéine chimérique avec un gain de fonction ayant un potentiel oncogénique. C'est le cas de la t(1;21)/*RUNX1-PRDM16*.
- 2) l'activation de l'expression des gènes impliqués dans les translocations, tel que décrit pour la translocation t(1;21) avec activation de *PRDM16*, les translocations t(7;17) et t(2;12) avec activation des gènes *HOXA/D* et la translocation t(8;17) avec activation de *SOX17*.
- 3) un épissage alternatif aberrant donnant de nouvelles formes tronquées tel que les formes tronquées de *RUNX1*, *ETV6* et *MSI2*.

Nos résultats appuient le modèle de la CSL dans la LMC qui propose que l'autorenouvellement est augmenté dans cette maladie. Ces CSLs peuvent ensuite accumuler des mutations additionnelles. Cette hétérogénéité tumorale rend difficile l'élaboration d'un modèle commun pour la progression en phase blastique de la LMC. D'où l'importance d'identifier les anomalies additionnelles pour mieux distinguer 1) les mutations qui maintiennent la progression de la leucémie tel que celles qui affectent les gènes impliqués dans l'autorenouvellement, 2) les mutations qui altèrent la différenciation hématopoïétique tel que celles qui affectent les facteurs de transcription, et 3) les mutations qui reflètent une instabilité génomique suite à l'altération des voies de réparation de l'ADN. Les voies altérées pourraient aussi coopérer ensemble ou avec d'autres voies tel que démontré chez la souris pour NUP98-HOXA9 ou MLL-AF9 avec FLT3-ITD (Palmqvist et al., 2006; Stubbs et al., 2008).

La caractérisation des quatre translocations t(1;21), t(7;17), t(2;12) et t(8;17) nous a permis de démontrer leur importance clinique dans la progression de la LMC. Notre travail permet de supporter les travaux récents qui ont identifié la t(1;21)/*RUNX1-PRDM16* comme nouveau facteur pronostique dans les leucémies et qui ont démontré l'importance de la forme courte de *PRDM16* dans l'immortalisation des progéniteurs hématopoïétiques myéloïdes chez la souris.

Notre travail appuie également le rôle de *SOX17* et de *MSI2* dans les leucémies et dans la progression de la LMC respectivement, rôle récemment démontré dans les cellules murines. Notre étude décrit pour la première fois l'implication de *SOX17* dans la leucémie humaine et identifie de nouveaux réarrangements impliquant différents gènes du locus *HOXA/D* fusionnés avec *MSI2* et *ETV6*.

Des études fonctionnelles évaluant le rôle de ces nouveaux transcrits dans la progression des leucémies myéloïdes aideraient à mieux comprendre leur effet oncogénique potentiel. En induisant l'expression de ces transcrits au niveau des CSHs/progéniteurs humains ou murins en présence et en absence de la fusion *BCR-ABL1* dans des essais de transplantation, il pourrait être possible de démontrer si ces nouveaux transcrits peuvent être oncogéniques seuls ou s'ils nécessitent une coopération avec la fusion initiale de la LMC pour altérer la différenciation hématopoïétique et/ou activer l'autorenouvellement de

la CSL. D'autre part, le séquençage du transcriptome complet des cellules leucémiques porteuses de ces nouvelles fusions pourrait permettre de découvrir les gènes cibles et/ou les voies dérégulés dans ces cellules et de révéler la présence de nouvelles mutations permettant ainsi une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de la LMC-PB.

Il serait intéressant d'étudier ces nouvelles fusions sur le plan transcriptionnel et d'identifier les gènes cibles impliqués. Des études d'immunoprécipitation chromatinienne et de co-immunoprécipitation protéique pourraient aussi contribuer à évaluer l'effet des nouvelles protéines issues des translocations chromosomiques caractérisées dans notre travail. Cela est particulièrement important pour la $t(1;21)/RUNX1-PRDM16$ qui est maintenant reconnue comme une anomalie génétique récurrente associée à un pronostic défavorable dans les leucémies. D'autre part, deux des translocations impliquant *MSI2*, un gène codant pour une protéine importante au niveau de l'épissage de plusieurs ARN, produisent des formes tronquées de *MSI2*. Il serait intéressant de vérifier si ces nouvelles formes protéiques affectent les ARN cibles de *MSI2*.

Dans notre étude nous avons établi un lien entre les réarrangements chromosomiques observés en LMC-PB chez des patients résistants à l'IM et la voie de l'autorenouvellement caractéristique des CSLs. Ces résultats appuient la nécessité de cibler spécifiquement la CSL pour le traitement de ces patients. De façon intéressante, cette approche a été proposée récemment par Heidel et al., qui ont réussi à éliminer les CSLs de LMC dans un modèle murin, par inactivation génétique et pharmacologique de *Ctnnb1*, un facteur important dans l'autorenouvellement (Heidel et al., 2012). Ceci constitue une stratégie potentiellement intéressante pour contrer la résistance au traitement qui est une caractéristique de cette leucémie agressive.

RÉFÉRENCES

1. Abrahamsson, A.E., Geron, I., Gotlib, J., Dao, K.H., Barroga, C.F., Newton, I.G., Giles, F.J., Durocher, J., Creusot, R.S., Karimi, M., *et al.* (2009). Glycogen synthase kinase 3beta missplicing contributes to leukemia stem cell generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 3925-3929.
2. Abram, C.L., and Courtneidge, S.A. (2000). Src family tyrosine kinases and growth factor signaling. *Exp Cell Res* *254*, 1-13.
3. Adesina, A.M., Lopez-Terrada, D., Wong, K.K., Gunaratne, P., Nguyen, Y., Pulliam, J., Margolin, J., and Finegold, M.J. (2009). Gene expression profiling reveals signatures characterizing histologic subtypes of hepatoblastoma and global deregulation in cell growth and survival pathways. *Hum Pathol* *40*, 843-853.
4. Aguilo, F., Avagyan, S., Labar, A., Sevilla, A., Lee, D.F., Kumar, P., Lemischka, I.R., Zhou, B.Y., and Snoeck, H.W. (2011). Prdm16 is a physiologic regulator of hematopoietic stem cells. *Blood* *117*, 5057-5066.
5. Alexandrova, E.M., and Moll, U.M. (2012). The role of p53 family members p73 and p63 in human hematological malignancies. *Leuk Lymphoma*.
6. Alvarado, Y., Kantarjian, H., O'Brien, S., Faderl, S., Borthakur, G., Burger, J., Wierda, W., Garcia-Manero, G., Shan, J., and Cortes, J. (2009). Significance of suboptimal response to imatinib, as defined by the European LeukemiaNet, in the long-term outcome of patients with early chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Cancer* *115*, 3709-3718.
7. Ammatuna, E., Divona, M., Curzi, P., Panetta, P., Zaza, S., Postorino, M., Cantonetti, M., Amadori, S., and Lo Coco, F. (2009). Simultaneous occurrence of BCR/ABL1 and RUNX1/RUNX1T1 in a case of therapy-related acute myeloid leukemia. *Cancer genetics and cytogenetics* *195*, 189-191.
8. Anastasi, J., Musvee, T., Roulston, D., Domer, P.H., Larson, R.A., and Vardiman, J.W. (1998). Pseudo-Gaucher histiocytes identified up to 1 year after transplantation for CML are BCR/ABL-positive. *Leukemia* *12*, 233-237.
9. Andreasson, P., Johansson, B., Carlsson, M., Jarlsfelt, I., Fioretos, T., Mitelman, F., and Hoglund, M. (1997). BCR/ABL-negative chronic myeloid leukemia with ETV6/ABL fusion. *Genes, chromosomes & cancer* *20*, 299-304.
10. Apperley, J.F. (2007). Part I: mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol* *8*, 1018-1029.
11. Argiropoulos, B., and Humphries, R.K. (2007). Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene* *26*, 6766-6776.
12. Armstrong, S.A., Staunton, J.E., Silverman, L.B., Pieters, R., den Boer, M.L., Minden, M.D., Sallan, S.E., Lander, E.S., Golub, T.R., and Korsmeyer, S.J. (2002). MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nature genetics* *30*, 41-47.
13. Ayton, P.M., and Cleary, M.L. (2003). Transformation of myeloid progenitors by MLL oncoproteins is dependent on Hoxa7 and Hoxa9. *Genes & development* *17*, 2298-2307.
14. Baccarani, M., Cortes, J., Pane, F., Niederwieser, D., Saglio, G., Apperley, J., Cervantes, F., Deininger, M., Gratwohl, A., Guilhot, F., *et al.* (2009a). Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *27*, 6041-6051.
15. Baccarani, M., Rosti, G., Castagnetti, F., Haznedaroglu, I., Porkka, K., Abruzzese, E., Alimena, G., Ehrencrona, H., Hjorth-Hansen, H., Kairisto, V., *et al.* (2009b). Comparison of imatinib 400 mg and 800 mg daily in the front-line treatment of high-risk, Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia: a European LeukemiaNet Study. *Blood* *113*, 4497-4504.
16. Baccarani, M., Saglio, G., Goldman, J., Hochhaus, A., Simonsson, B., Appelbaum, F., Apperley, J., Cervantes, F., Cortes, J., Deininger, M., *et al.* (2006). Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* *108*, 1809-1820.
17. Bach, C., Buhl, S., Mueller, D., Garcia-Cuellar, M.P., Maethner, E., and Slany, R.K. (2010). Leukemogenic transformation by HOXA cluster genes. *Blood* *115*, 2910-2918.
18. Baens, M., Peeters, P., Guo, C., Aerssens, J., and Marynen, P. (1996). Genomic organization of TEL: the human ETS-variant gene 6. *Genome Res* *6*, 404-413.
19. Barbouti, A., Hoglund, M., Johansson, B., Lassen, C., Nilsson, P.G., Hagemeijer, A., Mitelman, F., and Fioretos, T. (2003). A novel gene, MSI2, encoding a putative RNA-binding protein is

- recurrently rearranged at disease progression of chronic myeloid leukemia and forms a fusion gene with HOXA9 as a result of the cryptic t(7;17)(p15;q23). *Cancer research* 63, 1202-1206.
20. Barnes, D.J., Palaiologou, D., Panousopoulou, E., Schultheis, B., Yong, A.S., Wong, A., Pattacini, L., Goldman, J.M., and Melo, J.V. (2005). Bcr-Abl expression levels determine the rate of development of resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. *Cancer research* 65, 8912-8919.
 21. Beachy, P.A., Karhadkar, S.S., and Berman, D.M. (2004). Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* 432, 324-331.
 22. Becker, A.J., Mc, C.E., and Till, J.E. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197, 452-454.
 23. Beckman, K.B., and Ames, B.N. (1997). Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem* 272, 19633-19636.
 24. Behrend, L., Henderson, G., and Zwacka, R.M. (2003). Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem Soc Trans* 31, 1441-1444.
 25. Bekisz, J., Baron, S., Balinsky, C., Morrow, A., and Zoon, K.C. (2010). Antiproliferative Properties of Type I and Type II Interferon. *Pharmaceuticals* 3, 994-1015.
 26. Benjamin, D., Colombi, M., Moroni, C., and Hall, M.N. (2011). Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors. *Nature reviews Drug discovery* 10, 868-880.
 27. Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H., Sultan, C., and Cox, C. (1994). The chronic myeloid leukaemias: guidelines for distinguishing chronic granulocytic, atypical chronic myeloid, and chronic myelomonocytic leukaemia. Proposals by the French-American-British Cooperative Leukaemia Group. *Br J Haematol* 87, 746-754.
 28. Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R., and Sultan, C. (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 33, 451-458.
 29. Benveniste, P., Frelin, C., Janmohamed, S., Barbara, M., Herrington, R., Hyam, D., and Iscove, N.N. (2010). Intermediate-term hematopoietic stem cells with extended but time-limited reconstitution potential. *Cell stem cell* 6, 48-58.
 30. Bernstein, C., Bernstein, H., Payne, C.M., and Garewal, H. (2002). DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutat Res* 511, 145-178.
 31. Beverloo, H.B., Panagopoulos, I., Isaksson, M., van Wering, E., van Drunen, E., de Klein, A., Johansson, B., and Slater, R. (2001). Fusion of the homeobox gene HLXB9 and the ETV6 gene in infant acute myeloid leukemias with the t(7;12)(q36;p13). *Cancer Res* 61, 5374-5377.
 32. Bhatia, R., Holtz, M., Niu, N., Gray, R., Snyder, D.S., Sawyers, C.L., Arber, D.A., Slovak, M.L., and Forman, S.J. (2003). Persistence of malignant hematopoietic progenitors in chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission following imatinib mesylate treatment. *Blood* 101, 4701-4707.
 33. Bisso, A., Collavin, L., and Del Sal, G. (2011). p73 as a pharmaceutical target for cancer therapy. *Curr Pharm Des* 17, 578-590.
 34. Bixby, D., and Talpaz, M. (2011). Seeking the causes and solutions to imatinib-resistance in chronic myeloid leukemia. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* 25, 7-22.
 35. Bjork, B.C., Turbe-Doan, A., Prysak, M., Herron, B.J., and Beier, D.R. (2010). Prdm16 is required for normal palatogenesis in mice. *Hum Mol Genet* 19, 774-789.
 36. Bjornsson, J.M., Andersson, E., Lundstrom, P., Larsson, N., Xu, X., Repetowska, E., Humphries, R.K., and Karlsson, S. (2001). Proliferation of primitive myeloid progenitors can be reversibly induced by HOXA10. *Blood* 98, 3301-3308.
 37. Blair, A., Hogge, D.E., Ailles, L.E., Lansdorp, P.M., and Sutherland, H.J. (1997). Lack of expression of Thy-1 (CD90) on acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo. *Blood* 89, 3104-3112.
 38. Blick, M., Romero, P., Talpaz, M., Kurzrock, R., Shtalrid, M., Andersson, B., Trujillo, J., Beran, M., and Gutterman, J. (1987). Molecular characteristics of chronic myelogenous leukemia in blast crisis. *Cancer Genet Cytogenet* 27, 349-356.
 39. Bohlander, S.K. (2005). ETV6: a versatile player in leukemogenesis. *Semin Cancer Biol* 15, 162-174.
 40. Bonifazi, F., de Vivo, A., Rosti, G., Guilhot, F., Guilhot, J., Trabacchi, E., Hehlmann, R., Hochhaus, A., Shepherd, P.C., Steegmann, J.L., *et al.* (2001). Chronic myeloid leukemia and interferon-alpha: a study of complete cytogenetic responders. *Blood* 98, 3074-3081.

41. Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine* 3, 730-737.
42. Boominathan, L. (2007). Some facts and thoughts: p73 as a tumor suppressor gene in the network of tumor suppressors. *Mol Cancer* 6, 27.
43. Borrow, J., Shearman, A.M., Stanton, V.P., Jr., Becher, R., Collins, T., Williams, A.J., Dube, I., Katz, F., Kwong, Y.L., Morris, C., *et al.* (1996). The t(7;11)(p15;p15) translocation in acute myeloid leukaemia fuses the genes for nucleoporin NUP98 and class I homeoprotein HOXA9. *Nature genetics* 12, 159-167.
44. Bradley, T.R., and Metcalf, D. (1966). The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci* 44, 287-299.
45. Brandon, M., Baldi, P., and Wallace, D.C. (2006). Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene* 25, 4647-4662.
46. Branford, S. (2007). Chronic myeloid leukemia: molecular monitoring in clinical practice. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program*, 376-383.
47. Branford, S., Fletcher, L., Cross, N.C., Muller, M.C., Hochhaus, A., Kim, D.W., Radich, J.P., Saglio, G., Pane, F., Kamel-Reid, S., *et al.* (2008). Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. *Blood* 112, 3330-3338.
48. Branford, S., Rudzki, Z., Walsh, S., Parkinson, I., Grigg, A., Szer, J., Taylor, K., Herrmann, R., Seymour, J.F., Arthur, C., *et al.* (2003). Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood* 102, 276-283.
49. Burchert, A., Wang, Y., Cai, D., von Bubnoff, N., Paschka, P., Muller-Brusselbach, S., Ottmann, O.G., Duyster, J., Hochhaus, A., and Neubauer, A. (2005). Compensatory PI3-kinase/Akt/mTor activation regulates imatinib resistance development. *Leukemia* 19, 1774-1782.
50. Burgess, G.S., Williamson, E.A., Cripe, L.D., Litz-Jackson, S., Bhatt, J.A., Stanley, K., Stewart, M.J., Kraft, A.S., Nakshatri, H., and Boswell, H.S. (1998). Regulation of the c-jun gene in p210 BCR-ABL transformed cells corresponds with activity of JNK, the c-jun N-terminal kinase. *Blood* 92, 2450-2460.
51. Burgess, M.R., Skaggs, B.J., Shah, N.P., Lee, F.Y., and Sawyers, C.L. (2005). Comparative analysis of two clinically active BCR-ABL kinase inhibitors reveals the role of conformation-specific binding in resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3395-3400.
52. Burke, L.C., Bybee, A., and Thomas, N.S. (1992). The retinoblastoma protein is partially phosphorylated during early G1 in cycling cells but not in G1 cells arrested with alpha-interferon. *Oncogene* 7, 783-788.
53. Calabretta, B., and Perrotti, D. (2004). The biology of CML blast crisis. *Blood* 103, 4010-4022.
54. Campbell, L.J., Patsouris, C., Rayeroux, K.C., Somana, K., Januszewicz, E.H., and Szer, J. (2002). BCR/ABL amplification in chronic myelocytic leukemia blast crisis following imatinib mesylate administration. *Cancer Genet Cytogenet* 139, 30-33.
55. Canitrot, Y., Falinski, R., Louat, T., Laurent, G., Cazaux, C., Hoffmann, J.S., Lautier, D., and Skorski, T. (2003). p210 BCR/ABL kinase regulates nucleotide excision repair (NER) and resistance to UV radiation. *Blood* 102, 2632-2637.
56. Carayol, N., Vakana, E., Sassano, A., Kaur, S., Goussetis, D.J., Glaser, H., Druker, B.J., Donato, N.J., Altman, J.K., Barr, S., *et al.* (2010). Critical roles for mTORC2- and rapamycin-insensitive mTORC1-complexes in growth and survival of BCR-ABL-expressing leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 12469-12474.
57. Carlesso, N., Frank, D.A., and Griffin, J.D. (1996). Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by Bcr/Abl. *J Exp Med* 183, 811-820.
58. Carroll, M., Tomasson, M.H., Barker, G.F., Golub, T.R., and Gilliland, D.G. (1996). The TEL/platelet-derived growth factor beta receptor (PDGF beta R) fusion in chronic myelomonocytic leukemia is a transforming protein that self-associates and activates PDGF beta R kinase-dependent signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14845-14850.
59. Casas, S., Nagy, B., Elonen, E., Aventin, A., Larramendy, M.L., Sierra, J., Ruutu, T., and Knuutila, S. (2003). Aberrant expression of HOXA9, DEK, CBL and CSF1R in acute myeloid leukemia. *Leukemia & lymphoma* 44, 1935-1941.

60. Cauwelier, B., Cave, H., Gervais, C., Lessard, M., Barin, C., Perot, C., Van den Akker, J., Mugneret, F., Charrin, C., Pages, M.P., *et al.* (2007). Clinical, cytogenetic and molecular characteristics of 14 T-ALL patients carrying the TCRbeta-HOXA rearrangement: a study of the Groupe Francophone de Cytogenetique Hematologique. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* *21*, 121-128.
61. Chakraborty, S., Stark, J.M., Sun, C.L., Modi, H., Chen, W., O'Connor, T.R., Forman, S.J., Bhatia, S., and Bhatia, R. (2012). Chronic myelogenous leukemia stem and progenitor cells demonstrate chromosomal instability related to repeated breakage-fusion-bridge cycles mediated by increased nonhomologous end joining. *Blood* *119*, 6187-6197.
62. Chang, J.S., Santhanam, R., Trotta, R., Neviani, P., Eiring, A.M., Briercheck, E., Ronchetti, M., Roy, D.C., Calabretta, B., Caligiuri, M.A., *et al.* (2007). High levels of the BCR/ABL oncoprotein are required for the MAPK-hnRNP-E2 dependent suppression of C/EBPalpha-driven myeloid differentiation. *Blood* *110*, 994-1003.
63. Chase, A., Reiter, A., Burci, L., Cazzaniga, G., Biondi, A., Pickard, J., Roberts, I.A., Goldman, J.M., and Cross, N.C. (1999). Fusion of ETV6 to the caudal-related homeobox gene CDX2 in acute myeloid leukemia with the t(12;13)(p13;q12). *Blood* *93*, 1025-1031.
64. Che, X.F., Nakajima, Y., Sumizawa, T., Ikeda, R., Ren, X.Q., Zheng, C.L., Mukai, M., Furukawa, T., Haraguchi, M., Gao, H., *et al.* (2002). Reversal of P-glycoprotein mediated multidrug resistance by a newly synthesized 1,4-benzothiazepine derivative, JTV-519. *Cancer Lett* *187*, 111-119.
65. Chhabra, A., and Mikkola, H.K. (2011). Return to youth with Sox17. *Genes & development* *25*, 1557-1562.
66. Chu, S., Xu, H., Shah, N.P., Snyder, D.S., Forman, S.J., Sawyers, C.L., and Bhatia, R. (2005). Detection of BCR-ABL kinase mutations in CD34+ cells from chronic myelogenous leukemia patients in complete cytogenetic remission on imatinib mesylate treatment. *Blood* *105*, 2093-2098.
67. Ciau-Uitz, A., Pinheiro, P., Gupta, R., Enver, T., and Patient, R. (2010). Tel1/ETV6 specifies blood stem cells through the agency of VEGF signaling. *Dev Cell* *18*, 569-578.
68. Clery, A., Blatter, M., and Allain, F.H. (2008). RNA recognition motifs: boring? Not quite. *Curr Opin Struct Biol* *18*, 290-298.
69. Collins, S., Coleman, H., and Groudine, M. (1987). Expression of bcr and bcr-abl fusion transcripts in normal and leukemic cells. *Mol Cell Biol* *7*, 2870-2876.
70. Coluccia, A.M., Vacca, A., Dunach, M., Mologni, L., Redaelli, S., Bustos, V.H., Benati, D., Pinna, L.A., and Gambacorti-Passerini, C. (2007). Bcr-Abl stabilizes beta-catenin in chronic myeloid leukemia through its tyrosine phosphorylation. *The EMBO journal* *26*, 1456-1466.
71. Corbin, A.S., Agarwal, A., Loriaux, M., Cortes, J., Deininger, M.W., and Druker, B.J. (2011). Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *The Journal of clinical investigation* *121*, 396-409.
72. Corbin, A.S., La Rosee, P., Stoffregen, E.P., Druker, B.J., and Deininger, M.W. (2003). Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with imatinib mesylate resistance remain sensitive to imatinib. *Blood* *101*, 4611-4614.
73. Cortes, J.E., Talpaz, M., O'Brien, S., Faderl, S., Garcia-Manero, G., Ferrajoli, A., Verstovsek, S., Rios, M.B., Shan, J., and Kantarjian, H.M. (2006). Staging of chronic myeloid leukemia in the imatinib era: an evaluation of the World Health Organization proposal. *Cancer* *106*, 1306-1315.
74. Cortez, D., Stoica, G., Pierce, J.H., and Pendergast, A.M. (1996). The BCR-ABL tyrosine kinase inhibits apoptosis by activating a Ras-dependent signaling pathway. *Oncogene* *13*, 2589-2594.
75. Cotta, C.V., and Bueso-Ramos, C.E. (2007). New insights into the pathobiology and treatment of chronic myelogenous leukemia. *Ann Diagn Pathol* *11*, 68-78.
76. Cowan-Jacob, S.W., Fendrich, G., Floersheimer, A., Furet, P., Liebetanz, J., Rummel, G., Rheinberger, P., Centeleghe, M., Fabbro, D., and Manley, P.W. (2007). Structural biology contributions to the discovery of drugs to treat chronic myelogenous leukaemia. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* *63*, 80-93.
77. Cozzio, A., Passegue, E., Ayton, P.M., Karsunky, H., Cleary, M.L., and Weissman, I.L. (2003). Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes Dev* *17*, 3029-3035.
78. Cramer, K., Nieborowska-Skorska, M., Koptyra, M., Slupianek, A., Penserga, E.T., Eaves, C.J., Aulitzky, W., and Skorski, T. (2008). BCR/ABL and other kinases from chronic myeloproliferative disorders stimulate single-strand annealing, an unfaithful DNA double-strand break repair. *Cancer Res* *68*, 6884-6888.

79. Cuenco, G.M., Nucifora, G., and Ren, R. (2000). Human AML1/MDS1/EV11 fusion protein induces an acute myelogenous leukemia (AML) in mice: a model for human AML. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 1760-1765.
80. Cuenco, G.M., and Ren, R. (2001). Cooperation of BCR-ABL and AML1/MDS1/EV11 in blocking myeloid differentiation and rapid induction of an acute myelogenous leukemia. *Oncogene* *20*, 8236-8248.
81. Daley, G.Q., Van Etten, R.A., and Baltimore, D. (1990). Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* *247*, 824-830.
82. Damashek, W. (1951). Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* *6*, 372-375.
83. Dash, A.B., Williams, I.R., Kutok, J.L., Tomasson, M.H., Anastasiadou, E., Lindahl, K., Li, S., Van Etten, R.A., Borrow, J., Housman, D., *et al.* (2002). A murine model of CML blast crisis induced by cooperation between BCR/ABL and NUP98/HOXA9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 7622-7627.
84. Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* *91*, 231-241.
85. Davies, A., Jordanides, N.E., Giannoudis, A., Lucas, C.M., Hatzieremia, S., Harris, R.J., Jorgensen, H.G., Holyoake, T.L., Pirmohamed, M., Clark, R.E., *et al.* (2009). Nilotinib concentration in cell lines and primary CD34(+) chronic myeloid leukemia cells is not mediated by active uptake or efflux by major drug transporters. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* *23*, 1999-2006.
86. De Braekeleer, E., Douet-Guilbert, N., Morel, F., Le Bris, M.J., Basinko, A., and De Braekeleer, M. (2012). ETV6 fusion genes in hematological malignancies: A review. *Leukemia research* *36*, 945-961.
87. De Braekeleer, E., Douet-Guilbert, N., Morel, F., Le Bris, M.J., Ferec, C., and De Braekeleer, M. (2011a). RUNX1 translocations and fusion genes in malignant hemopathies. *Future oncology* *7*, 77-91.
88. De Braekeleer, E., Douet-Guilbert, N., Rowe, D., Bown, N., Morel, F., Berthou, C., Ferec, C., and De Braekeleer, M. (2011b). ABL1 fusion genes in hematological malignancies: a review. *Eur J Haematol* *86*, 361-371.
89. de Groot, R.P., Raaijmakers, J.A., Lammers, J.W., and Koenderman, L. (2000). STAT5-Dependent CyclinD1 and Bcl-xL expression in Bcr-Abl-transformed cells. *Mol Cell Biol Res Commun* *3*, 299-305.
90. De Weer, A., Speleman, F., Cauwelier, B., Van Roy, N., Yigit, N., Verhasselt, B., De Moerloose, B., Benoit, Y., Noens, L., Selleslag, D., *et al.* (2008). EV11 overexpression in t(3;17) positive myeloid malignancies results from juxtaposition of EV11 to the MSI2 locus at 17q22. *Haematologica* *93*, 1903-1907.
91. Denhardt, D.T. (1996). Signal-transducing protein phosphorylation cascades mediated by Ras/Rho proteins in the mammalian cell: the potential for multiplex signalling. *Biochem J* *318 (Pt 3)*, 729-747.
92. Derderian, P.M., Kantarjian, H.M., Talpaz, M., O'Brien, S., Cork, A., Estey, E., Pierce, S., and Keating, M. (1993). Chronic myelogenous leukemia in the lymphoid blastic phase: characteristics, treatment response, and prognosis. *Am J Med* *94*, 69-74.
93. Deutsch, E., Dugray, A., AbdulKarim, B., Marangoni, E., Maggiorella, L., Vaganay, S., M'Kacher, R., Rasy, S.D., Eschwege, F., Vainchenker, W., *et al.* (2001). BCR-ABL down-regulates the DNA repair protein DNA-PKcs. *Blood* *97*, 2084-2090.
94. Deutsch, E., Jarrousse, S., Buet, D., Dugray, A., Bonnet, M.L., Vozenin-Brotons, M.C., Guilhot, F., Turhan, A.G., Feunteun, J., and Bourhis, J. (2003). Down-regulation of BRCA1 in BCR-ABL-expressing hematopoietic cells. *Blood* *101*, 4583-4588.
95. Di Bacco, A., Keeshan, K., McKenna, S.L., and Cotter, T.G. (2000). Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: deregulation of cell growth and apoptosis. *The oncologist* *5*, 405-415.
96. Diakos, C., Krapf, G., Gerner, C., Inthal, A., Lemberger, C., Ban, J., Dohnal, A.M., and Panzer-Grumayer, E.R. (2007). RNAi-mediated silencing of TEL/AML1 reveals a heat-shock protein- and survivin-dependent mechanism for survival. *Blood* *109*, 2607-2610.
97. Dierks, C., Beigi, R., Guo, G.R., Zirlik, K., Stegert, M.R., Manley, P., Trussell, C., Schmitt-Graeff, A., Landwerlin, K., Veelken, H., *et al.* (2008). Expansion of Bcr-Abl-positive leukemic stem cells is dependent on Hedgehog pathway activation. *Cancer Cell* *14*, 238-249.

98. Dierov, J., Sanchez, P.V., Burke, B.A., Padilla-Nash, H., Putt, M.E., Ried, T., and Carroll, M. (2009). BCR/ABL induces chromosomal instability after genotoxic stress and alters the cell death threshold. *Leukemia* 23, 279-286.
99. Domen, J., and Weissman, I.L. (1999). Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate. *Mol Med Today* 5, 201-208.
100. Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J., Montgomery, C.A., Jr., Butel, J.S., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215-221.
101. Druker, B.J., Guilhot, F., O'Brien, S.G., Gathmann, I., Kantarjian, H., Gattermann, N., Deininger, M.W., Silver, R.T., Goldman, J.M., Stone, R.M., *et al.* (2006). Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* 355, 2408-2417.
102. Druker, B.J., Talpaz, M., Resta, D.J., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J.M., Lydon, N.B., Kantarjian, H., Capdeville, R., Ohno-Jones, S., *et al.* (2001). Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* 344, 1031-1037.
103. Du, Y., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (2005). Insertional mutagenesis identifies genes that promote the immortalization of primary bone marrow progenitor cells. *Blood* 106, 3932-3939.
104. Duhoux, F.P., Ameye, G., Montano-Almendras, C.P., Bahloula, K., Mozziconacci, M.J., Laibe, S., Wlodarska, I., Michaux, L., Talmant, P., Richebourg, S., *et al.* (2012). PRDM16 (1p36) translocations define a distinct entity of myeloid malignancies with poor prognosis but may also occur in lymphoid malignancies. *Br J Haematol* 156, 76-88.
105. Dulucq, S., Bouchet, S., Turcq, B., Lippert, E., Etienne, G., Reiffers, J., Molimard, M., Krajcinovic, M., and Mahon, F.X. (2008). Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms are associated with major molecular responses to standard-dose imatinib in chronic myeloid leukemia. *Blood* 112, 2024-2027.
106. Duncan, A.W., Rattis, F.M., DiMascio, L.N., Congdon, K.L., Pazianos, G., Zhao, C., Yoon, K., Cook, J.M., Willert, K., Gaiano, N., *et al.* (2005). Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol* 6, 314-322.
107. Eaves, C.J., and Humphries, R.K. (2010). Acute myeloid leukemia and the Wnt pathway. *N Engl J Med* 362, 2326-2327.
108. Einat, M., Resnitzky, D., and Kimchi, A. (1985). Close link between reduction of c-myc expression by interferon and, G0/G1 arrest. *Nature* 313, 597-600.
109. Eiring, A.M., Harb, J.G., Neviani, P., Garton, C., Oaks, J.J., Spizzo, R., Liu, S., Schwind, S., Santhanam, R., Hickey, C.J., *et al.* (2010). miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell* 140, 652-665.
110. Elefanty, A.G., Hariharan, I.K., and Cory, S. (1990). bcr-abl, the hallmark of chronic myeloid leukaemia in man, induces multiple haemopoietic neoplasms in mice. *Embo J* 9, 1069-1078.
111. Elmaagacli, A.H., Beelen, D.W., Opalka, B., Seeber, S., and Schaefer, U.W. (2000). The amount of BCR-ABL fusion transcripts detected by the real-time quantitative polymerase chain reaction method in patients with Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia correlates with the disease stage. *Annals of hematology* 79, 424-431.
112. Emerenciano, M., Meyer, C., Macedo-Silva, M.L., de Meis, E., Dobbin, J.A., Marschalek, R., and Pombo-de-Oliveira, M.S. (2011). Backtracking to birth of the NUP98-HOXD13 gene fusion in an infant acute myeloid leukemia. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* 25, 1192-1194.
113. Ernst, T., Gruber, F.X., Pelz-Ackermann, O., Maier, J., Pfirrmann, M., Muller, M.C., Mikkola, I., Porkka, K., Niederwieser, D., Hochhaus, A., *et al.* (2009). A co-operative evaluation of different methods of detecting BCR-ABL kinase domain mutations in patients with chronic myeloid leukemia on second-line dasatinib or nilotinib therapy after failure of imatinib. *Haematologica* 94, 1227-1235.
114. Fabarius, A., Giehl, M., Rebacz, B., Kramer, A., Frank, O., Haferlach, C., Duesberg, P., Hehlmann, R., Seifarth, W., and Hochhaus, A. (2008). Centrosome aberrations and G1 phase arrest after in vitro and in vivo treatment with the SRC/ABL inhibitor dasatinib. *Haematologica* 93, 1145-1154.
115. Fabarius, A., Leitner, A., Hochhaus, A., Muller, M.C., Hanfstein, B., Haferlach, C., Gohring, G., Schlegelberger, B., Jotterand, M., Reiter, A., *et al.* (2011). Impact of additional cytogenetic aberrations at diagnosis on prognosis of CML: long-term observation of 1151 patients from the randomized CML Study IV. *Blood* 118, 6760-6768.

116. Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., O'Brien, S., Kurzrock, R., and Kantarjian, H.M. (1999). The biology of chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* *341*, 164-172.
117. Fang, Z.H., Dong, C.L., Chen, Z., Zhou, B., Liu, N., Lan, H.F., Liang, L., Liao, W.B., Zhang, L., and Han, Z.C. (2009). Transcriptional regulation of survivin by c-Myc in BCR/ABL-transformed cells: implications in anti-leukaemic strategy. *J Cell Mol Med* *13*, 2039-2052.
118. Fernandez de Mattos, S., Essafi, A., Soeiro, I., Pietersen, A.M., Birkenkamp, K.U., Edwards, C.S., Martino, A., Nelson, B.H., Francis, J.M., Jones, M.C., *et al.* (2004). FoxO3a and BCR-ABL regulate cyclin D2 transcription through a STAT5/BCL6-dependent mechanism. *Mol Cell Biol* *24*, 10058-10071.
119. Ferrando, A.A., Armstrong, S.A., Neuberg, D.S., Sallan, S.E., Silverman, L.B., Korsmeyer, S.J., and Look, A.T. (2003). Gene expression signatures in MLL-rearranged T-lineage and B-precursor acute leukemias: dominance of HOX dysregulation. *Blood* *102*, 262-268.
120. Ferrari-Amorotti, G., Keeshan, K., Zattoni, M., Guerzoni, C., Iotti, G., Cattelani, S., Donato, N.J., and Calabretta, B. (2006). Leukemogenesis induced by wild-type and STI571-resistant BCR/ABL is potently suppressed by C/EBPalpha. *Blood* *108*, 1353-1362.
121. Fioretos, T., Strombeck, B., Sandberg, T., Johansson, B., Billstrom, R., Borg, A., Nilsson, P.G., Van Den Berghe, H., Hagemeijer, A., Mitelman, F., *et al.* (1999). Isochromosome 17q in blast crisis of chronic myeloid leukemia and in other hematologic malignancies is the result of clustered breakpoints in 17p11 and is not associated with coding TP53 mutations. *Blood* *94*, 225-232.
122. Fischer, M., Schwieger, M., Horn, S., Niebuhr, B., Ford, A., Roscher, S., Bergholz, U., Greaves, M., Lohler, J., and Stocking, C. (2005). Defining the oncogenic function of the TEL/AML1 (ETV6/RUNX1) fusion protein in a mouse model. *Oncogene* *24*, 7579-7591.
123. Fontoura, B.M., Blobel, G., and Yaseen, N.R. (2000). The nucleoporin Nup98 is a site for GDP/GTP exchange on ran and termination of karyopherin beta 2-mediated nuclear import. *The Journal of biological chemistry* *275*, 31289-31296.
124. Frank, R., Zhang, J., Uchida, H., Meyers, S., Hiebert, S.W., and Nimer, S.D. (1995). The AML1/ETO fusion protein blocks transactivation of the GM-CSF promoter by AML1B. *Oncogene* *11*, 2667-2674.
125. Fu, D.Y., Wang, Z.M., Li, C., Wang, B.L., Shen, Z.Z., Huang, W., and Shao, Z.M. (2010). Sox17, the canonical Wnt antagonist, is epigenetically inactivated by promoter methylation in human breast cancer. *Breast cancer research and treatment* *119*, 601-612.
126. Fujii, M., Hayashi, K., Niki, M., Chiba, N., Meguro, K., Endo, K., Kameoka, J., Ito, S., Abe, K., Watanabe, T., *et al.* (1998). Overexpression of AML1 renders a T hybridoma resistant to T cell receptor-mediated apoptosis. *Oncogene* *17*, 1813-1820.
127. Fujino, T., Suzuki, A., Ito, Y., Ohyashiki, K., Hatano, Y., Miura, I., and Nakamura, T. (2002). Single-translocation and double-chimeric transcripts: detection of NUP98-HOXA9 in myeloid leukemias with HOXA11 or HOXA13 breaks of the chromosomal translocation t(7;11)(p15;p15). *Blood* *99*, 1428-1433.
128. Furstoss, O., Dorey, K., Simon, V., Barila, D., Superti-Furga, G., and Roche, S. (2002). c-Abl is an effector of Src for growth factor-induced c-myc expression and DNA synthesis. *EMBO J* *21*, 514-524.
129. Gabut, M., Samavarchi-Tehrani, P., Wang, X., Slobodeniuc, V., O'Hanlon, D., Sung, H.K., Alvarez, M., Talukder, S., Pan, Q., Mazzoni, E.O., *et al.* (2011). An alternative splicing switch regulates embryonic stem cell pluripotency and reprogramming. *Cell* *147*, 132-146.
130. Gaiger, A., Henn, T., Horth, E., Geissler, K., Mitterbauer, G., Maier-Dobersberger, T., Greinix, H., Mannhalter, C., Haas, O.A., Lechner, K., *et al.* (1995). Increase of bcr-abl chimeric mRNA expression in tumor cells of patients with chronic myeloid leukemia precedes disease progression. *Blood* *86*, 2371-2378.
131. Gao, J., Erickson, P., Gardiner, K., Le Beau, M.M., Diaz, M.O., Patterson, D., Rowley, J.D., and Drabkin, H.A. (1991). Isolation of a yeast artificial chromosome spanning the 8;21 translocation breakpoint t(8;21)(q22;q22.3) in acute myelogenous leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *88*, 4882-4886.
132. Garcia-Castro, M.I., Marcelle, C., and Bronner-Fraser, M. (2002). Ectodermal Wnt function as a neural crest inducer. *Science* *297*, 848-851.
133. Garcia-Manero, G., Faderl, S., O'Brien, S., Cortes, J., Talpaz, M., and Kantarjian, H.M. (2003). Chronic myelogenous leukemia: a review and update of therapeutic strategies. *Cancer* *98*, 437-457.
134. Gaunt, S.J. (1991). Expression patterns of mouse Hox genes: clues to an understanding of developmental and evolutionary strategies. *Bioessays* *13*, 505-513.

135. Gaymes, T.J., Mufti, G.J., and Rassool, F.V. (2002). Myeloid leukemias have increased activity of the nonhomologous end-joining pathway and concomitant DNA misrepair that is dependent on the Ku70/86 heterodimer. *Cancer Res* 62, 2791-2797.
136. Gesbert, F., and Griffin, J.D. (2000). Bcr/Abl activates transcription of the Bcl-X gene through STAT5. *Blood* 96, 2269-2276.
137. Giampaolo, A., Sterpetti, P., Bulgarini, D., Samoggia, P., Pelosi, E., Valtieri, M., and Peschle, C. (1994). Key functional role and lineage-specific expression of selected HOXB genes in purified hematopoietic progenitor differentiation. *Blood* 84, 3637-3647.
138. Giguere, A., and Hebert, J. (2011). Microhomologies and topoisomerase II consensus sequences identified near the breakpoint junctions of the recurrent t(7;21)(p22;q22) translocation in acute myeloid leukemia. *Genes, chromosomes & cancer* 50, 228-238.
139. Goga, A., McLaughlin, J., Afar, D.E., Saffran, D.C., and Witte, O.N. (1995). Alternative signals to RAS for hematopoietic transformation by the BCR-ABL oncogene. *Cell* 82, 981-988.
140. Goldman, J.M., and Melo, J.V. (2003). Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *The New England journal of medicine* 349, 1451-1464.
141. Golub, T.R., Barker, G.F., Bohlander, S.K., Hiebert, S.W., Ward, D.C., Bray-Ward, P., Morgan, E., Raimondi, S.C., Rowley, J.D., and Gilliland, D.G. (1995). Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 4917-4921.
142. Golub, T.R., Goga, A., Barker, G.F., Afar, D.E., McLaughlin, J., Bohlander, S.K., Rowley, J.D., Witte, O.N., and Gilliland, D.G. (1996). Oligomerization of the ABL tyrosine kinase by the Ets protein TEL in human leukemia. *Mol Cell Biol* 16, 4107-4116.
143. Golub, T.R., Slonim, D.K., Tamayo, P., Huard, C., Gaasenbeek, M., Mesirov, J.P., Coller, H., Loh, M.L., Downing, J.R., Caligiuri, M.A., *et al.* (1999). Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286, 531-537.
144. Goodson, M.L., Mengeling, B.J., Jonas, B.A., and Privalsky, M.L. (2011). Alternative mRNA splicing of corepressors generates variants that play opposing roles in adipocyte differentiation. *J Biol Chem*.
145. Gorre, M.E., Mohammed, M., Ellwood, K., Hsu, N., Paquette, R., Rao, P.N., and Sawyers, C.L. (2001). Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 293, 876-880.
146. Gorre, M.E., and Sawyers, C.L. (2002). Molecular mechanisms of resistance to STI571 in chronic myeloid leukemia. *Current opinion in hematology* 9, 303-307.
147. Graham, S.M., Jorgensen, H.G., Allan, E., Pearson, C., Alcorn, M.J., Richmond, L., and Holyoake, T.L. (2002). Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* 99, 319-325.
148. Gratwohl, A., Brand, R., Apperley, J., Crawley, C., Ruutu, T., Corradini, P., Carreras, E., Devergie, A., Guglielmi, C., Kolb, H.J., *et al.* (2006). Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia in Europe 2006: transplant activity, long-term data and current results. An analysis by the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Haematologica* 91, 513-521.
149. Greulich, K.O. (1992). Chromosome microtechnology: microdissection and microcloning. *Trends in biotechnology* 10, 48-51.
150. Grigoryan, T., Wend, P., Klaus, A., and Birchmeier, W. (2008). Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice. *Genes Dev* 22, 2308-2341.
151. Grimshaw, S.J., Mott, H.R., Stott, K.M., Nielsen, P.R., Evetts, K.A., Hopkins, L.J., Nietlispach, D., and Owen, D. (2004). Structure of the sterile alpha motif (SAM) domain of the *Saccharomyces cerevisiae* mitogen-activated protein kinase pathway-modulating protein STE50 and analysis of its interaction with the STE11 SAM. *J Biol Chem* 279, 2192-2201.
152. Grimwade, D., Hills, R.K., Moorman, A.V., Walker, H., Chatters, S., Goldstone, A.H., Wheatley, K., Harrison, C.J., and Burnett, A.K. (2010). Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* 116, 354-365.
153. Grossmann, V., Kohlmann, A., Zenger, M., Schindela, S., Eder, C., Weissmann, S., Schnittger, S., Kern, W., Muller, M.C., Hochhaus, A., *et al.* (2011). A deep-sequencing study of chronic myeloid

- leukemia patients in blast crisis (BC-CML) detects mutations in 76.9% of cases. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* 25, 557-560.
154. Guan, X.Y., Meltzer, P.S., Cao, J., and Trent, J.M. (1992). Rapid generation of region-specific genomic clones by chromosome microdissection: isolation of DNA from a region frequently deleted in malignant melanoma. *Genomics* 14, 680-684.
 155. Guidez, F., Petrie, K., Ford, A.M., Lu, H., Bennett, C.A., MacGregor, A., Hannemann, J., Ito, Y., Ghysdael, J., Greaves, M., *et al.* (2000). Recruitment of the nuclear receptor corepressor N-CoR by the TEL moiety of the childhood leukemia-associated TEL-AML1 oncoprotein. *Blood* 96, 2557-2561.
 156. Gunji, H., Waga, K., Nakamura, F., Maki, K., Sasaki, K., Nakamura, Y., and Mitani, K. (2004). TEL/AML1 shows dominant-negative effects over TEL as well as AML1. *Biochemical and biophysical research communications* 322, 623-630.
 157. Hannemann, J.R., McManus, D.M., Kabarowski, J.H., and Wiedemann, L.M. (1998). Haemopoietic transformation by the TEL/ABL oncogene. *Br J Haematol* 102, 475-485.
 158. Hantschel, O., and Superti-Furga, G. (2004). Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 33-44.
 159. Hantschel, O., Warsch, W., Eckelhart, E., Kaupe, I., Grebien, F., Wagner, K.U., Superti-Furga, G., and Sexl, V. (2012). BCR-ABL uncouples canonical JAK2-STAT5 signaling in chronic myeloid leukemia. *Nature chemical biology* 8, 285-293.
 160. Harada, H., Harada, Y., Niimi, H., Kyo, T., Kimura, A., and Inaba, T. (2004). High incidence of somatic mutations in the AML1/RUNX1 gene in myelodysplastic syndrome and low blast percentage myeloid leukemia with myelodysplasia. *Blood* 103, 2316-2324.
 161. Hariharan, I.K., and Adams, J.M. (1987). cDNA sequence for human bcr, the gene that translocates to the abl oncogene in chronic myeloid leukaemia. *EMBO J* 6, 115-119.
 162. Harrison, D.E., and Lerner, C.P. (1991). Most primitive hematopoietic stem cells are stimulated to cycle rapidly after treatment with 5-fluorouracil. *Blood* 78, 1237-1240.
 163. Hatano, Y., Miura, I., Nakamura, T., Yamazaki, Y., Takahashi, N., and Miura, A.B. (1999). Molecular heterogeneity of the NUP98/HOXA9 fusion transcript in myelodysplastic syndromes associated with t(7;11)(p15;p15). *Br J Haematol* 107, 600-604.
 164. Hazourli, S., Chagnon, P., Sauvageau, M., Fetni, R., Busque, L., and Hebert, J. (2006). Overexpression of PRDM16 in the presence and absence of the RUNX1/PRDM16 fusion gene in myeloid leukemias. *Genes, chromosomes & cancer* 45, 1072-1076.
 165. He, M., Chen, P., Aronovitz, S., Li, Y., Huang, H., Neilly, M.B., Wei, M., Rowley, J.D., Chen, J., and Li, Z. (2012). Two isoforms of HOXA9 function differently but work synergistically in human MLL-rearranged leukemia. *Blood Cells Mol Dis*.
 166. He, S., Kim, I., Lim, M.S., and Morrison, S.J. (2011). Sox17 expression confers self-renewal potential and fetal stem cell characteristics upon adult hematopoietic progenitors. *Genes Dev* 25, 1613-1627.
 167. Hegedus, T., Orfi, L., Seprodi, A., Varadi, A., Sarkadi, B., and Keri, G. (2002). Interaction of tyrosine kinase inhibitors with the human multidrug transporter proteins, MDR1 and MRP1. *Biochim Biophys Acta* 1587, 318-325.
 168. Heidel, F.H., Bullinger, L., Feng, Z., Wang, Z., Neff, T.A., Stein, L., Kalaitzidis, D., Lane, S.W., and Armstrong, S.A. (2012). Genetic and pharmacologic inhibition of beta-catenin targets imatinib-resistant leukemia stem cells in CML. *Cell stem cell* 10, 412-424.
 169. Heisterkamp, N., Stam, K., Groffen, J., de Klein, A., and Grosveld, G. (1985). Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph¹ translocation. *Nature* 315, 758-761.
 170. Helbling, D., Mueller, B.U., Timchenko, N.A., Hagemeijer, A., Jotterand, M., Meyer-Monard, S., Lister, A., Rowley, J.D., Huegli, B., Fey, M.F., *et al.* (2004). The leukemic fusion gene AML1-MDS1-EV11 suppresses CEBPA in acute myeloid leukemia by activation of Calreticulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 13312-13317.
 171. Hess, P., Pihan, G., Sawyers, C.L., Flavell, R.A., and Davis, R.J. (2002). Survival signaling mediated by c-Jun NH(2)-terminal kinase in transformed B lymphoblasts. *Nat Genet* 32, 201-205.
 172. Hibbard, M.K., Kozakewich, H.P., Dal Cin, P., Scot, R., Tan, X., Xiao, S., and Fletcher, J.A. (2000). PLAG1 fusion oncogenes in lipoblastoma. *Cancer research* 60, 4869-4872.
 173. Hidaka, E., Tanaka, M., Matsuda, K., Ishikawa-Matsumura, M., Yamauchi, K., Sano, K., Honda, T., Wakui, K., Yanagisawa, R., Nakazawa, Y., *et al.* (2007). A complex karyotype, including a three-

- way translocation generating a NUP98-HOXD13 transcript, in an infant with acute myeloid leukemia. *Cancer genetics and cytogenetics* *176*, 137-143.
174. Hiebert, S.W., Sun, W., Davis, J.N., Golub, T., Shurtleff, S., Buijs, A., Downing, J.R., Grosveld, G., Roussel, M.F., Gilliland, D.G., *et al.* (1996). The t(12;21) translocation converts AML-1B from an activator to a repressor of transcription. *Molecular and cellular biology* *16*, 1349-1355.
 175. Hiwase, D.K., White, D., Zrim, S., Saunders, V., Melo, J.V., and Hughes, T.P. (2010). Nilotinib-mediated inhibition of ABCB1 increases intracellular concentration of dasatinib in CML cells: implications for combination TKI therapy. *Leukemia* *24*, 658-660.
 176. Hochhaus, A. (2003). Cytogenetic and molecular mechanisms of resistance to imatinib. *Semin Hematol* *40*, 69-79.
 177. Hochhaus, A., and La Rosee, P. (2004). Imatinib therapy in chronic myelogenous leukemia: strategies to avoid and overcome resistance. *Leukemia* *18*, 1321-1331.
 178. Hock, H., Meade, E., Medeiros, S., Schindler, J.W., Valk, P.J., Fujiwara, Y., and Orkin, S.H. (2004). Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival. *Genes Dev* *18*, 2336-2341.
 179. Hodgson, G.S., Bradley, T.R., and Radley, J.M. (1982). The organization of hemopoietic tissue as inferred from the effects of 5-fluorouracil. *Exp Hematol* *10*, 26-35.
 180. Hoelbl, A., Kovacic, B., Kerényi, M.A., Simma, O., Warsch, W., Cui, Y., Beug, H., Hennighausen, L., Moriggl, R., and Sexl, V. (2006). Clarifying the role of Stat5 in lymphoid development and Abelson-induced transformation. *Blood* *107*, 4898-4906.
 181. Hoelbl, A., Schuster, C., Kovacic, B., Zhu, B., Wickre, M., Hoelzl, M.A., Fajmann, S., Grebien, F., Warsch, W., Stengl, G., *et al.* (2010). Stat5 is indispensable for the maintenance of bcr/abl-positive leukaemia. *EMBO Mol Med* *2*, 98-110.
 182. Holyoake, T., Jiang, X., Eaves, C., and Eaves, A. (1999). Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia. *Blood* *94*, 2056-2064.
 183. Hong, D., Gupta, R., Ancliff, P., Atzberger, A., Brown, J., Soneji, S., Green, J., Colman, S., Piacibello, W., Buckle, V., *et al.* (2008). Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia. *Science* *319*, 336-339.
 184. Hope, K.J., Cellot, S., Ting, S.B., MacRae, T., Mayotte, N., Iscove, N.N., and Sauvageau, G. (2010). An RNAi screen identifies Msi2 and Prox1 as having opposite roles in the regulation of hematopoietic stem cell activity. *Cell stem cell* *7*, 101-113.
 185. Hope, K.J., and Sauvageau, G. (2011). Roles for MSI2 and PROX1 in hematopoietic stem cell activity. *Current opinion in hematology* *18*, 203-207.
 186. Horita, M., Andreu, E.J., Benito, A., Arbona, C., Sanz, C., Benet, I., Prosper, F., and Fernandez-Luna, J.L. (2000). Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. *J Exp Med* *191*, 977-984.
 187. Horn, H.F., and Vousden, K.H. (2007). Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene* *26*, 1306-1316.
 188. Hromas, R., Shopnick, R., Jumean, H.G., Bowers, C., Varella-Garcia, M., and Richkind, K. (2000). A novel syndrome of radiation-associated acute myeloid leukemia involving AML1 gene translocations. *Blood* *95*, 4011-4013.
 189. Hsu, T.C. (1952). Mammalian chromosomes in vitro -The karyotype of man. *J Hered* *43*, 167-172.
 190. Hughes, T., and Branford, S. (2006). Molecular monitoring of BCR-ABL as a guide to clinical management in chronic myeloid leukaemia. *Blood Rev* *20*, 29-41.
 191. Hughes, T., Deininger, M., Hochhaus, A., Branford, S., Radich, J., Kaeda, J., Baccarani, M., Cortes, J., Cross, N.C., Druker, B.J., *et al.* (2006). Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* *108*, 28-37.
 192. Hughes, T., Saglio, G., Branford, S., Soverini, S., Kim, D.W., Muller, M.C., Martinelli, G., Cortes, J., Beppu, L., Gottardi, E., *et al.* (2009). Impact of baseline BCR-ABL mutations on response to nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* *27*, 4204-4210.
 193. Hughes, T.P., Hochhaus, A., Branford, S., Muller, M.C., Kaeda, J.S., Foroni, L., Druker, B.J., Guilhot, F., Larson, R.A., O'Brien, S.G., *et al.* (2010). Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS). *Blood* *116*, 3758-3765.

194. Huntly, B.J., Shigematsu, H., Deguchi, K., Lee, B.H., Mizuno, S., Duclos, N., Rowan, R., Amaral, S., Curley, D., Williams, I.R., *et al.* (2004). MOZ-TIF2, but not BCR-ABL, confers properties of leukemic stem cells to committed murine hematopoietic progenitors. *Cancer cell* 6, 587-596.
195. Huret, J.L. (1998). +8 or trisomy 8. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*.
196. Huret, J.L. (2006). t(2;12)(q31;p13). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*.
197. Ilaria, R.L., Jr., and Van Etten, R.A. (1996). P210 and P190(BCR/ABL) induce the tyrosine phosphorylation and DNA binding activity of multiple specific STAT family members. *J Biol Chem* 271, 31704-31710.
198. Ingham, P.W., and Placzek, M. (2006). Orchestrating ontogenesis: variations on a theme by sonic hedgehog. *Nat Rev Genet* 7, 841-850.
199. Irani, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Sollott, S.J., Der, C.J., Fearon, E.R., Sundaresan, M., Finkel, T., and Goldschmidt-Clermont, P.J. (1997). Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* 275, 1649-1652.
200. Irvine, D.A., and Copland, M. (2012). Targeting hedgehog in hematologic malignancy. *Blood* 119, 2196-2204.
201. Irvine, D.A., Heaney, N.B., and Holyoake, T.L. (2010). Optimising chronic myeloid leukaemia therapy in the face of resistance to tyrosine kinase inhibitors--a synthesis of clinical and laboratory data. *Blood reviews* 24, 1-9.
202. Ishikawa, S., and Ito, K. (2009). Plasticity and regulatory mechanisms of Hox gene expression in mouse neural crest cells. *Cell Tissue Res* 337, 381-391.
203. Ishikawa, T., Krzysko, K.A., Kowalska-Loth, B., Skrajna, A.M., Czuby, A., Girstun, A., Cieplak, M.K., Lesyng, B., and Staron, K. (2012). Activities of Topoisomerase I in Its Complex with SRSF1. *Biochemistry*.
204. Ito, T., Kwon, H.Y., Zimdahl, B., Congdon, K.L., Blum, J., Lento, W.E., Zhao, C., Lagoo, A., Gerrard, G., Foroni, L., *et al.* (2010). Regulation of myeloid leukaemia by the cell-fate determinant Musashi. *Nature* 466, 765-768.
205. Jain, S.K., Susa, M., Keeler, M.L., Carlesso, N., Druker, B., and Varticovski, L. (1996). PI 3-kinase activation in BCR/abl-transformed hematopoietic cells does not require interaction of p85 SH2 domains with p210 BCR/abl. *Blood* 88, 1542-1550.
206. Jalali, G.R., An, Q., Komm, Z.J., Worley, H., Wright, S.L., Harrison, C.J., Strefford, J.C., and Martineau, M. (2008). Disruption of ETV6 in intron 2 results in upregulatory and insertional events in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia* 22, 114-123.
207. Jamieson, C.H., Ailles, L.E., Dylla, S.J., Muijtjens, M., Jones, C., Zehnder, J.L., Gotlib, J., Li, K., Manz, M.G., Keating, A., *et al.* (2004). Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med* 351, 657-667.
208. Janssen, H., Wlodarska, I., Mecucci, C., Hagemeijer, A., Vandenberghe, P., Marynen, P., and Cools, J. (2006). Fusion of ETV6 to GOT1 in a case with myelodysplastic syndrome and t(10;12)(q24;p13). *Haematologica* 91, 949-951.
209. Jauch, R., Aksoy, I., Hutchins, A.P., Ng, C.K., Tian, X.F., Chen, J., Palasingam, P., Robson, P., Stanton, L.W., and Kolatkar, P.R. (2011). Conversion of Sox17 into a pluripotency reprogramming factor by reengineering its association with Oct4 on DNA. *Stem cells* 29, 940-951.
210. Jennings, B.A., and Mills, K.I. (1998). c-myc locus amplification and the acquisition of trisomy 8 in the evolution of chronic myeloid leukaemia. *Leuk Res* 22, 899-903.
211. Jiang, G.L., and Huang, S. (2000). The yin-yang of PR-domain family genes in tumorigenesis. *Histol Histopathol* 15, 109-117.
212. Jiang, Q., Xu, L.P., Liu, D.H., Liu, K.Y., Chen, S.S., Jiang, B., Jiang, H., Chen, H., Chen, Y.H., Han, W., *et al.* (2011). Imatinib mesylate versus allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for patients with chronic myelogenous leukemia in the accelerated phase. *Blood* 117, 3032-3040.
213. Jiang, X., Zhao, Y., Smith, C., Gasparetto, M., Turhan, A., Eaves, A., and Eaves, C. (2007). Chronic myeloid leukemia stem cells possess multiple unique features of resistance to BCR-ABL targeted therapies. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* 21, 926-935.
214. Jin, L., Tabe, Y., Konoplev, S., Xu, Y., Leysath, C.E., Lu, H., Kimura, S., Ohsaka, A., Rios, M.B., Calvert, L., *et al.* (2008). CXCR4 up-regulation by imatinib induces chronic myelogenous leukemia (CML) cell migration to bone marrow stroma and promotes survival of quiescent CML cells. *Mol Cancer Ther* 7, 48-58.

215. Jonak, G.J., and Knight, E., Jr. (1984). Selective reduction of c-myc mRNA in Daudi cells by human beta interferon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *81*, 1747-1750.
216. Jousset, C., Carron, C., Boureux, A., Quang, C.T., Oury, C., Dusanter-Fourt, I., Charon, M., Levin, J., Bernard, O., and Ghysdael, J. (1997). A domain of TEL conserved in a subset of ETS proteins defines a specific oligomerization interface essential to the mitogenic properties of the TEL-PDGFR beta oncoprotein. *Embo J* *16*, 69-82.
217. Kajimura, S., Seale, P., Kubota, K., Lunsford, E., Frangioni, J.V., Gygi, S.P., and Spiegelman, B.M. (2009). Initiation of myoblast to brown fat switch by a PRDM16-C/EBP-beta transcriptional complex. *Nature* *460*, 1154-1158.
218. Kajimura, S., Seale, P., Tomaru, T., Erdjument-Bromage, H., Cooper, M.P., Ruas, J.L., Chin, S., Tempst, P., Lazar, M.A., and Spiegelman, B.M. (2008). Regulation of the brown and white fat gene programs through a PRDM16/CtBP transcriptional complex. *Genes & development* *22*, 1397-1409.
219. Kaneko, Y., Sakakibara, S., Imai, T., Suzuki, A., Nakamura, Y., Sawamoto, K., Ogawa, Y., Toyama, Y., Miyata, T., and Okano, H. (2000). Musashi1: an evolutionally conserved marker for CNS progenitor cells including neural stem cells. *Dev Neurosci* *22*, 139-153.
220. Kantarjian, H., Shah, N.P., Hochhaus, A., Cortes, J., Shah, S., Ayala, M., Moiraghi, B., Shen, Z., Mayer, J., Pasquini, R., *et al.* (2010). Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* *362*, 2260-2270.
221. Kantarjian, H., Talpaz, M., O'Brien, S., Giles, F., Faderl, S., Verstovsek, S., Garcia-Manero, G., Shan, J., Rios, M.B., Champlin, R., *et al.* (2005). Survival benefit with imatinib mesylate therapy in patients with accelerated-phase chronic myelogenous leukemia--comparison with historic experience. *Cancer* *103*, 2099-2108.
222. Kantarjian, H.M., Giles, F.J., Bhalla, K.N., Pinilla-Ibarz, J., Larson, R.A., Gattermann, N., Ottmann, O.G., Hochhaus, A., Radich, J.P., Saglio, G., *et al.* (2011). Nilotinib is effective in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase after imatinib resistance or intolerance: 24-month follow-up results. *Blood* *117*, 1141-1145.
223. Kantarjian, H.M., Keating, M.J., Talpaz, M., Walters, R.S., Smith, T.L., Cork, A., McCredie, K.B., and Freireich, E.J. (1987). Chronic myelogenous leukemia in blast crisis. Analysis of 242 patients. *Am J Med* *83*, 445-454.
224. Kantarjian, H.M., Larson, R.A., Guilhot, F., O'Brien, S.G., Mone, M., Rudoltz, M., Krahnke, T., Cortes, J., Druker, B.J., International Randomized Study of, I., *et al.* (2009). Efficacy of imatinib dose escalation in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Cancer* *115*, 551-560.
225. Kantarjian, H.M., Shah, N.P., Cortes, J.E., Baccarani, M., Agarwal, M.B., Undurraga, M.S., Wang, J., Ipina, J.J., Kim, D.W., Ogura, M., *et al.* (2012). Dasatinib or imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: 2-year follow-up from a randomized phase 3 trial (DASISION). *Blood* *119*, 1123-1129.
226. Kantarjian, H.M., Smith, T.L., McCredie, K.B., Keating, M.J., Walters, R.S., Talpaz, M., Hester, J.P., Bligham, G., Gehan, E., and Freireich, E.J. (1985). Chronic myelogenous leukemia: a multivariate analysis of the associations of patient characteristics and therapy with survival. *Blood* *66*, 1326-1335.
227. Kantarjian, H.M., Talpaz, M., O'Brien, S., Giles, F., Garcia-Manero, G., Faderl, S., Thomas, D., Shan, J., Rios, M.B., and Cortes, J. (2003). Dose escalation of imatinib mesylate can overcome resistance to standard-dose therapy in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* *101*, 473-475.
228. Katoh, M. (2002). Expression of human SOX7 in normal tissues and tumors. *Int J Mol Med* *9*, 363-368.
229. Kawanishi, S., and Hiraku, Y. (2006). Oxidative and nitrative DNA damage as biomarker for carcinogenesis with special reference to inflammation. *Antioxid Redox Signal* *8*, 1047-1058.
230. Kharas, M.G., Lengner, C.J., Al-Shahrour, F., Bullinger, L., Ball, B., Zaidi, S., Morgan, K., Tam, W., Paktinat, M., Okabe, R., *et al.* (2010). Musashi-2 regulates normal hematopoiesis and promotes aggressive myeloid leukemia. *Nat Med* *16*, 903-908.
231. Kim, I., Saunders, T.L., and Morrison, S.J. (2007). Sox17 dependence distinguishes the transcriptional regulation of fetal from adult hematopoietic stem cells. *Cell* *130*, 470-483.
232. Kim, J.H., Chu, S.C., Gramlich, J.L., Pride, Y.B., Babendreier, E., Chauhan, D., Salgia, R., Podar, K., Griffin, J.D., and Sattler, M. (2005). Activation of the PI3K/mTOR pathway by BCR-ABL contributes to increased production of reactive oxygen species. *Blood* *105*, 1717-1723.

233. Kim, M.H., Chang, H.H., Shin, C., Cho, M., Park, D., and Park, H.W. (1998). Genomic structure and sequence analysis of human HOXA-9. *DNA and cell biology* 17, 407-414.
234. Kok, C.H., Brown, A.L., Ekert, P.G., and D'Andrea, R.J. (2010). Gene expression analysis reveals HOX gene upregulation in trisomy 8 AML. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* 24, 1239-1243.
235. Konopleva, M., and Andreeff, M. (2007). Targeting the leukemia microenvironment. *Curr Drug Targets* 8, 685-701.
236. Koptyra, M., Falinski, R., Nowicki, M.O., Stoklosa, T., Majsterek, I., Nieborowska-Skorska, M., Blasiak, J., and Skorski, T. (2006). BCR/ABL kinase induces self-mutagenesis via reactive oxygen species to encode imatinib resistance. *Blood* 108, 319-327.
237. Kotaki, M., Motoji, T., Takanashi, M., Wang, Y.H., and Mizoguchi, H. (2003). Anti-proliferative effect of the abl tyrosine kinase inhibitor STI571 on the P-glycoprotein positive K562/ADM cell line. *Cancer Lett* 199, 61-68.
238. Kotecha, N., Flores, N.J., Irish, J.M., Simonds, E.F., Sakai, D.S., Archambeault, S., Diaz-Flores, E., Coram, M., Shannon, K.M., Nolan, G.P., *et al.* (2008). Single-cell profiling identifies aberrant STAT5 activation in myeloid malignancies with specific clinical and biologic correlates. *Cancer Cell* 14, 335-343.
239. Krivtsov, A.V., Twomey, D., Feng, Z., Stubbs, M.C., Wang, Y., Faber, J., Levine, J.E., Wang, J., Hahn, W.C., Gilliland, D.G., *et al.* (2006). Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature* 442, 818-822.
240. Krumlauf, R. (1994). Hox genes in vertebrate development. *Cell* 78, 191-201.
241. Kubbies, M., Schindler, D., Hoehn, H., Schinzel, A., and Rabinovitch, P.S. (1985). Endogenous blockage and delay of the chromosome cycle despite normal recruitment and growth phase explain poor proliferation and frequent edomitosis in Fanconi anemia cells. *Am J Hum Genet* 37, 1022-1030.
242. Kumar, R., and Atlas, I. (1992). Interferon alpha induces the expression of retinoblastoma gene product in human Burkitt lymphoma Daudi cells: role in growth regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 6599-6603.
243. Kurokawa, M., Mitani, K., Imai, Y., Ogawa, S., Yazaki, Y., and Hirai, H. (1998a). The t(3;21) fusion product, AML1/Evi-1, interacts with Smad3 and blocks transforming growth factor-beta-mediated growth inhibition of myeloid cells. *Blood* 92, 4003-4012.
244. Kurokawa, M., Mitani, K., Irie, K., Matsuyama, T., Takahashi, T., Chiba, S., Yazaki, Y., Matsumoto, K., and Hirai, H. (1998b). The oncoprotein Evi-1 represses TGF-beta signalling by inhibiting Smad3. *Nature* 394, 92-96.
245. Lahortiga, I., Agirre, X., Belloni, E., Vazquez, I., Larrayoz, M.J., Gasparini, P., Lo Coco, F., Pelicci, P.G., Calasanz, M.J., and Odero, M.D. (2004). Molecular characterization of a t(1;3)(p36;q21) in a patient with MDS. MEL1 is widely expressed in normal tissues, including bone marrow, and it is not overexpressed in the t(1;3) cells. *Oncogene* 23, 311-316.
246. Lai, Z.C., and Li, Y. (1999). Tramtrack69 is positively and autonomously required for Drosophila photoreceptor development. *Genetics* 152, 299-305.
247. Laneuville, P., Sun, G., Timm, M., and Vekemans, M. (1992). Clonal evolution in a myeloid cell line transformed to interleukin-3 independent growth by retroviral transduction and expression of p210bcr/abl. *Blood* 80, 1788-1797.
248. Lange, A.W., Keiser, A.R., Wells, J.M., Zorn, A.M., and Whitsett, J.A. (2009). Sox17 promotes cell cycle progression and inhibits TGF-beta/Smad3 signaling to initiate progenitor cell behavior in the respiratory epithelium. *PloS one* 4, e5711.
249. Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., and Dick, J.E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645-648.
250. Laurent, E., Mitchell, D.L., Estrov, Z., Lowery, M., Tucker, S.L., Talpaz, M., and Kurzrock, R. (2003). Impact of p210(Bcr-Abl) on ultraviolet C wavelength-induced DNA damage and repair. *Clin Cancer Res* 9, 3722-3730.
251. Lawrence, H.J., Christensen, J., Fong, S., Hu, Y.L., Weissman, I., Sauvageau, G., Humphries, R.K., and Largman, C. (2005). Loss of expression of the Hoxa-9 homeobox gene impairs the proliferation and repopulating ability of hematopoietic stem cells. *Blood* 106, 3988-3994.
252. Lawrence, H.J., Helgason, C.D., Sauvageau, G., Fong, S., Izon, D.J., Humphries, R.K., and Largman, C. (1997). Mice bearing a targeted interruption of the homeobox gene HOXA9 have defects in myeloid, erythroid, and lymphoid hematopoiesis. *Blood* 89, 1922-1930.

253. Lawrence, H.J., Sauvageau, G., Humphries, R.K., and Largman, C. (1996). The role of HOX homeobox genes in normal and leukemic hematopoiesis. *Stem cells* *14*, 281-291.
254. le Coutre, P., Tassi, E., Varella-Garcia, M., Barni, R., Mologni, L., Cabrita, G., Marchesi, E., Supino, R., and Gambacorti-Passerini, C. (2000). Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. *Blood* *95*, 1758-1766.
255. Lerner, C., and Harrison, D.E. (1990). 5-Fluorouracil spares hemopoietic stem cells responsible for long-term repopulation. *Exp Hematol* *18*, 114-118.
256. Levy, E.R., Parganas, E., Morishita, K., Fichelson, S., James, L., Oscier, D., Gisselbrecht, S., Ihle, J.N., and Buckle, V.J. (1994). DNA rearrangements proximal to the EVI1 locus associated with the 3q21q26 syndrome. *Blood* *83*, 1348-1354.
257. Libermann, T.A., Pan, Z., Akbarali, Y., Hetherington, C.J., Boltax, J., Yergeau, D.A., and Zhang, D.E. (1999). AML1 (CBFalpha2) cooperates with B cell-specific activating protein (BSAP/PAX5) in activation of the B cell-specific BLK gene promoter. *The Journal of biological chemistry* *274*, 24671-24676.
258. Lichtman, M.A. (2008). Is there an entity of chemically induced BCR-ABL-positive chronic myelogenous leukemia? *Oncologist* *13*, 645-654.
259. Lippert, E., Etienne, G., Mozziconacci, M.J., Laibe, S., Gervais, C., Girault, S., Gachard, N., Tigaud, I., Dastugue, N., Huguet, F., *et al.* (2010). Loss of the Y chromosome in Philadelphia-positive cells predicts a poor response of chronic myeloid leukemia patients to imatinib mesylate therapy. *Haematologica* *95*, 1604-1607.
260. Liu, X., Zhang, Q., Zhang, D.E., Zhou, C., Xing, H., Tian, Z., Rao, Q., Wang, M., and Wang, J. (2009). Overexpression of an isoform of AML1 in acute leukemia and its potential role in leukemogenesis. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* *23*, 739-745.
261. Lonard, D.M., and O'Malley B, W. (2007). Nuclear receptor coregulators: judges, juries, and executioners of cellular regulation. *Mol Cell* *27*, 691-700.
262. Lowenberg, B. (2003). Minimal residual disease in chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* *349*, 1399-1401.
263. Lowenberg, B. (2008). Diagnosis and prognosis in acute myeloid leukemia--the art of distinction. *N Engl J Med* *358*, 1960-1962.
264. Lugo, T.G., Pendergast, A.M., Muller, A.J., and Witte, O.N. (1990). Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* *247*, 1079-1082.
265. Ma, G., Lu, D., Wu, Y., Liu, J., and Arlinghaus, R.B. (1997). Bcr phosphorylated on tyrosine 177 binds Grb2. *Oncogene* *14*, 2367-2372.
266. Mahon, F.X., Belloc, F., Lagarde, V., Chollet, C., Moreau-Gaudry, F., Reiffers, J., Goldman, J.M., and Melo, J.V. (2003). MDR1 gene overexpression confers resistance to imatinib mesylate in leukemia cell line models. *Blood* *101*, 2368-2373.
267. Mahon, F.X., Deininger, M.W., Schultheis, B., Chabrol, J., Reiffers, J., Goldman, J.M., and Melo, J.V. (2000). Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood* *96*, 1070-1079.
268. Mahon, F.X., Hayette, S., Lagarde, V., Belloc, F., Turcq, B., Nicolini, F., Belanger, C., Manley, P.W., Leroy, C., Etienne, G., *et al.* (2008). Evidence that resistance to nilotinib may be due to BCR-ABL, Pgp, or Src kinase overexpression. *Cancer Res* *68*, 9809-9816.
269. Malhotra, S., and Kincade, P.W. (2009). Wnt-related molecules and signaling pathway equilibrium in hematopoiesis. *Cell Stem Cell* *4*, 27-36.
270. Manley, P.W., Cowan-Jacob, S.W., and Mestan, J. (2005). Advances in the structural biology, design and clinical development of Bcr-Abl kinase inhibitors for the treatment of chronic myeloid leukaemia. *Biochim Biophys Acta* *1754*, 3-13.
271. Martin, P.J., Clift, R.A., Fisher, L.D., Buckner, C.D., Hansen, J.A., Appelbaum, F.R., Doney, K.C., Sullivan, K.M., Witherspoon, R.P., Storb, R., *et al.* (1988). HLA-identical marrow transplantation during accelerated-phase chronic myelogenous leukemia: analysis of survival and remission duration. *Blood* *72*, 1978-1984.
272. Maru, Y., Kobayashi, T., Tanaka, K., and Shibuya, M. (1999). BCR binds to the xeroderma pigmentosum group B protein. *Biochem Biophys Res Commun* *260*, 309-312.
273. Mashal, R., Shtalrid, M., Talpaz, M., Kantarjian, H., Smith, L., Beran, M., Cork, A., Trujillo, J., Gutterman, J., and Deisseroth, A. (1990). Rearrangement and expression of p53 in the chronic phase and blast crisis of chronic myelogenous leukemia. *Blood* *75*, 180-189.

274. Matsuno, N., Osato, M., Yamashita, N., Yanagida, M., Nanri, T., Fukushima, T., Motoji, T., Kusumoto, S., Towatari, M., Suzuki, R., *et al.* (2003). Dual mutations in the AML1 and FLT3 genes are associated with leukemogenesis in acute myeloblastic leukemia of the M0 subtype. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* *17*, 2492-2499.
275. Matsuoka, M., Tani, K., and Asano, S. (1998). Interferon-alpha-induced G1 phase arrest through up-regulated expression of CDK inhibitors, p19Ink4D and p21Cip1 in mouse macrophages. *Oncogene* *16*, 2075-2086.
276. Mayotte, N., Roy, D.C., Yao, J., Kroon, E., and Sauvageau, G. (2002). Oncogenic interaction between BCR-ABL and NUP98-HOXA9 demonstrated by the use of an in vitro purging culture system. *Blood* *100*, 4177-4184.
277. McLean, T.W., Ringold, S., Neuberg, D., Stegmaier, K., Tantravahi, R., Ritz, J., Koeffler, H.P., Takeuchi, S., Janssen, J.W., Seriu, T., *et al.* (1996). TEL/AML-1 dimerizes and is associated with a favorable outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* *88*, 4252-4258.
278. McWhirter, J.R., Galasso, D.L., and Wang, J.Y. (1993). A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol Cell Biol* *13*, 7587-7595.
279. Melo, J.V. (1996). The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* *88*, 2375-2384.
280. Merante, S., Orlandi, E., Bernasconi, P., Calatroni, S., Boni, M., and Lazzarino, M. (2005). Outcome of four patients with chronic myeloid leukemia after imatinib mesylate discontinuation. *Haematologica* *90*, 979-981.
281. Meyers, S., Lenny, N., and Hiebert, S.W. (1995). The t(8;21) fusion protein interferes with AML-1B-dependent transcriptional activation. *Molecular and cellular biology* *15*, 1974-1982.
282. Miething, C., Feihl, S., Mugler, C., Grundler, R., von Bubnoff, N., Lordick, F., Peschel, C., and Duyster, J. (2006). The Bcr-Abl mutations T315I and Y253H do not confer a growth advantage in the absence of imatinib. *Leukemia* *20*, 650-657.
283. Mikhail, F.M., Sinha, K.K., Sauntharajah, Y., and Nucifora, G. (2006). Normal and transforming functions of RUNX1: a perspective. *J Cell Physiol* *207*, 582-593.
284. Mills, K.D., Ferguson, D.O., and Alt, F.W. (2003). The role of DNA breaks in genomic instability and tumorigenesis. *Immunol Rev* *194*, 77-95.
285. Mitani, K., Ogawa, S., Tanaka, T., Miyoshi, H., Kurokawa, M., Mano, H., Yazaki, Y., Ohki, M., and Hirai, H. (1994). Generation of the AML1-EVI-1 fusion gene in the t(3;21)(q26;q22) causes blastic crisis in chronic myelocytic leukemia. *The EMBO journal* *13*, 504-510.
286. Miyamoto, T., Weissman, I.L., and Akashi, K. (2000). AML1/ETO-expressing nonleukemic stem cells in acute myelogenous leukemia with 8;21 chromosomal translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 7521-7526.
287. Miyoshi, H., Kozu, T., Shimizu, K., Enomoto, K., Maseki, N., Kaneko, Y., Kamada, N., and Ohki, M. (1993). The t(8;21) translocation in acute myeloid leukemia results in production of an AML1-MTG8 fusion transcript. *The EMBO journal* *12*, 2715-2721.
288. Miyoshi, H., Shimizu, K., Kozu, T., Maseki, N., Kaneko, Y., and Ohki, M. (1991). t(8;21) breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, AML1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *88*, 10431-10434.
289. Mizoguchi, Y., Fujita, N., Taki, T., Hayashi, Y., and Hamamoto, K. (2009). Juvenile myelomonocytic leukemia with t(7;11)(p15;p15) and NUP98-HOXA11 fusion. *American journal of hematology* *84*, 295-297.
290. Mochizuki, N., Shimizu, S., Nagasawa, T., Tanaka, H., Taniwaki, M., Yokota, J., and Morishita, K. (2000). A novel gene, MEL1, mapped to 1p36.3 is highly homologous to the MDS1/EVI1 gene and is transcriptionally activated in t(1;3)(p36;q21)-positive leukemia cells. *Blood* *96*, 3209-3214.
291. Modi, H., Li, L., Chu, S., Rossi, J., Yee, J.K., and Bhatia, R. (2011). Inhibition of Grb2 expression demonstrates an important role in BCR-ABL-mediated MAPK activation and transformation of primary human hematopoietic cells. *Leukemia* *25*, 305-312.
292. Modlich, U., Schambach, A., Brugman, M.H., Wicke, D.C., Knoess, S., Li, Z., Maetzig, T., Rudolph, C., Schlegelberger, B., and Baum, C. (2008). Leukemia induction after a single retroviral vector insertion in Evf1 or Prdm16. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* *22*, 1519-1528.
293. Moore, M.A. (2010). A cancer fate in the hands of a samurai. *Nat Med* *16*, 963-965.

294. Morel, F., Bris, M.J., Herry, A., Calvez, G.L., Marion, V., Abgrall, J.F., Berthou, C., and Braekeleer, M.D. (2003). Double minutes containing amplified bcr-abl fusion gene in a case of chronic myeloid leukemia treated by imatinib. *European journal of haematology* *70*, 235-239.
295. Morrison, S.J., Uchida, N., and Weissman, I.L. (1995). The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* *11*, 35-71.
296. Morrison, S.J., Wright, D.E., Cheshier, S.H., and Weissman, I.L. (1997). Hematopoietic stem cells: challenges to expectations. *Current opinion in immunology* *9*, 216-221.
297. Moskow, J.J., Bullrich, F., Huebner, K., Daar, I.O., and Buchberg, A.M. (1995). Meis1, a PBX1-related homeobox gene involved in myeloid leukemia in BXH-2 mice. *Mol Cell Biol* *15*, 5434-5443.
298. Muehleck, S.D., McKenna, R.W., Arthur, D.C., Parkin, J.L., and Brunning, R.D. (1984). Transformation of chronic myelogenous leukemia: clinical, morphologic, and cytogenetic features. *Am J Clin Pathol* *82*, 1-14.
299. Muller-Tidow, C., Steffen, B., Cauvet, T., Tickenbrock, L., Ji, P., Diederichs, S., Sargin, B., Kohler, G., Stelljes, M., Puccetti, E., *et al.* (2004). Translocation products in acute myeloid leukemia activate the Wnt signaling pathway in hematopoietic cells. *Mol Cell Biol* *24*, 2890-2904.
300. Mullighan, C.G., Miller, C.B., Radtke, I., Phillips, L.A., Dalton, J., Ma, J., White, D., Hughes, T.P., Le Beau, M.M., Pui, C.H., *et al.* (2008a). BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* *453*, 110-114.
301. Mullighan, C.G., Williams, R.T., Downing, J.R., and Sherr, C.J. (2008b). Failure of CDKN2A/B (INK4A/B-ARF)-mediated tumor suppression and resistance to targeted therapy in acute lymphoblastic leukemia induced by BCR-ABL. *Genes & development* *22*, 1411-1415.
302. Najfeld, V., Wisch, N., Mascarenhas, J., Issa, L., Tripodi, J., Sidhu, M., and Hoffman, R. (2011). Development of t(8;21) and RUNX1-RUNX1T1 in the Philadelphia-positive clone of a patient with chronic myelogenous leukemia: additional evidence for multiple steps involved in disease progression. *Cancer Genet* *204*, 165-170.
303. Nakahara, F., Sakata-Yanagimoto, M., Komeno, Y., Kato, N., Uchida, T., Haraguchi, K., Kumano, K., Harada, Y., Harada, H., Kitaura, J., *et al.* (2010). Hes1 immortalizes committed progenitors and plays a role in blast crisis transition in chronic myelogenous leukemia. *Blood* *115*, 2872-2881.
304. Nakamura, M., Okano, H., Blendy, J.A., and Montell, C. (1994). Musashi, a neural RNA-binding protein required for *Drosophila* adult external sensory organ development. *Neuron* *13*, 67-81.
305. Nakamura, T., Largaespada, D.A., Lee, M.P., Johnson, L.A., Ohyashiki, K., Toyama, K., Chen, S.J., Willman, C.L., Chen, I.M., Feinberg, A.P., *et al.* (1996a). Fusion of the nucleoporin gene NUP98 to HOXA9 by the chromosome translocation t(7;11)(p15;p15) in human myeloid leukaemia. *Nature genetics* *12*, 154-158.
306. Nakamura, T., Largaespada, D.A., Shaughnessy, J.D., Jr., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (1996b). Cooperative activation of Hoxa and Pbx1-related genes in murine myeloid leukaemias. *Nature genetics* *12*, 149-153.
307. Nakamura, Y., Nakazato, H., Sato, Y., Furusawa, S., and Mitani, K. (2002). Expression of the TEL/EV11 fusion transcript in a patient with chronic myelogenous leukemia with t(3;12)(q26;p13). *Am J Hematol* *69*, 80-82.
308. Nishikata, I., Nakahata, S., Saito, Y., Kaneda, K., Ichihara, E., Yamakawa, N., and Morishita, K. (2011). Sumoylation of MEL1S at lysine 568 and its interaction with CtBP facilitates its repressor activity and the blockade of G-CSF-induced myeloid differentiation. *Oncogene* *30*, 4194-4207.
309. Nishikata, I., Sasaki, H., Iga, M., Tateno, Y., Imayoshi, S., Asou, N., Nakamura, T., and Morishita, K. (2003). A novel EV11 gene family, MEL1, lacking a PR domain (MEL1S) is expressed mainly in t(1;3)(p36;q21)-positive AML and blocks G-CSF-induced myeloid differentiation. *Blood* *102*, 3323-3332.
310. Nowell, P.C. (1960). Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer research* *20*, 462-466.
311. Nowell, P.C., and Hungerford, D.A. (1960). Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *Journal of the National Cancer Institute* *25*, 85-109.
312. Nowicki, M.O., Falinski, R., Koptyra, M., Slupianek, A., Stoklosa, T., Gloc, E., Nieborowska-Skorska, M., Blasiak, J., and Skorski, T. (2004). BCR/ABL oncogenic kinase promotes unfaithful repair of the reactive oxygen species-dependent DNA double-strand breaks. *Blood* *104*, 3746-3753.
313. Nucifora, G. (1997). The EV11 gene in myeloid leukemia. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* *11*, 2022-2031.

314. Nucifora, G., Begy, C.R., Kobayashi, H., Roulston, D., Claxton, D., Pedersen-Bjergaard, J., Parganas, E., Ihle, J.N., and Rowley, J.D. (1994). Consistent intergenic splicing and production of multiple transcripts between AML1 at 21q22 and unrelated genes at 3q26 in (3;21)(q26;q22) translocations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 4004-4008.
315. Nusse, R., and Varmus, H.E. (1992). Wnt genes. *Cell* *69*, 1073-1087.
316. O'Brien, S.G., Guilhot, F., Goldman, J.M., and al., e. (2008). International randomized study of interferon versus STI571 (IRIS) 7-year follow-up: sustained survival, low rate of transformation and increased rate of major molecular response (MMR) in patients (pts) with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP) treated with Imatinib (IM). *Blood* *112*, 76.
317. O'Brien, S.G., Guilhot, F., Larson, R.A., Gathmann, I., Baccarani, M., Cervantes, F., Cornelissen, J.J., Fischer, T., Hochhaus, A., Hughes, T., *et al.* (2003). Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* *348*, 994-1004.
318. O'Hare, T., Eide, C.A., and Deininger, M.W. (2007). Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood* *110*, 2242-2249.
319. O'Hare, T., Walters, D.K., Stoffregen, E.P., Jia, T., Manley, P.W., Mestan, J., Cowan-Jacob, S.W., Lee, F.Y., Heinrich, M.C., Deininger, M.W., *et al.* (2005a). In vitro activity of Bcr-Abl inhibitors AMN107 and BMS-354825 against clinically relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants. *Cancer Res* *65*, 4500-4505.
320. O'Hare, T., Walters, D.K., Stoffregen, E.P., Sherbenou, D.W., Heinrich, M.C., Deininger, M.W., and Druker, B.J. (2005b). Combined Abl inhibitor therapy for minimizing drug resistance in chronic myeloid leukemia: Src/Abl inhibitors are compatible with imatinib. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *11*, 6987-6993.
321. Odero, M.D., Vizmanos, J.L., Roman, J.P., Lahortiga, I., Panizo, C., Calasanz, M.J., Zeleznik-Le, N.J., Rowley, J.D., and Novo, F.J. (2002). A novel gene, MDS2, is fused to ETV6/TEL in a t(1;12)(p36.1;p13) in a patient with myelodysplastic syndrome. *Genes, chromosomes & cancer* *35*, 11-19.
322. Oehler, V.G., Guthrie, K.A., Cummings, C.L., Sabo, K., Wood, B.L., Gooley, T., Yang, T., Epping, M.T., Shou, Y., Pogossova-Agadjanian, E., *et al.* (2009). The preferentially expressed antigen in melanoma (PRAME) inhibits myeloid differentiation in normal hematopoietic and leukemic progenitor cells. *Blood* *114*, 3299-3308.
323. Ogawa, M., and Yokomizo, T. (2000). [Regulation of hematopoietic cell development by AML1]. *Tanpakushitsu kakusan koso Protein, nucleic acid, enzyme* *45*, 18-25.
324. Oikawa, T., and Yamada, T. (2003). Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene* *303*, 11-34.
325. Okabe, M., Imai, T., Kurusu, M., Hiromi, Y., and Okano, H. (2001). Translational repression determines a neuronal potential in *Drosophila* asymmetric cell division. *Nature* *411*, 94-98.
326. Okuda, K., Golub, T.R., Gilliland, D.G., and Griffin, J.D. (1996). p210BCR/ABL, p190BCR/ABL, and TEL/ABL activate similar signal transduction pathways in hematopoietic cell lines. *Oncogene* *13*, 1147-1152.
327. Osato, M., Asou, N., Abdalla, E., Hoshino, K., Yamasaki, H., Okubo, T., Suzushima, H., Takatsuki, K., Kanno, T., Shigesada, K., *et al.* (1999). Biallelic and heterozygous point mutations in the runt domain of the AML1/PEBP2alphaB gene associated with myeloblastic leukemias. *Blood* *93*, 1817-1824.
328. Owen, C.J., Toze, C.L., Koochin, A., Forrest, D.L., Smith, C.A., Stevens, J.M., Jackson, S.C., Poon, M.C., Sinclair, G.D., Leber, B., *et al.* (2008). Five new pedigrees with inherited RUNX1 mutations causing familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy. *Blood* *112*, 4639-4645.
329. Owens, B.M., and Hawley, R.G. (2002). HOX and non-HOX homeobox genes in leukemic hematopoiesis. *Stem Cells* *20*, 364-379.
330. Palmqvist, L., Argiropoulos, B., Pineault, N., Abramovich, C., Sly, L.M., Krystal, G., Wan, A., and Humphries, R.K. (2006). The Flt3 receptor tyrosine kinase collaborates with NUP98-HOX fusions in acute myeloid leukemia. *Blood* *108*, 1030-1036.
331. Palomero, T., Barnes, K.C., Real, P.J., Glade Bender, J.L., Sulis, M.L., Murty, V.V., Colovai, A.I., Balbin, M., and Ferrando, A.A. (2006). CUTLL1, a novel human T-cell lymphoma cell line with t(7;9) rearrangement, aberrant NOTCH1 activation and high sensitivity to gamma-secretase inhibitors. *Leukemia* *20*, 1279-1287.

332. Panagopoulos, I., Strombeck, B., Isaksson, M., Heldrup, J., Olofsson, T., and Johansson, B. (2006). Fusion of ETV6 with an intronic sequence of the BAZ2A gene in a paediatric pre-B acute lymphoblastic leukaemia with a cryptic chromosome 12 rearrangement. *Br J Haematol* 133, 270-275.
333. Pane, F., Frigeri, F., Sindona, M., Luciano, L., Ferrara, F., Cimino, R., Meloni, G., Saglio, G., Salvatore, F., and Rotoli, B. (1996). Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood* 88, 2410-2414.
334. Papadopoulos, P., Ridge, S.A., Boucher, C.A., Stocking, C., and Wiedemann, L.M. (1995). The novel activation of ABL by fusion to an ets-related gene, TEL. *Cancer Res* 55, 34-38.
335. Peeters, P., Wlodarska, I., Baens, M., Criel, A., Selleslag, D., Hagemeyer, A., Van den Berghe, H., and Marynen, P. (1997). Fusion of ETV6 to MDS1/EV11 as a result of t(3;12)(q26;p13) in myeloproliferative disorders. *Cancer Res* 57, 564-569.
336. Pendergast, A.M. (2002). The Abl family kinases: mechanisms of regulation and signaling. *Adv Cancer Res* 85, 51-100.
337. Pendergast, A.M., Quilliam, L.A., Cripe, L.D., Bassing, C.H., Dai, Z., Li, N., Batzer, A., Rabun, K.M., Der, C.J., Schlessinger, J., *et al.* (1993). BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* 75, 175-185.
338. Perna, F., Abdel-Wahab, O., Levine, R.L., Jhanwar, S.C., Imada, K., and Nimer, S.D. (2011). ETV6-ABL1-positive "chronic myeloid leukemia": clinical and molecular response to tyrosine kinase inhibition. *Haematologica* 96, 342-343.
339. Perrotti, D., Cesi, V., Trotta, R., Guerzoni, C., Santilli, G., Campbell, K., Iervolino, A., Condorelli, F., Gambacorti-Passerini, C., Caligiuri, M.A., *et al.* (2002). BCR-ABL suppresses C/EBPalpha expression through inhibitory action of hnRNP E2. *Nat Genet* 30, 48-58.
340. Peterson, L.F., Mitrikeska, E., Giannola, D., Lui, Y., Sun, H., Bixby, D., Malek, S.N., Donato, N.J., Wang, S., and Talpaz, M. (2011). p53 stabilization induces apoptosis in chronic myeloid leukemia blast crisis cells. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* 25, 761-769.
341. Pineault, N., Helgason, C.D., Lawrence, H.J., and Humphries, R.K. (2002). Differential expression of Hox, Meis1, and Pbx1 genes in primitive cells throughout murine hematopoietic ontogeny. *Exp Hematol* 30, 49-57.
342. Plattner, R., Kadlec, L., DeMali, K.A., Kazlauskas, A., and Pendergast, A.M. (1999). c-Abl is activated by growth factors and Src family kinases and has a role in the cellular response to PDGF. *Genes Dev* 13, 2400-2411.
343. Pluk, H., Dorey, K., and Superti-Furga, G. (2002). Autoinhibition of c-Abl. *Cell* 108, 247-259.
344. Poirel, H., Oury, C., Carron, C., Duprez, E., Laabi, Y., Tsapis, A., Romana, S.P., Mauchauffe, M., Le Coniat, M., Berger, R., *et al.* (1997). The TEL gene products: nuclear phosphoproteins with DNA binding properties. *Oncogene* 14, 349-357.
345. Poplawski, T., and Blasiak, J. (2010). BCR/ABL downregulates DNA-PK(CS)-dependent and upregulates backup non-homologous end joining in leukemic cells. *Mol Biol Rep* 37, 2309-2315.
346. Popovic, R., Riesbeck, L.E., Velu, C.S., Chaubey, A., Zhang, J., Achille, N.J., Erfurth, F.E., Eaton, K., Lu, J., Grimes, H.L., *et al.* (2009). Regulation of mir-196b by MLL and its overexpression by MLL fusions contributes to immortalization. *Blood* 113, 3314-3322.
347. Preston, D.L., Kusumi, S., Tomonaga, M., Izumi, S., Ron, E., Kuramoto, A., Kamada, N., Dohy, H., Matsuo, T., Matsui, T., *et al.* (1994). Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiat Res* 137, S68-97.
348. Preudhomme, C., Warot-Loze, D., Roumier, C., Grardel-Duflos, N., Garand, R., Lai, J.L., Dastugue, N., Macintyre, E., Denis, C., Bauters, F., *et al.* (2000). High incidence of biallelic point mutations in the Runt domain of the AML1/PEBP2 alpha B gene in Mo acute myeloid leukemia and in myeloid malignancies with acquired trisomy 21. *Blood* 96, 2862-2869.
349. Pritchard, C.E., Fornerod, M., Kasper, L.H., and van Deursen, J.M. (1999). RAE1 is a shuttling mRNA export factor that binds to a GLEBS-like NUP98 motif at the nuclear pore complex through multiple domains. *The Journal of cell biology* 145, 237-254.
350. Prowald, A., Cronauer, M.V., von Klot, C., Eilers, T., Rinnab, L., Herrmann, T., Spindler, K.D., Montenarh, M., Jonas, U., and Burchardt, M. (2007). Modulation of beta-catenin-mediated TCF-signalling in prostate cancer cell lines by wild-type and mutant p53. *Prostate* 67, 1751-1760.
351. Puil, L., Liu, J., Gish, G., Mbamalu, G., Bowtell, D., Pelicci, P.G., Arlinghaus, R., and Pawson, T. (1994). Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *EMBO J* 13, 764-773.

352. Purton, L.E., and Scadden, D.T. (2007). Limiting factors in murine hematopoietic stem cell assays. *Cell Stem Cell* *1*, 263-270.
353. Quere, R., Karlsson, G., Hertwig, F., Rissler, M., Lindqvist, B., Fioretos, T., Vandenberghe, P., Slovak, M.L., Cammenga, J., and Karlsson, S. (2011). Smad4 binds Hoxa9 in the cytoplasm and protects primitive hematopoietic cells against nuclear activation by Hoxa9 and leukemia transformation. *Blood* *117*, 5918-5930.
354. Quintas-Cardama, A., and Cortes, J. (2009). Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood* *113*, 1619-1630.
355. Quintas-Cardama, A., Kantarjian, H., and Cortes, J. (2010). Third-generation tyrosine kinase inhibitors and beyond. *Semin Hematol* *47*, 371-380.
356. Quintas-Cardama, A., Kantarjian, H.M., and Cortes, J.E. (2009). Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer control : journal of the Moffitt Cancer Center* *16*, 122-131.
357. Raaijmakers, M.H., and Scadden, D.T. (2008). Evolving concepts on the microenvironmental niche for hematopoietic stem cells. *Curr Opin Hematol* *15*, 301-306.
358. Radich, J.P. (2007). The Biology of CML blast crisis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 384-391.
359. Radich, J.P., Dai, H., Mao, M., Oehler, V., Schelter, J., Druker, B., Sawyers, C., Shah, N., Stock, W., Willman, C.L., *et al.* (2006). Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 2794-2799.
360. Radu, A., Blobel, G., and Moore, M.S. (1995a). Identification of a protein complex that is required for nuclear protein import and mediates docking of import substrate to distinct nucleoporins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *92*, 1769-1773.
361. Radu, A., Moore, M.S., and Blobel, G. (1995b). The peptide repeat domain of nucleoporin Nup98 functions as a docking site in transport across the nuclear pore complex. *Cell* *81*, 215-222.
362. Raitano, A.B., Halpern, J.R., Hambuch, T.M., and Sawyers, C.L. (1995). The Bcr-Abl leukemia oncogene activates Jun kinase and requires Jun for transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 11746-11750.
363. Randall, T.D., and Weissman, I.L. (1997). Phenotypic and functional changes induced at the clonal level in hematopoietic stem cells after 5-fluorouracil treatment. *Blood* *89*, 3596-3606.
364. Randolph, T.R. (2005). Chronic myelocytic leukemia--Part II: Approaches to and molecular monitoring of therapy. *Clin Lab Sci* *18*, 49-56.
365. Raza-Egilmez, S.Z., Jani-Sait, S.N., Grossi, M., Higgins, M.J., Shows, T.B., and Aplan, P.D. (1998). NUP98-HOXD13 gene fusion in therapy-related acute myelogenous leukemia. *Cancer research* *58*, 4269-4273.
366. Ren, R. (2002). The molecular mechanism of chronic myelogenous leukemia and its therapeutic implications: studies in a murine model. *Oncogene* *21*, 8629-8642.
367. Ren, R. (2005). Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer* *5*, 172-183.
368. Reuther, G.W., Fu, H., Cripe, L.D., Collier, R.J., and Pendergast, A.M. (1994). Association of the protein kinases c-Bcr and Bcr-Abl with proteins of the 14-3-3 family. *Science* *266*, 129-133.
369. Reya, T., Duncan, A.W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D.C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R., and Weissman, I.L. (2003). A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* *423*, 409-414.
370. Roche-Lestienne, C., Deluche, L., Corm, S., Tigaud, I., Joha, S., Philippe, N., Geffroy, S., Lai, J.L., Nicolini, F.E., Preudhomme, C., *et al.* (2008). RUNX1 DNA-binding mutations and RUNX1-PRDM16 cryptic fusions in BCR-ABL+ leukemias are frequently associated with secondary trisomy 21 and may contribute to clonal evolution and imatinib resistance. *Blood* *111*, 3735-3741.
371. Roche-Lestienne, C., Soenen-Cornu, V., Gardel-Duflos, N., Lai, J.L., Philippe, N., Facon, T., Fenaux, P., and Preudhomme, C. (2002). Several types of mutations of the Abl gene can be found in chronic myeloid leukemia patients resistant to STI571, and they can pre-exist to the onset of treatment. *Blood* *100*, 1014-1018.
372. Rodrigues, M.S., Reddy, M.M., and Sattler, M. (2008). Cell cycle regulation by oncogenic tyrosine kinases in myeloid neoplasias: from molecular redox mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal* *10*, 1813-1848.
373. Romana, S.P., Mauchauffe, M., Le Coniat, M., Chumakov, I., Le Paslier, D., Berger, R., and Bernard, O.A. (1995). The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion. *Blood* *85*, 3662-3670.

374. Roos, G., Leanderson, T., and Lundgren, E. (1984). Interferon-induced cell cycle changes in human hematopoietic cell lines and fresh leukemic cells. *Cancer research* *44*, 2358-2362.
375. Roulston, D., Espinosa, R., 3rd, Nucifora, G., Larson, R.A., Le Beau, M.M., and Rowley, J.D. (1998). CBFA2(AML1) translocations with novel partner chromosomes in myeloid leukemias: association with prior therapy. *Blood* *92*, 2879-2885.
376. Rountantsev, S., Shah, N.P., Gorre, M.E., Nicoll, J., Brasher, B.B., Sawyers, C.L., and Van Etten, R.A. (2002). Clinical resistance to the kinase inhibitor STI-571 in chronic myeloid leukemia by mutation of Tyr-253 in the Abl kinase domain P-loop. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*, 10700-10705.
377. Rousselot, P., Huguet, F., Rea, D., Legros, L., Cayuela, J.M., Maarek, O., Blanchet, O., Marit, G., Gluckman, E., Reiffers, J., *et al.* (2007). Imatinib mesylate discontinuation in patients with chronic myelogenous leukemia in complete molecular remission for more than 2 years. *Blood* *109*, 58-60.
378. Rowley, J.D. (1973a). Identification of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia. *Annales de genétique* *16*, 109-112.
379. Rowley, J.D. (1973b). Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* *243*, 290-293.
380. Rubin, C.M., Larson, R.A., Anastasi, J., Winter, J.N., Thangavelu, M., Vardiman, J.W., Rowley, J.D., and Le Beau, M.M. (1990). t(3;21)(q26;q22): a recurring chromosomal abnormality in therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Blood* *76*, 2594-2598.
381. Rumpold, H., Wolf, A.M., Gruenewald, K., Gastl, G., Gunsilius, E., and Wolf, D. (2005). RNAi-mediated knockdown of P-glycoprotein using a transposon-based vector system durably restores imatinib sensitivity in imatinib-resistant CML cell lines. *Exp Hematol* *33*, 767-775.
382. Sakai, I., Tamura, T., Narumi, H., Uchida, N., Yakushijin, Y., Hato, T., Fujita, S., and Yasukawa, M. (2005). Novel RUNX1-PRDM16 fusion transcripts in a patient with acute myeloid leukemia showing t(1;21)(p36;q22). *Genes, chromosomes & cancer* *44*, 265-270.
383. Sakakibara, S., Nakamura, Y., Satoh, H., and Okano, H. (2001). Rna-binding protein Musashi2: developmentally regulated expression in neural precursor cells and subpopulations of neurons in mammalian CNS. *J Neurosci* *21*, 8091-8107.
384. Sakakibara, S., Nakamura, Y., Yoshida, T., Shibata, S., Koike, M., Takano, H., Ueda, S., Uchiyama, Y., Noda, T., and Okano, H. (2002). RNA-binding protein Musashi family: roles for CNS stem cells and a subpopulation of ependymal cells revealed by targeted disruption and antisense ablation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 15194-15199.
385. Sakamoto, Y., Hara, K., Kanai-Azuma, M., Matsui, T., Miura, Y., Tsunekawa, N., Kurohmaru, M., Saijoh, Y., Koopman, P., and Kanai, Y. (2007). Redundant roles of Sox17 and Sox18 in early cardiovascular development of mouse embryos. *Biochemical and biophysical research communications* *360*, 539-544.
386. Salomoni, P., Condorelli, F., Sweeney, S.M., and Calabretta, B. (2000). Versatility of BCR/ABL-expressing leukemic cells in circumventing proapoptotic BAD effects. *Blood* *96*, 676-684.
387. Samanta, A.K., Chakraborty, S.N., Wang, Y., Kantarjian, H., Sun, X., Hood, J., Perrotti, D., and Arlinghaus, R.B. (2009). Jak2 inhibition deactivates Lyn kinase through the SET-PP2A-SHP1 pathway, causing apoptosis in drug-resistant cells from chronic myelogenous leukemia patients. *Oncogene* *28*, 1669-1681.
388. Samanta, A.K., Lin, H., Sun, T., Kantarjian, H., and Arlinghaus, R.B. (2006). Janus kinase 2: a critical target in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res* *66*, 6468-6472.
389. Sangfelt, O., Erickson, S., Castro, J., Heiden, T., Gustafsson, A., Einhorn, S., and Grandér, D. (1999). Molecular mechanisms underlying interferon-alpha-induced G0/G1 arrest: CKI-mediated regulation of G1 Cdk-complexes and activation of pocket proteins. *Oncogene* *18*, 2798-2810.
390. Sangfelt, O., Erickson, S., Einhorn, S., and Grandér, D. (1997). Induction of Cip/Kip and Ink4 cyclin dependent kinase inhibitors by interferon-alpha in hematopoietic cell lines. *Oncogene* *14*, 415-423.
391. Sarkar, D., Park, E.S., and Fisher, P.B. (2006). Defining the mechanism by which IFN-beta downregulates c-myc expression in human melanoma cells: pivotal role for human polynucleotide phosphorylase (hPNPaseold-35). *Cell death and differentiation* *13*, 1541-1553.
392. Sato, Y., Bohlander, S.K., Kobayashi, H., Reshmi, S., Suto, Y., Davis, E.M., Espinosa, R., Hoopes, R., Montgomery, K.T., Kucherlapati, R.S., *et al.* (1997). Heterogeneity in the breakpoints in balanced rearrangements involving band 12p13 in hematologic malignancies identified by fluorescence in situ hybridization: TEL (ETV6) is involved in only one half. *Blood* *90*, 4886-4893.

393. Satoh, C., and Ogata, K. (2006). Hypothesis: myeloid-restricted hematopoietic stem cells with self-renewal capacity may be the transformation site in acute myeloid leukemia. *Leukemia research* 30, 491-495.
394. Sattler, M., Mohi, M.G., Pride, Y.B., Quinnan, L.R., Malouf, N.A., Podar, K., Gesbert, F., Iwasaki, H., Li, S., Van Etten, R.A., *et al.* (2002). Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. *Cancer Cell* 1, 479-492.
395. Sattler, M., Verma, S., Shrikhande, G., Byrne, C.H., Pride, Y.B., Winkler, T., Greenfield, E.A., Salgia, R., and Griffin, J.D. (2000). The BCR/ABL tyrosine kinase induces production of reactive oxygen species in hematopoietic cells. *J Biol Chem* 275, 24273-24278.
396. Sauvageau, G., Lansdorp, P.M., Eaves, C.J., Hogge, D.E., Dragowska, W.H., Reid, D.S., Largman, C., Lawrence, H.J., and Humphries, R.K. (1994). Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 12223-12227.
397. Sauvageau, G., Thorsteinsdottir, U., Eaves, C.J., Lawrence, H.J., Largman, C., Lansdorp, P.M., and Humphries, R.K. (1995). Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes & development* 9, 1753-1765.
398. Savage, D.G., Szydlo, R.M., and Goldman, J.M. (1997). Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-year period. *Br J Haematol* 96, 111-116.
399. Sawyers, C.L., Callahan, W., and Witte, O.N. (1992). Dominant negative MYC blocks transformation by ABL oncogenes. *Cell* 70, 901-910.
400. Sawyers, C.L., McLaughlin, J., Goga, A., Havlik, M., and Witte, O. (1994). The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. *Cell* 77, 121-131.
401. Schepers, G.E., Teasdale, R.D., and Koopman, P. (2002). Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. *Dev Cell* 3, 167-170.
402. Schindler, J.W., Van Buren, D., Foudi, A., Krejci, O., Qin, J., Orkin, S.H., and Hock, H. (2009). TEL-AML1 corrupts hematopoietic stem cells to persist in the bone marrow and initiate leukemia. *Cell stem cell* 5, 43-53.
403. Schindler, T., Bornmann, W., Pellicena, P., Miller, W.T., Clarkson, B., and Kuriyan, J. (2000). Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* 289, 1938-1942.
404. Schroeder, T. (2010). Hematopoietic stem cell heterogeneity: subtypes, not unpredictable behavior. *Cell Stem Cell* 6, 203-207.
405. Schuster, C., Forster, K., Dierks, H., Elsasser, A., Behre, G., Simon, N., Danhauser-Riedl, S., Hallek, M., and Warmuth, M. (2003). The effects of Bcr-Abl on C/EBP transcription-factor regulation and neutrophilic differentiation are reversed by the Abl kinase inhibitor imatinib mesylate. *Blood* 101, 655-663.
406. Schutte, J., Opalka, B., Becher, R., Bardenheuer, W., Szymanski, S., Lux, A., and Seeber, S. (1993). Analysis of the p53 gene in patients with isochromosome 17q and Ph1-positive or -negative myeloid leukemia. *Leuk Res* 17, 533-539.
407. Seale, P., Conroe, H.M., Estall, J., Kajimura, S., Frontini, A., Ishibashi, J., Cohen, P., Cinti, S., and Spiegelman, B.M. (2011). Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *The Journal of clinical investigation* 121, 96-105.
408. Seale, P., Kajimura, S., Yang, W., Chin, S., Rohas, L.M., Uldry, M., Tavernier, G., Langin, D., and Spiegelman, B.M. (2007). Transcriptional control of brown fat determination by PRDM16. *Cell metabolism* 6, 38-54.
409. Serrano, A.G., Gandillet, A., Pearson, S., Lacaud, G., and Kouskoff, V. (2010). Contrasting effects of Sox17- and Sox18-sustained expression at the onset of blood specification. *Blood* 115, 3895-3898.
410. Shaffer, L.G., Slovak, M.L., Campbell, L.J., and editors., eds. (2009). *ISCN 2009: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2009): Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature* (Basel: Karger).
411. Shah, N.P., Nicoll, J.M., Nagar, B., Gorre, M.E., Paquette, R.L., Kuriyan, J., and Sawyers, C.L. (2002). Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer cell* 2, 117-125.

412. Shah, N.P., Skaggs, B.J., Branford, S., Hughes, T.P., Nicoll, J.M., Paquette, R.L., and Sawyers, C.L. (2007). Sequential ABL kinase inhibitor therapy selects for compound drug-resistant BCR-ABL mutations with altered oncogenic potency. *J Clin Invest* *117*, 2562-2569.
413. Shah, N.P., Tran, C., Lee, F.Y., Chen, P., Norris, D., and Sawyers, C.L. (2004). Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science* *305*, 399-401.
414. Shen, W.F., Rozenfeld, S., Kwong, A., Kom ves, L.G., Lawrence, H.J., and Largman, C. (1999). HOXA9 forms triple complexes with PBX2 and MEIS1 in myeloid cells. *Molecular and cellular biology* *19*, 3051-3061.
415. Shi, X., Bai, S., Li, L., and Cao, X. (2001). Hoxa-9 represses transforming growth factor-beta-induced osteopontin gene transcription. *The Journal of biological chemistry* *276*, 850-855.
416. Shimada, H., Arai, Y., Sekiguchi, S., Ishii, T., Tanitsu, S., and Sasaki, M. (2000). Generation of the NUP98-HOXD13 fusion transcript by a rare translocation, t(2;11)(q31;p15), in a case of infant leukaemia. *Br J Haematol* *110*, 210-213.
417. Shing, D.C., Trubia, M., Marchesi, F., Radaelli, E., Belloni, E., Tapinassi, C., Scanziani, E., Mecucci, C., Crescenzi, B., Lahortiga, I., *et al.* (2007). Overexpression of sPRDM16 coupled with loss of p53 induces myeloid leukemias in mice. *The Journal of clinical investigation* *117*, 3696-3707.
418. Shtivelman, E., Lifshitz, B., Gale, R.P., and Canaani, E. (1985). Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* *315*, 550-554.
419. Shuai, K., Halpern, J., ten Hoeve, J., Rao, X., and Sawyers, C.L. (1996). Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene* *13*, 247-254.
420. Shurtleff, S.A., Buijs, A., Behm, F.G., Rubnitz, J.E., Raimondi, S.C., Hancock, M.L., Chan, G.C., Pui, C.H., Grosveld, G., and Downing, J.R. (1995). TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia* *9*, 1985-1989.
421. Siapati, E.K., Papadaki, M., Kozaou, Z., Rouka, E., Michali, E., Savvidou, I., Gogos, D., Kyriakou, D., Anagnostopoulos, N.I., and Vassilopoulos, G. (2011). Proliferation and bone marrow engraftment of AML blasts is dependent on beta-catenin signalling. *British journal of haematology* *152*, 164-174.
422. Sillar, R., and Young, B.D. (1981). A new method for the preparation of metaphase chromosomes for flow analysis. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* *29*, 74-78.
423. Sinner, D., Kordich, J.J., Spence, J.R., Opoka, R., Rankin, S., Lin, S.C., Jonatan, D., Zorn, A.M., and Wells, J.M. (2007). Sox17 and Sox4 differentially regulate beta-catenin/T-cell factor activity and proliferation of colon carcinoma cells. *Molecular and cellular biology* *27*, 7802-7815.
424. Sirvent, A., Benistant, C., and Roche, S. (2008). Cytoplasmic signalling by the c-Abl tyrosine kinase in normal and cancer cells. *Biol Cell* *100*, 617-631.
425. Skorski, T. (2008). BCR/ABL, DNA damage and DNA repair: implications for new treatment concepts. *Leuk Lymphoma* *49*, 610-614.
426. Skorski, T., Bellacosa, A., Nieborowska-Skorska, M., Majewski, M., Martinez, R., Choi, J.K., Trotta, R., Wlodarski, P., Perrotti, D., Chan, T.O., *et al.* (1997). Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO J* *16*, 6151-6161.
427. Slape, C., Chung, Y.J., Soloway, P.D., Tessarollo, L., and Aplan, P.D. (2007). Mouse embryonic stem cells that express a NUP98-HOXD13 fusion protein are impaired in their ability to differentiate and can be complemented by BCR-ABL. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* *21*, 1239-1248.
428. Slupianek, A., Nowicki, M.O., Koptyra, M., and Skorski, T. (2006). BCR/ABL modifies the kinetics and fidelity of DNA double-strand breaks repair in hematopoietic cells. *DNA repair* *5*, 243-250.
429. Slupianek, A., Schmutte, C., Tomblin, G., Nieborowska-Skorska, M., Hoser, G., Nowicki, M.O., Pierce, A.J., Fishel, R., and Skorski, T. (2001). BCR/ABL regulates mammalian RecA homologs, resulting in drug resistance. *Mol Cell* *8*, 795-806.
430. So, C.W., Karsunky, H., Passegue, E., Cozzio, A., Weissman, I.L., and Cleary, M.L. (2003). MLL-GAS7 transforms multipotent hematopoietic progenitors and induces mixed lineage leukemias in mice. *Cancer Cell* *3*, 161-171.
431. Song, W.J., Sullivan, M.G., Legare, R.D., Hutchings, S., Tan, X., Kufrin, D., Ratajczak, J., Resende, I.C., Haworth, C., Hock, R., *et al.* (1999). Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nature genetics* *23*, 166-175.

432. Sorel, N., Bonnet, M.L., Guillier, M., Guilhot, F., Brizard, A., and Turhan, A.G. (2004). Evidence of ABL-kinase domain mutations in highly purified primitive stem cell populations of patients with chronic myelogenous leukemia. *Biochem Biophys Res Commun* 323, 728-730.
433. Soulier, J., Clappier, E., Cayuela, J.M., Regnault, A., Garcia-Peydro, M., Dombret, H., Baruchel, A., Toribio, M.L., and Sigaux, F. (2005). HOXA genes are included in genetic and biologic networks defining human acute T-cell leukemia (T-ALL). *Blood* 106, 274-286.
434. Spiekermann, K., Pau, M., Schwab, R., Schmieja, K., Franzrahe, S., and Hiddemann, W. (2002). Constitutive activation of STAT3 and STAT5 is induced by leukemic fusion proteins with protein tyrosine kinase activity and is sufficient for transformation of hematopoietic precursor cells. *Exp Hematol* 30, 262-271.
435. Spiers, A.S., Bain, B.J., and Turner, J.E. (1977). The peripheral blood in chronic granulocytic leukaemia. Study of 50 untreated Philadelphia-positive cases. *Scand J Haematol* 18, 25-38.
436. Staal, F.J., and Clevers, H.C. (2003). Wnt signaling in the thymus. *Curr Opin Immunol* 15, 204-208.
437. Staal, F.J., and Clevers, H.C. (2005). WNT signalling and haematopoiesis: a WNT-WNT situation. *Nat Rev Immunol* 5, 21-30.
438. Staal, F.J., and Luis, T.C. (2010). Wnt signaling in hematopoiesis: crucial factors for self-renewal, proliferation, and cell fate decisions. *J Cell Biochem* 109, 844-849.
439. Staal, F.J., Luis, T.C., and Tiemessen, M.M. (2008). WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nat Rev Immunol* 8, 581-593.
440. Stahl, M., Dijkers, P.F., Kops, G.J., Lens, S.M., Coffey, P.J., Burgering, B.M., and Medema, R.H. (2002). The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of p27Kip1 and Bim in response to IL-2. *Journal of immunology* 168, 5024-5031.
441. Stecca, B., and Ruiz i Altaba, A. (2009). A GLI1-p53 inhibitory loop controls neural stem cell and tumour cell numbers. *EMBO J* 28, 663-676.
442. Steelman, L.S., Abrams, S.L., Whelan, J., Bertrand, F.E., Ludwig, D.E., Basecke, J., Libra, M., Stivala, F., Milella, M., Tafuri, A., *et al.* (2008). Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia. *Leukemia* 22, 686-707.
443. Stevens-Kroef, M.J., Schoenmakers, E.F., van Kraaij, M., Huys, E., Vermeulen, S., van der Reijden, B., and van Kessel, A.G. (2006). Identification of truncated RUNX1 and RUNX1-PRDM16 fusion transcripts in a case of t(1;21)(p36;q22)-positive therapy-related AML. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* 20, 1187-1189.
444. Storlazzi, C.T., Albano, F., Guastadisegni, M.C., Impera, L., Muhlematter, D., Meyer-Monard, S., Wuillemin, W., Rocchi, M., and Jotterand, M. (2008). Upregulation of MEL1 and FLJ42875 genes by position effect resulting from a t(1;2)(p36;p21) occurring during evolution of chronic myelomonocytic leukemia. *Blood Cells Mol Dis* 40, 452-455.
445. Storlazzi, C.T., Albano, F., Lo Cunsolo, C., Doglioni, C., Guastadisegni, M.C., Impera, L., Lonoce, A., Funes, S., Macri, E., Iuzzolino, P., *et al.* (2007). Upregulation of the SOX5 by promoter swapping with the P2RY8 gene in primary splenic follicular lymphoma. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* 21, 2221-2225.
446. Stubbs, M.C., Kim, Y.M., Krivtsov, A.V., Wright, R.D., Feng, Z., Agarwal, J., Kung, A.L., and Armstrong, S.A. (2008). MLL-AF9 and FLT3 cooperation in acute myelogenous leukemia: development of a model for rapid therapeutic assessment. *Leukemia* 22, 66-77.
447. Su, X., Drabkin, H., Clappier, E., Morgado, E., Busson, M., Romana, S., Soulier, J., Berger, R., Bernard, O.A., and Lavau, C. (2006). Transforming potential of the T-cell acute lymphoblastic leukemia-associated homeobox genes HOXA13, TLX1, and TLX3. *Genes, chromosomes & cancer* 45, 846-855.
448. Suljagic, M., Laurenti, L., Tarnani, M., Alam, M., Malek, S.N., and Efremov, D.G. (2010). Reduced expression of the tumor suppressor PHLPP1 enhances the antiapoptotic B-cell receptor signal in chronic lymphocytic leukemia B-cells. *Leukemia*.
449. Suto, Y., Sato, Y., Smith, S.D., Rowley, J.D., and Bohlander, S.K. (1997). A t(6;12)(q23;p13) results in the fusion of ETV6 to a novel gene, STL, in a B-cell ALL cell line. *Genes Chromosomes Cancer* 18, 254-268.
450. Suzukawa, K., Taki, T., Abe, T., Asoh, H., Kamada, N., Yokota, J., and Morishita, K. (1997). Identification of translocational breakpoints within the intron region before the last coding exon (exon 12) of the EVI1 gene in two cases of CML-BC with inv(3)(q21q26). *Genomics* 42, 356-360.
451. Suzuki, A., Ito, Y., Sashida, G., Honda, S., Katagiri, T., Fujino, T., Nakamura, T., and Ohyashiki, K. (2002). t(7;11)(p15;p15) Chronic myeloid leukaemia developed into blastic transformation showing a novel NUP98/HOXA11 fusion. *British journal of haematology* 116, 170-172.

452. Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, S.J., Pileri, A.S., Stein, H., Jürgen, T., and Vardiman, J.W. (2008). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Lyon, France: IARC Press).
453. Swolin, B., Weinfeld, A., Waldenstrom, J., and Westin, J. (1983). Cytogenetic studies of bone marrow and extramedullary tissues and clinical course during metamorphosis of chronic myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 9, 197-209.
454. Szatrowski, T.P., and Nathan, C.F. (1991). Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res* 51, 794-798.
455. Taagepera, S., McDonald, D., Loeb, J.E., Whitaker, L.L., McElroy, A.K., Wang, J.Y., and Hope, T.J. (1998). Nuclear-cytoplasmic shuttling of C-ABL tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7457-7462.
456. Tabuse, M., Ohta, S., Ohashi, Y., Fukaya, R., Misawa, A., Yoshida, K., Kawase, T., Saya, H., Thirant, C., Chneiweiss, H., *et al.* (2011). Functional analysis of HOXD9 in human gliomas and glioma cancer stem cells. *Molecular cancer* 10, 60.
457. Taipale, J., and Beachy, P.A. (2001). The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* 411, 349-354.
458. Takahashi, A., Satake, M., Yamaguchi-Iwai, Y., Bae, S.C., Lu, J., Maruyama, M., Zhang, Y.W., Oka, H., Arai, N., Arai, K., *et al.* (1995). Positive and negative regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor promoter activity by AML1-related transcription factor, PEBP2. *Blood* 86, 607-616.
459. Takahata, M., Inoue, Y., Tsuda, H., Imoto, I., Koinuma, D., Hayashi, M., Ichikura, T., Yamori, T., Nagasaki, K., Yoshida, M., *et al.* (2009). SKI and MEL1 cooperate to inhibit transforming growth factor-beta signal in gastric cancer cells. *J Biol Chem* 284, 3334-3344.
460. Takebe, N., Harris, P.J., Warren, R.Q., and Ivy, S.P. (2011). Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways. *Nat Rev Clin Oncol* 8, 97-106.
461. Takeda, A., Goolsby, C., and Yaseen, N.R. (2006). NUP98-HOXA9 induces long-term proliferation and blocks differentiation of primary human CD34+ hematopoietic cells. *Cancer research* 66, 6628-6637.
462. Taketani, T., Taki, T., Ono, R., Kobayashi, Y., Ida, K., and Hayashi, Y. (2002a). The chromosome translocation t(7;11)(p15;p15) in acute myeloid leukemia results in fusion of the NUP98 gene with a HOXA cluster gene, HOXA13, but not HOXA9. *Genes, chromosomes & cancer* 34, 437-443.
463. Taketani, T., Taki, T., Ono, R., Kobayashi, Y., Ida, K., and Hayashi, Y. (2002b). The chromosome translocation t(7;11)(p15;p15) in acute myeloid leukemia results in fusion of the NUP98 gene with a HOXA cluster gene, HOXA13, but not HOXA9. *Genes, chromosomes & cancer* 34, 437-443.
464. Taketani, T., Taki, T., Shibuya, N., Ito, E., Kitazawa, J., Terui, K., and Hayashi, Y. (2002c). The HOXD11 gene is fused to the NUP98 gene in acute myeloid leukemia with t(2;11)(q31;p15). *Cancer research* 62, 33-37.
465. Taketani, T., Taki, T., Takita, J., Tsuchida, M., Hanada, R., Hongo, T., Kaneko, T., Manabe, A., Ida, K., and Hayashi, Y. (2003). AML1/RUNX1 mutations are infrequent, but related to AML-M0, acquired trisomy 21, and leukemic transformation in pediatric hematologic malignancies. *Genes, chromosomes & cancer* 38, 1-7.
466. Talpaz, M., Kantarjian, H.M., McCredie, K.B., Keating, M.J., Trujillo, J., and Gutterman, J. (1987). Clinical investigation of human alpha interferon in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 69, 1280-1288.
467. Talpaz, M., McCredie, K.B., Mavligit, G.M., and Gutterman, J.U. (1983). Leukocyte interferon-induced myeloid cyto-reduction in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 62, 689-692.
468. Tanaka, T., Tanaka, K., Ogawa, S., Kurokawa, M., Mitani, K., Nishida, J., Shibata, Y., Yazaki, Y., and Hirai, H. (1995). An acute myeloid leukemia gene, AML1, regulates hemopoietic myeloid cell differentiation and transcriptional activation antagonistically by two alternative spliced forms. *The EMBO journal* 14, 341-350.
469. Taniuchi, I., Osato, M., Egawa, T., Sunshine, M.J., Bae, S.C., Komori, T., Ito, Y., and Littman, D.R. (2002). Differential requirements for Runx proteins in CD4 repression and epigenetic silencing during T lymphocyte development. *Cell* 111, 621-633.
470. Tauchi, T., Boswell, H.S., Leibowitz, D., and Broxmeyer, H.E. (1994). Coupling between p210bcr-abl and Shc and Grb2 adaptor proteins in hematopoietic cells permits growth factor receptor-independent link to ras activation pathway. *The Journal of experimental medicine* 179, 167-175.

471. te Welscher, P., Zuniga, A., Kuijper, S., Drenth, T., Goedemans, H.J., Meijlink, F., and Zeller, R. (2002). Progression of vertebrate limb development through SHH-mediated counteraction of GLI3. *Science* *298*, 827-830.
472. Telenius, H., Carter, N.P., Bebb, C.E., Nordenskjold, M., Ponder, B.A., and Tunnacliffe, A. (1992a). Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* *13*, 718-725.
473. Telenius, H., Pelmear, A.H., Tunnacliffe, A., Carter, N.P., Behmel, A., Ferguson-Smith, M.A., Nordenskjold, M., Pfragner, R., and Ponder, B.A. (1992b). Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes, chromosomes & cancer* *4*, 257-263.
474. Thomas, N.S., Pizzey, A.R., Tiwari, S., Williams, C.D., and Yang, J. (1998). p130, p107, and pRb are differentially regulated in proliferating cells and during cell cycle arrest by alpha-interferon. *The Journal of biological chemistry* *273*, 23659-23667.
475. Thorsteinsdottir, U., Mamo, A., Kroon, E., Jerome, L., Bijl, J., Lawrence, H.J., Humphries, K., and Sauvageau, G. (2002). Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. *Blood* *99*, 121-129.
476. Thorsteinsdottir, U., Sauvageau, G., and Humphries, R.K. (1997). Hox homeobox genes as regulators of normal and leukemic hematopoiesis. *Hematology/oncology clinics of North America* *11*, 1221-1237.
477. Till, J.E., and Mc, C.E. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation research* *14*, 213-222.
478. Tjio, J.H., and Levan, A. (1956). The chromosome number of man. *Hereditas* *42*, 1-6.
479. Tokarski, J.S., Newitt, J.A., Chang, C.Y., Cheng, J.D., Wittekind, M., Kiefer, S.E., Kish, K., Lee, F.Y., Borzilleri, R., Lombardo, L.J., *et al.* (2006). The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants. *Cancer Res* *66*, 5790-5797.
480. Trowbridge, J.J., Scott, M.P., and Bhatia, M. (2006). Hedgehog modulates cell cycle regulators in stem cells to control hematopoietic regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 14134-14139.
481. Trzcinska-Daneluti, A.M., Gorecki, A., Czuby, A., Kowalska-Loth, B., Girstun, A., Murawska, M., Lesyng, B., and Staron, K. (2007). RRM proteins interacting with the cap region of topoisomerase I. *J Mol Biol* *369*, 1098-1112.
482. Uchida, H., Downing, J.R., Miyazaki, Y., Frank, R., Zhang, J., and Nimer, S.D. (1999). Three distinct domains in TEL-AML1 are required for transcriptional repression of the IL-3 promoter. *Oncogene* *18*, 1015-1022.
483. Uchida, H., Zhang, J., and Nimer, S.D. (1997). AML1A and AML1B can transactivate the human IL-3 promoter. *Journal of immunology* *158*, 2251-2258.
484. Vafa, O., Wade, M., Kern, S., Beeche, M., Pandita, T.K., Hampton, G.M., and Wahl, G.M. (2002). c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol Cell* *9*, 1031-1044.
485. Van Etten, R.A. (1999). Cycling, stressed-out and nervous: cellular functions of c-Abl. *Trends Cell Biol* *9*, 179-186.
486. Vardiman JW, H.N., Brunning RD (2002). The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* *100*, 2292-2302.
487. Varnum-Finney, B., Xu, L., Brashem-Stein, C., Nourigat, C., Flowers, D., Bakkour, S., Pear, W.S., and Bernstein, I.D. (2000). Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nature medicine* *6*, 1278-1281.
488. Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., *et al.* (2001). The sequence of the human genome. *Science* *291*, 1304-1351.
489. Verhaak, R.G., Goudswaard, C.S., van Putten, W., Bijl, M.A., Sanders, M.A., Hagens, W., Uitterlinden, A.G., Erpelink, C.A., Delwel, R., Lowenberg, B., *et al.* (2005). Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood* *106*, 3747-3754.
490. Verma, D.S., Spitzer, G., Gutterman, J.U., Zander, A.R., McCredie, K.B., and Dicke, K.A. (1979). Human leukocyte interferon preparation blocks granulopoietic differentiation. *Blood* *54*, 1423-1427.
491. Vigneri, P., and Wang, J.Y. (2001). Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase. *Nat Med* *7*, 228-234.

492. Virchow, R. (1847). Weisses Blut und Milztumoren. *Med Z* 16, 1847.
493. Virtaneva, K., Wright, F.A., Tanner, S.M., Yuan, B., Lemon, W.J., Caligiuri, M.A., Bloomfield, C.D., de La Chapelle, A., and Krahe, R. (2001). Expression profiling reveals fundamental biological differences in acute myeloid leukemia with isolated trisomy 8 and normal cytogenetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1124-1129.
494. Visvader, J.E., and Lindeman, G.J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature reviews Cancer* 8, 755-768.
495. Voncken, J.W., Kaartinen, V., Pattengale, P.K., Germeraad, W.T., Groffen, J., and Heisterkamp, N. (1995a). BCR/ABL P210 and P190 cause distinct leukemia in transgenic mice. *Blood* 86, 4603-4611.
496. Voncken, J.W., van Schaick, H., Kaartinen, V., Deemer, K., Coates, T., Landing, B., Pattengale, P., Dorseuil, O., Bokoch, G.M., Groffen, J., *et al.* (1995b). Increased neutrophil respiratory burst in bcr-null mutants. *Cell* 80, 719-728.
497. Wang, H., Guo, Z., and Ji, S. (2000). [Homoharringtonine Induces Apoptosis of K562 Cells through Inhibition of P210(bcr/abl)]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 8, 287-289.
498. Wang, J.Y. (2000). Regulation of cell death by the Abl tyrosine kinase. *Oncogene* 19, 5643-5650.
499. Wang, K.C., Helms, J.A., and Chang, H.Y. (2009). Regeneration, repair and remembering identity: the three Rs of Hox gene expression. *Trends in cell biology* 19, 268-275.
500. Wang, K.C., Yang, Y.W., Liu, B., Sanyal, A., Corces-Zimmerman, R., Chen, Y., Lajoie, B.R., Protacio, A., Flynn, R.A., Gupta, R.A., *et al.* (2011). A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature* 472, 120-124.
501. Wang, L.C., Swat, W., Fujiwara, Y., Davidson, L., Visvader, J., Kuo, F., Alt, F.W., Gilliland, D.G., Golub, T.R., and Orkin, S.H. (1998). The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev* 12, 2392-2402.
502. Wang, Q., Stacy, T., Binder, M., Marin-Padilla, M., Sharpe, A.H., and Speck, N.A. (1996). Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3444-3449.
503. Wang, Y., Krivtsov, A.V., Sinha, A.U., North, T.E., Goessling, W., Feng, Z., Zon, L.I., and Armstrong, S.A. (2010). The Wnt/beta-catenin pathway is required for the development of leukemia stem cells in AML. *Science* 327, 1650-1653.
504. Warner, D.R., Horn, K.H., Mudd, L., Webb, C.L., Greene, R.M., and Pisano, M.M. (2007). PRDM16/MEL1: a novel Smad binding protein expressed in murine embryonic orofacial tissue. *Biochim Biophys Acta* 1773, 814-820.
505. Wasylyk, B., Hahn, S.L., and Giovane, A. (1993). The Ets family of transcription factors. *Eur J Biochem* 211, 7-18.
506. Webb, D.K., Passmore, S.J., Hann, I.M., Harrison, G., Wheatley, K., and Chessells, J.M. (2002). Results of treatment of children with refractory anaemia with excess blasts (RAEB) and RAEB in transformation (RAEBt) in Great Britain 1990-99. *British journal of haematology* 117, 33-39.
507. Weisberg, E., and Griffin, J.D. (2000). Mechanism of resistance to the ABL tyrosine kinase inhibitor STI571 in BCR/ABL-transformed hematopoietic cell lines. *Blood* 95, 3498-3505.
508. Weisberg, E., Manley, P., Mestan, J., Cowan-Jacob, S., Ray, A., and Griffin, J.D. (2006). AMN107 (nilotinib): a novel and selective inhibitor of BCR-ABL. *Br J Cancer* 94, 1765-1769.
509. Weisberg, E., Manley, P.W., Breitenstein, W., Bruggen, J., Cowan-Jacob, S.W., Ray, A., Huntly, B., Fabbro, D., Fendrich, G., Hall-Meyers, E., *et al.* (2005). Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell* 7, 129-141.
510. Weisberg, E., Manley, P.W., Cowan-Jacob, S.W., Hochhaus, A., and Griffin, J.D. (2007). Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer* 7, 345-356.
511. Wen, S.T., Jackson, P.K., and Van Etten, R.A. (1996). The cytostatic function of c-Abl is controlled by multiple nuclear localization signals and requires the p53 and Rb tumor suppressor gene products. *EMBO J* 15, 1583-1595.
512. Wendel, H.G., de Stanchina, E., Cepero, E., Ray, S., Emig, M., Fridman, J.S., Veach, D.R., Bornmann, W.G., Clarkson, B., McCombie, W.R., *et al.* (2006). Loss of p53 impedes the antileukemic response to BCR-ABL inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7444-7449.
513. Weng, A.P., Ferrando, A.A., Lee, W., Morris, J.P.t., Silverman, L.B., Sanchez-Irizarry, C., Blacklow, S.C., Look, A.T., and Aster, J.C. (2004). Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 306, 269-271.

514. Wetzler, M., Talpaz, M., Van Etten, R.A., Hirsh-Ginsberg, C., Beran, M., and Kurzrock, R. (1993). Subcellular localization of Bcr, Abl, and Bcr-Abl proteins in normal and leukemic cells and correlation of expression with myeloid differentiation. *J Clin Invest* 92, 1925-1939.
515. Wetzler, M., Talpaz, M., Yee, G., Stass, S.A., Van Etten, R.A., Andreeff, M., Goodacre, A.M., Kleine, H.D., Mahadevia, R.K., and Kurzrock, R. (1995). Cell cycle-related shifts in subcellular localization of BCR: association with mitotic chromosomes and with heterochromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3488-3492.
516. White, D.L., Saunders, V.A., Dang, P., Engler, J., Zannettino, A.C., Cambareri, A.C., Quinn, S.R., Manley, P.W., and Hughes, T.P. (2006). OCT-1-mediated influx is a key determinant of the intracellular uptake of imatinib but not nilotinib (AMN107): reduced OCT-1 activity is the cause of low in vitro sensitivity to imatinib. *Blood* 108, 697-704.
517. White, D.L., Saunders, V.A., Dang, P., Frede, A., Eadie, L., Soverini, S., and al., e. (2008). CML Patients with Low OCT-1 Activity Achieve Better Molecular Responses on High Dose Imatinib Than on Standard Dose. Those with High OCT-1 Activity Have Excellent Responses on Either Dose: A TOPS Correlative Study. *ASH Annual Meeting Abstracts*, 112: 3187.
518. Widmer, N., Rumpold, H., Untergasser, G., Fayet, A., Buclin, T., and Decosterd, L.A. (2007). Resistance reversal by RNAi silencing of MDR1 in CML cells associated with increase in imatinib intracellular levels. *Leukemia* 21, 1561-1562; author reply 1562-1564.
519. Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates, J.R., 3rd, and Nusse, R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423, 448-452.
520. Wilson, A., Laurenti, E., Oser, G., van der Wath, R.C., Blanco-Bose, W., Jaworski, M., Offner, S., Dunant, C.F., Eshkind, L., Bockamp, E., et al. (2008). Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* 135, 1118-1129.
521. Wong, K.F., So, C.C., and Kwong, Y.L. (1999a). Chronic myelomonocytic leukemia with t(7;11)(p15;p15) and NUP98/HOXA9 fusion. *Cancer genetics and cytogenetics* 115, 70-72.
522. Wong, K.F., So, C.C., and Kwong, Y.L. (1999b). Chronic myelomonocytic leukemia with t(7;11)(p15;p15) and NUP98/HOXA9 fusion. *Cancer genetics and cytogenetics* 115, 70-72.
523. Xie, S., Wang, Y., Liu, J., Sun, T., Wilson, M.B., Smithgall, T.E., and Arlinghaus, R.B. (2001). Involvement of Jak2 tyrosine phosphorylation in Bcr-Abl transformation. *Oncogene* 20, 6188-6195.
524. Xinh, P.T., Tri, N.K., Nagao, H., Nakazato, H., Taketazu, F., Fujisawa, S., Yagasaki, F., Chen, Y.Z., Hayashi, Y., Toyoda, A., et al. (2003). Breakpoints at 1p36.3 in three MDS/AML(M4) patients with t(1;3)(p36;q21) occur in the first intron and in the 5' region of MEL1. *Genes Chromosomes Cancer* 36, 313-316.
525. Yaseen, N.R., and Blobel, G. (1997). Cloning and characterization of human karyopherin beta3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 4451-4456.
526. Yassin, E.R., Sarma, N.J., Abdul-Nabi, A.M., Dombrowski, J., Han, Y., Takeda, A., and Yaseen, N.R. (2009). Dissection of the transformation of primary human hematopoietic cells by the oncogene NUP98-HOXA9. *PloS one* 4, e6719.
527. Yin, L., and Kufe, D. (2011). Muc1-C Oncoprotein Blocks Terminal Differentiation of Cml Cells by a Ros-Mediated Mechanism. *Genes Cancer* 2, 56-64.
528. Yin, L., Velazquez, O.C., and Liu, Z.J. (2010). Notch signaling: emerging molecular targets for cancer therapy. *Biochemical pharmacology* 80, 690-701.
529. Yin, L., Wu, Z., Avigan, D., Rosenblatt, J., Stone, R., Kharbanda, S., and Kufe, D. (2011). MUC1-C oncoprotein suppresses reactive oxygen species-induced terminal differentiation of acute myelogenous leukemia cells. *Blood* 117, 4863-4870.
530. Yong, A.S., and Melo, J.V. (2009). The impact of gene profiling in chronic myeloid leukaemia. *Best practice & research Clinical haematology* 22, 181-190.
531. Yoshida, M., Nosaka, K., Yasunaga, J., Nishikata, I., Morishita, K., and Matsuoka, M. (2004). Aberrant expression of the MEL1S gene identified in association with hypomethylation in adult T-cell leukemia cells. *Blood* 103, 2753-2760.
532. Young, B.D., Ferguson-Smith, M.A., Sillar, R., and Boyd, E. (1981). High-resolution analysis of human peripheral lymphocyte chromosomes by flow cytometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 7727-7731.
533. Yuan, Y., Zhou, L., Miyamoto, T., Iwasaki, H., Harakawa, N., Hetherington, C.J., Burel, S.A., Lagasse, E., Weissman, I.L., Akashi, K., et al. (2001). AML1-ETO expression is directly involved in the development of acute myeloid leukemia in the presence of additional mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 10398-10403.

534. Yuan, Z.M., Shioya, H., Ishiko, T., Sun, X., Gu, J., Huang, Y.Y., Lu, H., Kharbanda, S., Weichselbaum, R., and Kufe, D. (1999). p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature* 399, 814-817.
535. Zeisig, B.B., Milne, T., Garcia-Cuellar, M.P., Schreiner, S., Martin, M.E., Fuchs, U., Borkhardt, A., Chanda, S.K., Walker, J., Soden, R., *et al.* (2004). Hoxa9 and Meis1 are key targets for MLL-ENL-mediated cellular immortalization. *Molecular and cellular biology* 24, 617-628.
536. Zelent, A., Greaves, M., and Enver, T. (2004). Role of the TEL-AML1 fusion gene in the molecular pathogenesis of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Oncogene* 23, 4275-4283.
537. Zhang, D.E., Fujioka, K., Hetherington, C.J., Shapiro, L.H., Chen, H.M., Look, A.T., and Tenen, D.G. (1994). Identification of a region which directs the monocytic activity of the colony-stimulating factor 1 (macrophage colony-stimulating factor) receptor promoter and binds PEBP2/CBF (AML1). *Molecular and cellular biology* 14, 8085-8095.
538. Zhang, S.J., Ma, L.Y., Huang, Q.H., Li, G., Gu, B.W., Gao, X.D., Shi, J.Y., Wang, Y.Y., Gao, L., Cai, X., *et al.* (2008a). Gain-of-function mutation of GATA-2 in acute myeloid transformation of chronic myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 2076-2081.
539. Zhang, S.J., Shi, J.Y., and Li, J.Y. (2009). GATA-2 L359 V mutation is exclusively associated with CML progression but not other hematological malignancies and GATA-2 P250A is a novel single nucleotide polymorphism. *Leukemia research* 33, 1141-1143.
540. Zhang, W., Glockner, S.C., Guo, M., Machida, E.O., Wang, D.H., Easwaran, H., Van Neste, L., Herman, J.G., Schuebel, K.E., Watkins, D.N., *et al.* (2008b). Epigenetic inactivation of the canonical Wnt antagonist SRY-box containing gene 17 in colorectal cancer. *Cancer research* 68, 2764-2772.
541. Zhang, Y., and Rowley, J.D. (2006). Chromatin structural elements and chromosomal translocations in leukemia. *DNA repair* 5, 1282-1297.
542. Zhao, C., Blum, J., Chen, A., Kwon, H.Y., Jung, S.H., Cook, J.M., Lagoo, A., and Reya, T. (2007). Loss of beta-catenin impairs the renewal of normal and CML stem cells in vivo. *Cancer cell* 12, 528-541.
543. Zhao, C., Chen, A., Jamieson, C.H., Fereshteh, M., Abrahamsson, A., Blum, J., Kwon, H.Y., Kim, J., Chute, J.P., Rizzieri, D., *et al.* (2009). Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature* 458, 776-779.
544. Zhu, J., and Emerson, S.G. (2002). Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene* 21, 3295-3313.
545. Zhu, Q.S., Heisterkamp, N., and Groffen, J. (1990). Unique organization of the human BCR gene promoter. *Nucleic Acids Res* 18, 7119-7125.
546. Zippelius, A., Gati, A., Bartnick, T., Walton, S., Odermatt, B., Jaeger, E., Dummer, R., Urosevic, M., Filonenko, V., Osanai, K., *et al.* (2007). Melanocyte differentiation antigen RAB38/NY-MEL-1 induces frequent antibody responses exclusively in melanoma patients. *Cancer Immunol Immunother* 56, 249-258.

ANNEXE

Article publié: Hazourli et al., Genes, Chromosomes and Cancer 2006

LETTER TO THE EDITORS

Overexpression of *PRDM16* in the Presence and Absence of the *RUNX1/PRDM16* Fusion Gene in Myeloid Leukemias**To the Editors:**

In a recent study published in *Genes, Chromosomes & Cancer*, Sakai et al. (2005) reported the identification of a novel *RUNX1* partner gene, *MDS1/EVI1*-like gene 1 (*PRDM16*), in a patient with acute myeloid leukemia (AML) M4 with the t(1;21) translocation. This fusion gene has also been described recently in a case of t(1;21) positive therapy-related AML (Stevens-Kroef et al., 2006). The t(1;21)(p36;q22) is a rare but recurrent translocation associated with de novo and therapy-related AML and with myelodysplastic syndromes (MDS).

We, here, describe the first case of chronic myeloid leukemia (CML) blast crisis cells in which the *RUNX1/PRDM16* fusion gene likely contributed to clonal evolution from CML to AML. A 59-year-old woman was referred in July 2000 for a CML. Cytogenetic analysis showed 46,XX,t(9;22)(q34.1;q11.2) in 20 metaphases (UPN 00-H59). She was treated initially with IFN for 20 months with a minor cytogenetic response and then with imatinib mesylate. After 6 months of imatinib, she developed a blastic transformation with 68% blast cells in the peripheral blood. Cells were obtained after an informed consent. Conventional G-banding karyotype showed a possible deletion at band 21q22 in addition to the t(9;22) in all metaphases. Spectral karyotyping of these cells revealed a t(1;21) translocation in addition to the t(9;22) translocation (UPN 02-H056)(Fig. 1A and 1B). The t(1;21) translocation was not present in chronic phase cells isolated from this patient. Fluorescence in situ hybridization (FISH) experiments were performed on peripheral blood metaphases of the blast phase cells using bacterial artificial chromosomes (BACs) and P1-derived artificial chromosomes (PACs) clones obtained from the BACPAC Resource Center (Children's Hospital Oakland Research Institute in Oakland, California, <http://bacpac.chori.org/home.htm>). Clone physical positions and covered genes are available at the UCSC Human Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>). The *RUNX1* gene located at band 21q22.12 was first studied using two selected BACs, RP11-771C10 (containing intron 6 to exon 8 and the 3' end of *RUNX1*) and RP11-299D9 (containing intron 1 to exon 8

and the 3' end of *RUNX1*). Split signals were observed with BAC RP11-299D9 (Fig. 1C). The candidate gene, *PRDM16*, located at band 1p36.32 was studied using two PACs, RP1-163G9 (containing the 5' end of *PRDM16*, exon 1 and intron 1) and RP4-785P20 (containing intron 3 to exon 17 of *PRDM16*) and the BAC RP11-659J6 (containing part of intron 1, exons 2 and 3, part of intron 3 of *PRDM16*). A split signal was detected using PAC RP1-163G9, indicating that the breakpoint was in intron 1 of *PRDM16* (Fig. 1D). On the basis of the results of the FISH studies, we designed PCR primers covering most exons of *RUNX1* in both directions (forward and reverse), and for *PRDM16* in exon 1 (forward), exons 2–4 (reverse) to assess the expression of *PRDM16/RUNX1* and *RUNX1/PRDM16* fusion products. RT-PCR analysis and sequencing of the amplicons revealed eight *RUNX1/PRDM16* transcripts joining *RUNX1* exons 5 or 6 and *PRDM16* exons 2 or 3. Two *RUNX1/PRDM16* cDNAs represented an open reading frame encoding exons 1–5 or exons 1–6 of the *RUNX1* gene containing the RUNT domain fused to exon 2 of *PRDM16* that contain the PR domain (Fig. 2). However, the reciprocal *PRDM16/RUNX1* fusion transcript was not detected. We analyzed the relative expression levels of *PRDM16* using real-time PCR (ABI Prism 7900HT Sequence Detection System) in our CML case at the time of chronic phase (UPN 00-H59) and blast crisis (UPN 02-H056), and we compared *PRDM16* transcript levels in this case to a series of 88 other myeloid malignancies without evident karyotypic abnormalities of chromosomal band 1p36.3 (including 4 CML-blast crisis derived cell lines, 6 CML blast crisis samples, 14 MDS and MDS transformed to AML samples, and 68 AML samples of different morphological and cytogenetic groups). The Ct (threshold cycle) values of *PRDM16* were normalized to an endogenous control gene (*GAPDH*)

* Received 31 March 2006; Accepted 10 July 2006
DOI 10.1002/gcc.20370
Published online 9 August 2006 in
Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

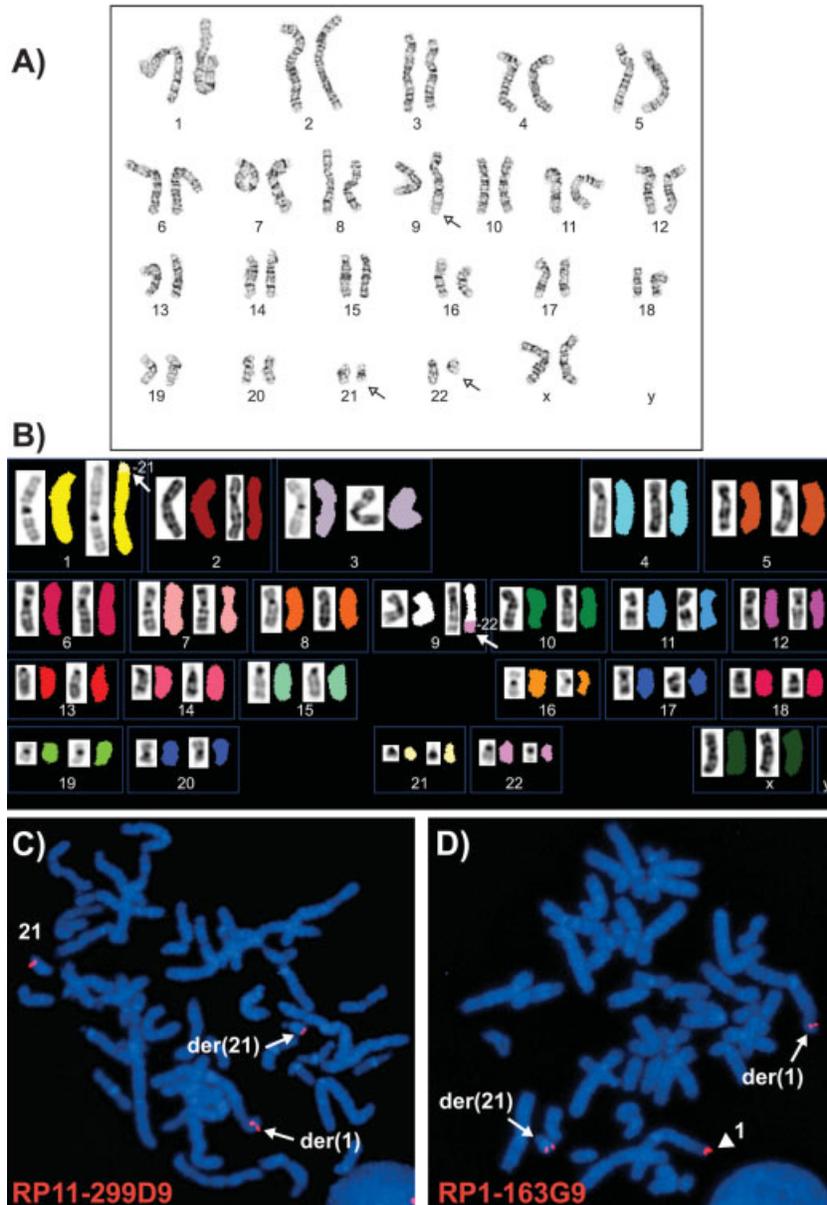


Figure 1. (A) Standard cytogenetic analysis of leukemic cells with the $t(9;22)(q34.1;q11.2)$ and $?del(21)(q22)$ (UPN 02H056). (B) Spectral karyotype of leukemic cells with the $t(9;22)(q34.1;q11.2)$ and $t(1;21)(p36.32;q22)$ (UPN 02H056). (C) FISH on metaphases with the $t(1;21)(p36.32;q22)$ (UPN 02H056) using the *RUNX1* probe (BAC RP11-299D9) that shows one signal on the normal chromosome 21 and a split

signal on the rearranged *der(1)* and *der(21)* (long arrows). (D) FISH on metaphases with the $t(1;21)(p36.32;q22)$ (UPN 02H056) using the *PRDM16* probe (PAC RP1-163G9) that shows one signal on the normal chromosome 1 (short arrow) and a split signal on the *der(1)* and *der(21)* (long arrows).

$(\Delta Ct = Ct_{PRDM16} - Ct_{GAPDH})$ and compared with a calibrator sample, using the $\Delta\Delta Ct$ method ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{Sample} - \Delta Ct_{Calibrator}$). The human *GAPDH* predeveloped TaqMan[®] assay (PN4326317E) was used as the endogenous control. As the calibrator, we used the average Ct value in four normal bone marrow samples. *PRDM16* expression was quantified with an assay targeting exons 9 and 10 (Hs00922679_m1, ABI). An additional assay targeting exons 1 and 2 was performed in case UPN 02-

H056 to discriminate between the level of expression of the normal *PRDM16* gene and the fused *PRDM16* (that does not contain exon 1 of *PRDM16*). High *PRDM16* expression was found in the CML blast crisis cells isolated from our patient when oligonucleotides specific for exons 9–10 were used (Fig. 3). In contrast, primers specific for cDNA sequences derived from exon 1 did not detect *PRDM16* expression although they could amplify material from control cells, indicating that the over-

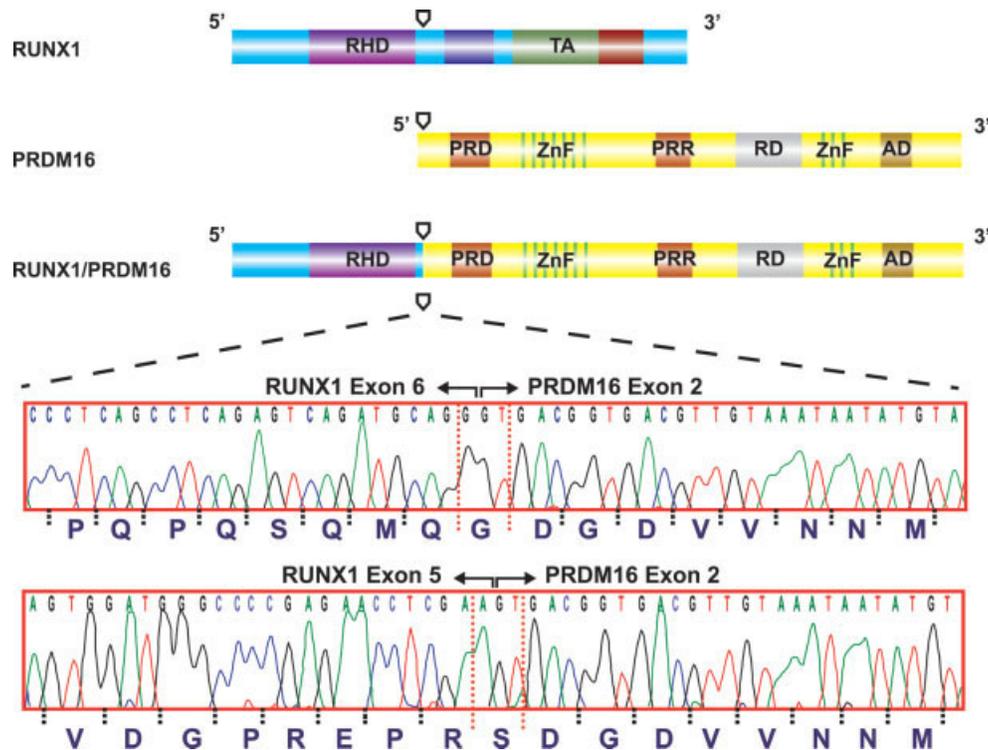


Figure 2. Schematic representation of RUNX1 and PRDM16 wild-type proteins and the putative chimeric protein RUNX1/PRDM16. Partial nucleotide and amino acid sequences of the two RUNX1/PRDM16 in-frame fusions. Arrows indicate the t(1;21) breakpoints. RHD, runt homology domain; TA, transactivation domain; PRD, PR domain; ZnF, zinc finger domain; PRR, proline-rich domain; RD, repressor domain; AD, acidic domain.

expression was specific to the fused *PRDM16* transcript and excluded up-regulation of the unarranged allele (data not shown). Interestingly, a significant overexpression of *PRDM16* (mRNA levels more than

10-fold above value detected in normal bone marrow control cells) was detected in 17 other myeloid samples of different morphological types, including one CML in blastic phase (CML-BP), UPN 06-H006 (Fig. 3). The *RUNX1-PRDM16* fusion gene was not detected by FISH in these cases and experiments are currently being performed to detect other possible cryptic *PRDM16* rearrangements. The *PRDM16* gene was not expressed in the MC3 CML-BP cell line (kindly provided by Dr. C. Gambacorti-Passerini) that was shown to have an unbalanced t(1;21) translocation detected by M-FISH (Gribble et al., 2003). FISH studies also failed to reveal a *RUNX1-PRDM16* fusion in this cell line. In contrast, *PRDM16* expression was down-regulated not only in favorable-risk AML (t(8;21), t(15;17), and inv(16)), as previously reported (Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani et al., 2003) but also in leukemias with *MLL* (11q23) translocations.

In this study, we describe a patient with CML who acquired a t(1;21)(p36;q22) translocation during the course of disease progression. Despite the frequent association of additional genetic abnormalities in the acute phase of CML, the molecular events leading to the transition from the chronic phase to the blast crisis remain poorly understood. Chromosomal translocations are infrequent secondary abnormalities in CML blast crisis. Indeed, the t(7;11)(p15;p15) has been described in less than 1% of myeloid blast crisis and the t(3;21)(q26;q22) in ~2%. Nevertheless, the chimeric genes associated with these translocations, *NUP98/HOXA9* (Mayotte et al., 2002) and *AML1/MDS1/EVI1* (Cuenco and Ren, 2001), respectively, have been shown to be important in the pathogenesis of CML progression. The hematopoietic transcription factor *RUNX1* (*AML1*) is one of the most frequent target genes involved in leukemias. Numerous fusion partners of this gene have been identified in chromosomal translocations. In the blastic phase of CML, *RUNX1* has already been involved in rare cases of t(8;21)(q22;q22) and in t(3;21)(q26;q22). Here, we have identified

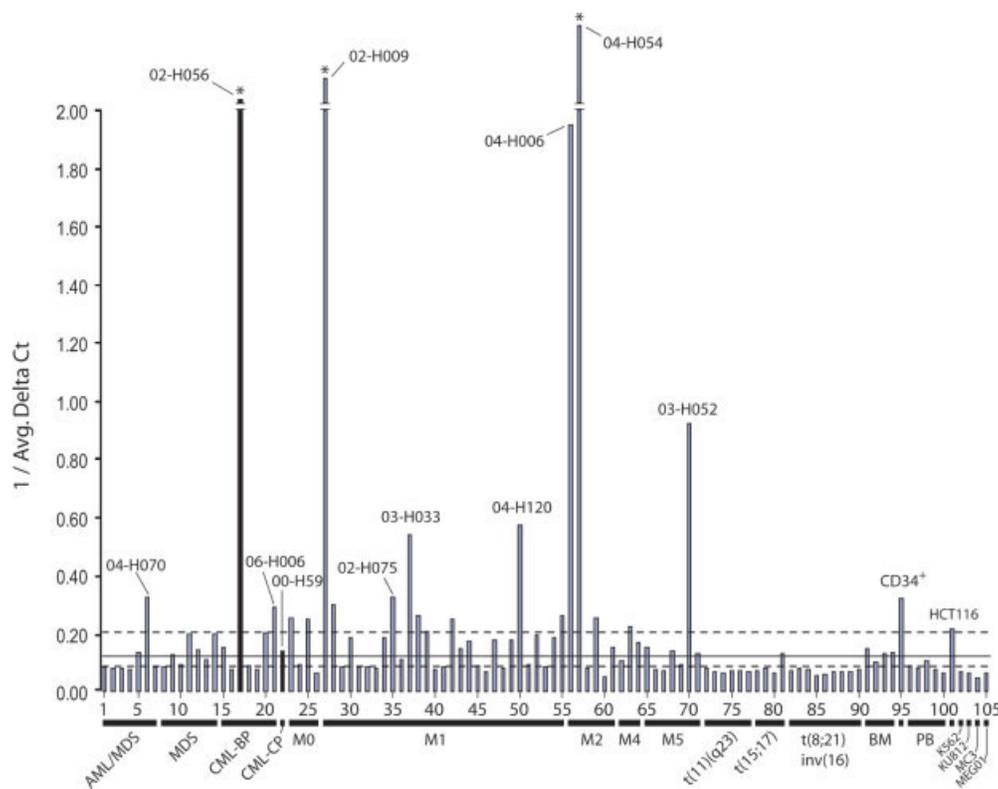


Figure 3. Expression analysis of *PRDM16* (exons 9 and 10) using real-time PCR in 105 samples: 4 normal bone marrow (BM) samples, CD34 isolated from normal bone marrow (CD34+), 5 normal peripheral blood (PB) samples, one colon carcinoma cell line (HCT116), 4 CML-BP derived cell lines: K562, KU812, MC3, MEG01, 14 MDS and MDS/AML, 7 CML-BP (including present case with t(1;21), 02-H056), present CML case in chronic phase (CML-CP; 00-H59), 68 AML (FAB type: M0, M1, M2, M4, M5 of different cytogenetic groups and AML with t(11)(q23), t(15:17), and t(8:21) and with inv(16)). All samples were

tested in duplicate and the average values were used for quantification. The graph shows ratios of $1/\Delta Ct$. The horizontal gray line indicates the average ratio in the four normal bone marrow samples (calibrator) and the horizontal dotted lines indicate an arbitrary $1/\Delta Ct$ ratio of 0.21 and 0.09 for significant up or down-regulation respectively (or mRNA levels more than 10-fold above or under value detected in normal BM control cells). ΔCt values are: 04-H070: 3.1; 02-H056: 0.3; 06-H006: 3.4; 00-H59: 7.3; 02-H009: 0.2; 02-H075: 3.1; 03-H033: 1.9; 04-H120: 1.7; 04-H006: 0.5; 04-H054: -2.2; 03-H052: 1.1; Average normal BM: 8.0.

PRDM16 as another fusion partner of *RUNX1* in advanced CML. The *PRDM16* gene (also known as *MEL1*), encodes a zinc finger transcription factor highly similar to MDS1/EV11, a member of the PR-domain family involved in leukemogenesis. *PRDM16* was isolated as a gene transcriptionally activated by the t(1;3)(p36;q21) in cells from patients suffering of MDS and AML (Mochizuki et al., 2000). *PRDM16* belongs to a family of proteins containing a PR domain (PRDI-BF1-RIZ1 homologous region) that is related to the SET domain and may be involved in the regulation of chromatin-mediated gene expression as a protein-binding interface. As for some other PR domain members, two alternative splicing forms of *PRDM16* are expressed, although at a relatively low level in normal hematopoietic cells (Lahortiga et al., 2004). The longer form, *MEL1*, is similar to *MDS1/EV11*, an alternative splicing between *MDS1* and *EV11* containing the PR domain at the amino-terminus, whereas the shorter form, *ELI* or

MELIS, is comparable to *EV11* without the PR domain (Nishikata et al., 2003). Two opposite functions, depending on the presence or absence of the PR domain, have been suggested for some members of the PR domain family genes. The PR containing forms contribute to tumor suppression, while the PR-absent forms are oncogenic (Jiang and Huang, 2000). The *RUNX1/PRDM16* fusion in our case shares a high degree of sequence similarity with the *AML1/MDS1/EV11* (AME) fusion, including the presence of the RUNT domain of *RUNX1*, the PR domain, and the two zinc finger DNA binding domains of *PRDM16*, suggesting a similar molecular mechanism of leukemogenesis (Fig. 2). The abnormal *RUNX1* fusion proteins may mediate the aberrant recruitment of transcriptional corepressors leading to gene expression deregulation. Aberrant oligomerization may also contribute to the oncogenic activity of AME by the inappropriate recruitment of HDAC and CtBP corepressors, resulting in the transcriptional repres-

sion of *RUNX1* target genes and the repression of transforming growth factor- β -mediated growth inhibitory signaling (Nitta et al., 2005; Senyuk et al., 2005). The *RUNX1/PRDM16* fusion gene may also lead to the inappropriate expression of *PRDM16* driven by the *RUNX1* promoter contributing to the blastic transformation in our CML case. Interestingly, the translocation breakpoint in t(1;21) in the three patients published thus far (including one in this report), is in the same region as the retroviral integration site at mouse *Prdm16* locus in immortalized immature myeloid progenitor cell lines. This retroviral integration promotes the expression of *Prdm16* lacking the PR-domain (Du et al., 2005). This recently published study identified *Prdm16* as a gene potentially involved in immortalization.

Our data suggested that the *RUNX1/PRDM16* fusion gene may play an important role in CML progression possibly contributing to immortalization of the leukemic stem cell. Since the t(1;21) translocation is difficult to detect by conventional cytogenetics, the *RUNX1/PRDM16* fusion gene may likely be underestimated in myeloid leukemia. Moreover, considering the significant proportion of myeloid malignancies with *PRDM16* overexpression in the absence of the *RUNX1-PRDM16* fusion gene in our study, the deregulation of *PRDM16* by other molecular mechanisms may play a larger role in myeloid leukemogenesis.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Guy Sauvageau, Giovanni D'Angelo, Claude Rondeau, affiliated hematologists, and other members of the Leukemia Cell Bank of Quebec for their contribution.

Sawcène Hazourli,¹ Pierre Chagnon,²
Martin Sauvageau,² Raouf Fetni,¹
Lambert Busque,¹ and Josée Hébert^{1,2*}

¹Leukemia Cell Bank of Quebec, Guy Bernier
Research Center, Maisonneuve-Rosemont
Hospital, Montreal, QC, Canada

²Institute for Research in Immunology
and Cancer, University of Montreal,
Montreal, QC, Canada

REFERENCES

- Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, Lowenberg B, Delwel R. 2003. Low expression of MDS1-EV11-like-1 (MEL1) and EV11-like-1 (EL1) genes in favorable-risk acute myeloid leukemia. *Exp Hematol* 31:1066–1072.
- Cuenca GM, Ren R. 2001. Cooperation of BCR-ABL and AML1/MDS1/EV11 in blocking myeloid differentiation and rapid induction of an acute myelogenous leukemia. *Oncogene* 20:8236–8248.
- Du Y, Jenkins NA, Copeland NG. 2005. Insertional mutagenesis identifies genes that promote the immortalization of primary bone marrow progenitor cells. *Blood* 106:3932–3939.
- Gribble SM, Reid AG, Roberts I, Grace C, Green AR, Nacheva EP. 2003. Genomic imbalances in CML blast crisis: 8q24.12-q24.13 segment identified as a common region of over-representation. *Genes Chromosomes Cancer* 37:346–358.
- Jiang GL, Huang S. 2000. The yin-yang of PR-domain family genes in tumorigenesis. *Histol Histopathol* 15:109–117.
- Lahortiga I, Agirre X, Belloni E, Vazquez I, Larrayoz MJ, Gasparini P, Lo Coco F, Pelicci PG, Calasanz MJ, Otero MD. 2004. Molecular characterization of a t(1;3)(p36;q21) in a patient with MDS. MEL1 is widely expressed in normal tissues, including bone marrow, and it is not overexpressed in the t(1;3) cells. *Oncogene* 23:311–316.
- Mayotte N, Roy DC, Yao J, Kroon E, Sauvageau G. 2002. Oncogenic interaction between BCR-ABL and NUP98-HOXA9 demonstrated by the use of an in vitro purging culture system. *Blood* 100:4177–4184.
- Mochizuki N, Shimizu S, Nagasawa T, Tanaka H, Taniwaki M, Yokota J, Morishita K. 2000. A novel gene, MEL1, mapped to 1p36.3 is highly homologous to the MDS1/EV11 gene and is transcriptionally activated in t(1;3)(p36;q21)-positive leukemia cells. *Blood* 96:3209–3214.
- Nishikata I, Sasaki H, Iga M, Tateno Y, Imayoshi S, Asou N, Nakamura T, Morishita K. 2003. A novel EV11 gene family, MEL1, lacking a PR domain (MEL1S) is expressed mainly in t(1;3)(p36;q21)-positive AML and blocks G-CSF-induced myeloid differentiation. *Blood* 102:3323–3332.
- Nitta E, Izutsu K, Yamaguchi Y, Imai Y, Ogawa S, Chiba S, Kurokawa M, Hirai H. 2005. Oligomerization of EV11 regulated by the PR domain contributes to recruitment of corepressor CtBP. *Oncogene* 24:6165–6173.
- Sakai I, Tamura T, Narumi H, Uchida N, Yakushijin Y, Hato T, Fujita S, Yasukawa M. 2005. Novel RUNX1-PRDM16 fusion transcripts in a patient with acute myeloid leukemia showing t(1;21)(p36;q22). *Genes Chromosomes Cancer* 44:265–270.
- Senyuk V, Li D, Zakharov A, Mikhail FM, Nucifora G. 2005. The distal zinc finger domain of AML1/MDS1/EV11 is an oligomerization domain involved in induction of hematopoietic differentiation defects in primary cells in vitro. *Cancer Res* 65:7603–7611.
- Stevens-Kroef MJ, Schoenmakers EF, van Kraaij M, Huys E, Vermeulen S, van der Reijden B, van Kessel AG. 2006. Identification of truncated RUNX1 and RUNX1-PRDM16 fusion transcripts in a case of t(1;21)(p36;q22)-positive therapy-related AML. *Leukemia* 20:1187–1189.