

Université de Montréal

**Études des leucémies de l'enfant induites par les oncogènes de fusion
NUP98::KDM5A et *CBFA2T3::GLIS2***

Par

Mathieu Roussy

Faculté de médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur en sciences biomédicales

Option : médecine expérimentale

Décembre 2023

© Mathieu Roussy, 2023

Université de Montréal

Faculté de médecine

Cette thèse intitulée

**Études des leucémies de l'enfant induites par les oncogènes de
fusion *NUP98::KDM5A* et *CBFA2T3::GLIS2***

Présentée par

Mathieu Roussy

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Julie Lessard

Présidente

Sonia Cellot

Directrice de recherche

Gilles Hickson

Membre du jury

Krista Heinonen

Examinatrice externe

I. Résumé

La leucémie myéloïde aiguë (LMA) est une maladie hétérogène sur le plan génétique et représente environ 20% des leucémies pédiatriques. Les taux de survie varient selon les sous-types mais sont particulièrement défavorables pour les leucémies aiguës mégacaryoblastiques (AMKL), un sous-type rare de LMA touchant généralement les enfants de moins de 3 ans ($\leq 30\%$ de survie pour certains sous-types d'AMKL). En pédiatrie, les réarrangements génétiques entraînant l'expression d'un gène de fusion chimérique sont présentes dans un grand nombre de cas et sont considérées comme des événements initiateurs à l'origine de la leucémie. Chez les leucémies de type AMKL, c'est plus de 70% des cas qui présentent un tel réarrangement. Quelques-uns de ces transcrits chimériques, tels que *NUP98::KDM5A* et *CBFA2T3::GLIS2*, surviennent dans une plus grande proportion des cas.

Dans le cadre de mes recherches, l'analyse du transcriptome de leucémies pédiatriques nous ont permis de mettre en évidence de nouveaux transcrits chimériques. Notamment, nous avons découvert *BPTF* comme étant un nouveau partenaire de fusion de *NUP98* dans le cas d'une AMKL, ainsi que la fusion *ACIN1::NUTM1* chez des leucémies lymphoïdes à cellules B. Ces travaux ont permis de raffiner la classification moléculaire de ces leucémies et propose de nouvelles approches pour le diagnostic et le suivi de la maladie.

L'hypothèse de ma thèse est que les fusions *NUP98::KDM5A* et *CBFA2T3::GLIS2* sont oncogéniques et leur expression chez des cellules souches hématopoïétiques et progénitrices humaines normales entraîne une transformation en leucémie aiguë mégacaryoblastique dans les souris receveuses immunodéficientes, permettant de générer des modèles de xénogreffe.

Mes travaux ont contribué à la génération de modèles d'AMKL arborant les fusions *NUP98::KDM5A* ainsi que *CBFA2T3::GLIS2*. Pour ce faire, nous avons optimisé un processus de transduction de ces gènes chimériques chez des cellules CD34+ isolées de sang de cordon, suivi de transplantation chez la souris immunodéficiente. Ces modèles de xénogreffe récapitulent la leucémie des patients aux points de vue morphologique, immunophénotypique et transcriptomique. Ces modèles synthétiques d'AMKL peuvent être transplantés de manière

sérialisée en souris et présentent une fréquence élevée de cellules souches leucémiques. De plus, nous avons aussi développé un modèle pdx unique (patient derived xenograft) dérivé des cellules primaires d'un patient atteint d'une leucémie AMKL présentant la fusion *NUP98::BPTF*. Ces modèles synthétiques et pdx ont ensuite servi de substrats à mes expériences ainsi que celles de plusieurs membres du laboratoire.

Mes recherches ont permis d'identifier et de caractériser de nouveaux biomarqueurs spécifiques aux AMKL présentant un transcrite de *NUP98* réarrangé et *CBFA2T3::GLIS2*. Tirant avantage de la biomasse générée par ces modèles de leucémie AMKL, nous avons fait des études transcriptomiques et protéomiques de la surface membranaire de nos modèles. Ces résultats furent comparés aux cellules normales isolées de sang de cordon afin d'identifier plusieurs protéines de surface spécifiques aux leucémies initiées par *NUP98* réarrangé et *CBFA2T3::GLIS2* afin de mettre en lumière de nouveaux biomarqueurs potentiels.

De plus, nous avons aussi confirmé la sensibilité de nos modèles AMKL aux inhibiteurs de la voie JAK-STAT ainsi que démontré l'induction synergique de l'apoptose de nos modèles en présence des inhibiteurs combinés des voies JAK-STAT et PI3K-AKT-mTOR.

Finalement, puisque la recherche sur les AMKL est ralentie par la quantité limitante d'échantillons de patient, les modèles humains et les données moléculaires présentés dans cette thèse constituent une ressource inestimable afin d'accélérer la recherche translationnelle pour ces leucémies à haut risque.

Mots-clés : Leucémie, mégacaryoblastique, *NUP98::KDM5A*, *NUP98::BPTF*, *CBFA2T3::GLIS2*, Biomarqueurs, JAK-STAT, PI3K-AKT-mTOR, Outils diagnostic, vulnérabilités thérapeutiques

II. Abstract

Acute myeloid leukemia (AML) is a genetically heterogeneous disease and represents about 20% of pediatric leukemias. Survival rates vary depending on subtypes but are particularly unfavorable for acute megakaryoblastic leukemia (AMKL), a rare subtype of AML that usually affects children under 3 years old ($\leq 30\%$ survival for certain subtypes of AMKL). In pediatrics, genetic rearrangement leading to the expression of a chimeric fusion gene are present in many cases and are considered initiator events in the development of leukemia. In AMKL cases, more than 70% of them exhibit such rearrangement. Several of these chimeric transcripts, such as *NUP98::KDM5A* and *CBFA2T3::GLIS2*, occur in a higher proportion of cases.

The analysis of the transcriptome from pediatric leukemic cases allowed us to identify new chimeric fusion transcripts in pediatric leukemias. Specifically, we discovered *BPTF* as a new fusion partner of *NUP98* in the case of acute megakaryoblastic leukemia (AMKL), and the *ACIN1::NUTM1* fusion in B-cell lymphoid leukemias. These studies have refined the molecular classification of these leukemias and provided tools for diagnosis and disease monitoring.

The hypothesis of my thesis is that the *NUP98::KDM5A* and *CBFA2T3::GLIS2* fusions are oncogenic and their expression in normal human hematopoietic and progenitor cells leads to transformation into acute megakaryoblastic leukemia in immunodeficient recipient mice, allowing for the generation of renewable xenograft models.

My work has contributed to the generation of AMKL models with *NUP98::KDM5A* (N5A) and *CBFA2T3::GLIS2* (CG2) fusions. To do this, we optimized a pipeline for transducing these chimeric genes in CD34+ cells isolated from cord blood, followed by transplantation into immunodeficient mice. These xenograft models phenocopy the leukemia of patients from a morphological, immunophenotypic, and transcriptomic standpoint. These synthetic AMKL models can be serially transplanted into mice and have a high frequency of leukemic stem cells. I also contributed to the development of a unique patient-derived xenograft (PDX) model derived from primary cells of a patient with an *NUP98::BPTF* genotype AMKL leukemia. These synthetic and PDX models then served as substrates for my experiments and those of several members of our laboratory.

My research has allowed us to identify and characterize new biomarkers specific to *NUP98*-rearranged and *CBFA2T3::GLIS2* positive AMKL. Taking advantage of the biomass generated by these AMKL leukemia models, we conducted transcriptomic and proteomic studies of the membrane surface. These results were compared to normal cells isolated from cord blood to identify several surface proteins specific to each leukemia genotype and shed light on new potential biomarkers.

Furthermore, we confirmed the sensitivity of our AMKL models to JAK-STAT pathway inhibitors and performed synergy assays between JAK-STAT and the PI3K-AKT-mTOR pathway inhibitors. These experiments demonstrated the synergistic induction of apoptosis in our models upon the combine exposure to JAK-STAT and PI3K-AKT-mTOR pathway inhibitors. These works allowed us to identify potential therapeutic vulnerabilities of AMKL.

Finally, since research on AMKL is affected by the limited number of patient samples, the human models and molecular data presented in this thesis constitute an invaluable resource to accelerate translational research for these high-risk leukemias.

Keywords : Leukemia, Megakaryoblastic, *NUP98::KDM5A*, *NUP98::BPTF*, *CBFA2T3::GLIS2*, Biomarker, JAK-STAT, PI3K-AKT-mTOR, Diagnostic tools, Therapeutic vulnerabilities

III. Table des matières

I.	RÉSUMÉ.....	5
II.	ABSTRACT.....	7
III.	TABLE DES MATIÈRES.....	9
IV.	Liste des tableaux.....	15
V.	Liste des figures.....	17
VI.	Liste des sigles et abréviations.....	21
VII.	Remerciements.....	29
1	INTRODUCTION.....	31
1.1	L'HÉMATOPOÏÈSE NORMALE CHEZ L'HUMAIN.....	31
1.1.1	Identification des caractéristiques des cellules souches hématopoïétiques.....	31
1.1.2	L'autorenouvellement des CSH.....	32
1.1.3	Les agonistes de l'autorenouvellement.....	33
1.1.4	Multipotence des CSH.....	35
1.1.5	L'ontogénie des CSH.....	40
1.1.6	Isolation des CSH humains.....	41
1.1.7	Régulation épigénétique des CSH.....	43
1.1.8	Les gènes HOX.....	45
1.1.9	Les gènes GATA1 et GATA2.....	46
1.2	LA LEUCÉMIE.....	47
1.2.1	La classification des leucémies.....	47
1.2.2	Les cellules souches leucémiques.....	50
1.2.3	La transformation leucémique.....	51
1.2.4	Les caractéristiques de la LSC.....	52
1.2.5	Les LAL.....	53
1.2.6	Les LMA pédiatriques.....	54
1.2.7	Les modèles leucémiques.....	57
1.3	LA TRANSFORMATION LEUCÉMIQUE ENGENDRÉE PAR KMT2AR, NUP98R ET CBFA3T3::GLIS2....	59
1.3.1	Mécanisme de génération des fusions.....	59

1.3.2	<i>Mécanisme de transformation de KMT2Ar</i>	62
1.3.3	<i>Les fusions du gène NUP98</i>	64
1.3.4	<i>La fusion CBFA2T3::GLIS2</i>	68
1.3.5	<i>Les rôles de CBFA2T3 et GLIS2 non fusionnés</i>	68
1.4	LE TRAITEMENT CIBLÉ DES LMA	71
1.4.1	<i>La voie JAK-STAT</i>	72
1.4.2	<i>La voie de mTOR et ces complexes</i>	74
1.5	CONTEXTE, HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE	79
1.5.1	<i>Le contexte</i>	79
1.5.2	<i>Hypothèse</i>	79
1.5.3	<i>Objectifs de recherche</i>	79
2	UTILISATION DU SÉQUENÇAGE DE L'ARN POUR L'IDENTIFICATION D'ONCOGÈNES DE FUSION QUI SONT CRYPTIQUES EN CYTOGÉNÉTIQUE CONVENTIONNELLE	81
2.1	PRÉFACE	81
2.1.1	<i>Contribution</i>	81
2.2	<i>NUP98-BPTF</i> GENE FUSION IDENTIFIED IN PRIMARY REFRACTORY ACUTE MEGAKARYOBLASTIC LEUKEMIA OF INFANCY	83
2.2.1	<i>Abstract</i>	85
2.2.2	<i>Introduction</i>	86
2.2.3	<i>Methods</i>	86
2.2.4	<i>Case report</i>	89
2.2.5	<i>Discussion</i>	95
2.2.6	<i>Acknowledgements</i>	97
2.3	CRYPTIC RECURRENT ACIN1-NUTM1 FUSIONS IN NON KMT2A-REARRANGED INFANT ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA	99
2.3.1	<i>Abstract</i>	101
2.3.2	<i>Introduction</i>	102
2.3.3	<i>Methods</i>	102
2.3.4	<i>Cases studied</i>	104
2.3.5	<i>Results</i>	104
2.3.6	<i>Discussion</i>	108
2.3.7	<i>Acknowledgments</i>	110
2.3.8	<i>Funding</i>	110

2.3.9	<i>Authorship Contributions</i>	110
2.3.10	<i>Disclosure of Conflicts of Interest</i>	110
2.3.11	<i>Data Availability Statement</i>	110
3	GÉNÉRATION ET CARACTÉRISATION DE MODÈLES HUMAINS DE LEUCÉMIES DE L'ENFANT INDUITES PAR L'ONCOGÈNE DE FUSION <i>NUP98::KDM5A</i>	111
3.1	PRÉFACE	111
3.1.1	<i>Contribution</i>	112
3.2	HUMAN MODELS OF <i>NUP98-KDM5A</i> MEGAKARYOCYTIC LEUKEMIA IN MICE CONTRIBUTE TO UNCOVER NEW BIOMARKERS AND THERAPEUTIC VULNERABILITIES	115
3.2.1	<i>Abstract</i>	117
3.2.2	<i>Introduction</i>	118
3.2.3	<i>Methods</i>	120
3.2.4	<i>Results</i>	122
3.2.5	<i>Discussion</i>	136
3.2.6	<i>Acknowledgments</i>	138
3.2.7	<i>Authorship:</i>	139
3.3	ANNEXE : ESSAIS DE MODÉLISATION D'UNE LEUCÉMIE EXPRIMANT LA FUSION <i>NUP98::BPTF</i>	141
3.3.1	<i>Introduction</i>	141
3.3.2	<i>Méthodes</i>	141
3.3.3	<i>Résultats et discussion</i>	142
4	GÉNÉRATION ET CARACTÉRISATION DE MODÈLES HUMAINS DE LEUCÉMIES DE L'ENFANT INDUITES PAR L'ONCOGÈNE DE FUSION <i>CBFA2T3::GLIS2</i>	149
4.1	PRÉFACE	149
4.1.1	<i>Contribution</i>	149
4.2	<i>CBFA2T3::GLIS2</i> PEDIATRIC ACUTE MEGAKARYOBLASTIC LEUKEMIA IS SENSITIVE TO BCL-X_L INHIBITION BY NAVITOCLOX AND DT2216	151
4.2.1	<i>Abstract</i>	153
4.2.2	<i>Introduction</i>	154
4.2.3	<i>Methods</i>	155
4.2.4	<i>Results</i>	157
4.2.1	<i>Discussion</i>	172
4.2.2	<i>Acknowledgements</i>	176

4.2.3	<i>Authorship contributions</i>	177
4.2.4	<i>Disclosure of conflicts of interest</i>	177
4.3	SUPPLEMENTAL MATERIAL	179
4.3.1	<i>Supplemental methods</i>	179
4.3.2	<i>Supplemental Figures</i>	193
5	IDENTIFICATION DES VULNÉRABILITÉS THÉRAPEUTIQUES DES LEUCÉMIES MÉGACARYOBLASTIQUES INDUITES PAR LES ONCOGÈNES CHIMÉRIQUES NUP98R ET CBFA2T3::GLIS2.	217
5.1	PRÉFACE	217
5.2	L'INHIBITION DES VOIES JAK-STAT ET PI3K-AKT-MTOR INDUIT L' APOPTOSE DE MANIÈRE SYNERGIQUE DE MODÈLES HUMAINS DE LEUCÉMIE MÉGACARYOBLASTIQUE	219
5.2.1	<i>Introduction</i>	219
5.2.2	<i>Matériels et méthodes</i>	220
5.2.3	<i>Résultats</i>	223
5.2.4	<i>Discussion</i>	232
6	DISCUSSION	235
6.1	LE DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE	235
6.1.1	<i>L'importance du diagnostic moléculaire en leucémie pédiatrique</i>	235
6.1.2	<i>L'avancement des technologies et les défis associés au diagnostic moléculaire</i>	236
6.2	LA GÉNÉRATION DE MODÈLES LEUCÉMIQUES.	238
6.2.1	<i>L'importance de la génération de modèles</i>	238
6.2.2	<i>Les modèles de leucémie synthétiques et dérivés de cellules de patients</i>	238
6.2.3	<i>Les caractéristiques recherchées lors de la génération d'un modèle leucémique</i>	239
6.2.4	<i>La pénétrance du phénotype leucémique suivant la transduction lentivirale</i>	241
6.2.5	<i>Les difficultés rencontrées lors de la génération de modèles synthétiques de leucémies</i>	244
6.3	LA CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DES MODÈLES LEUCÉMIQUES	247
6.3.1	<i>La caractérisation de nos leucémies a mis en évidence la voie JAK-STAT comme potentielle cible thérapeutique.</i>	247
6.3.2	<i>Les expériences de protéomique ont permis d'identifier de nouveaux biomarqueurs potentiels pour les leucémies AMKL</i>	248
6.4	LA THÉRAPIE CIBLÉE DES AMKL	249
6.4.1	<i>Identification de cibles thérapeutiques potentielles</i>	249

6.4.2	<i>L'évaluation de la sensibilité lors des essais de courbes doses-réponses.</i>	251
6.4.3	<i>L'interprétation des résultats de synergies.</i>	252
7	CONCLUSIONS	253
VIII.	ARTICLES ANNEXES	254
IX.	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	268

IV. Liste des tableaux

TABLEAU 1-1 - LISTE DES TENTATIVES DE MODÉLISATION DE LEUCÉMIE INDUITES PAR LES FUSIONS <i>NUP98::KDM5A</i> , <i>NUP98::BPTF</i> ET <i>CBFA2T3::GLIS2</i>	58
TABLEAU 3-1 : LISTE DES VARIANTS D'INTÉRÊT DÉTECTÉS PAR SÉQUENÇAGE DE L'EXOME DU MODÈLE AMKL PDXNTF.	147
TABLEAU 5-1 - VALEURS D'IC50	226
TABLEAU 5-2 - VALEURS DU SCORE SYNERGIQUE BLISS ENTRE DES INHIBITEURS DE LA VOIE JAK-STAT ET DE LA VOIE PI3K-AKT-MTOR	231

V. Liste des figures

FIGURE 1-1 - DIVISION SYMÉTRIQUE ET ASYMÉTRIQUE DES CELLULES SOUCHES HÉMATOPOIÉTIQUES.....	33
FIGURE 1-2 - DÉMONSTRATION DE LA CAPACITÉ DE MULTIPOTENCE DES CELLULES SOUCHES HÉMATOPOIÉTIQUES HUMAINES.....	36
FIGURE 1-3 - REPRÉSENTATION ACTUELLE DE L'HÉMATOPOIÈSE HUMAINE ÉMANANT DES ANALYSES DE TRANSCRIPTOMIQUE DE CELLULES INDIVIDUELLES.....	38
FIGURE 1-4 - LES MÉGACARYOCYTES MATURES SONT DE LARGES CELLULES POLYNUCLÉÉS.....	39
FIGURE 1-5 - LE NOMBRE ET LA PROPORTION DE CSH EST DIFFÉRENTES SELON LE TISSU.....	42
FIGURE 1-6 - MODÈLES «SINGLE HIT» ET «MULTI HITS» D'ÉVOLUTION DE LA LEUCÉMIE.....	52
FIGURE 1-7 - SCHÉMA DE LA STRUCTURE DE KMT2A.....	62
FIGURE 1-8 - REPRÉSENTATION DES COMPLEXES INTERAGISSANT AVEC KMT2A.....	63
FIGURE 1-9 - REPRÉSENTATION GRAPHIQUE DES DOMAINES PROTÉIQUES FORMANT LES FUSIONS NUP98.....	66
FIGURE 1-10 - LA PORTION N-TERMINAL DE NUP98, RETENUE CHEZ NUP98R, LUI PERMET DE S'ASSOCIER AVEC LE COMPLEXE NSL ET COMPASS DE KMT2A.....	67
FIGURE 1-11 - LES AMKL PRÉSENTENT UNE EXPRESSION GÉNIQUE DISTINCTIVE ENTRE LES DIFFÉRENTS SOUS-GROUPES.....	68
FIGURE 1-12 - REPRÉSENTATION LA FUSION CBFA2T3::GLIS2.....	70
FIGURE 1-13 - REPRÉSENTATION DES INTERACTIONS ENTRE L'AXE JAK2-STAT5 ET L'AXE PI3K-ATK-MTOR.....	77
FIGURE 2-1 - PHENOTYPIC AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF DIAGNOSTIC LEUKEMIA SAMPLE.....	90
FIGURE 2-2 - EXPRESSION OF MEGA-ERYTHROID MARKERS AND HOXA CLUSTER GENES IN NUP98-BPTF AMKL.....	92
FIGURE 2-3 - AMKL BONE MARROW CELLS EXPRESS TWO ISOFORMS OF <i>NUP98-BPTF</i> FUSION.....	94
FIGURE 2-4 - LACTATE DEHYDROGENASE (LDH) LEVELS CORRELATE WITH DISEASE PROGRESSION.....	95
FIGURE 2-5 - IDENTIFICATION OF ACIN1-NUTM1 FUSION TRANSCRIPTS IN INFANT ALL.....	105
FIGURE 2-6 - EXPRESSION OF NUTM1 GENE FUSION IN LEUKEMIC BONE MARROWS CELLS.....	107
FIGURE 3-1 OVEREXPRESSION OF NUP98-KDM5A EFFICIENTLY INDUCES MATURATION BLOCK AND SUSTAINS THE PROLIFERATIVE AND PROGENITOR CAPACITIES OF CB-CD34+ CELLS.....	125
FIGURE 3-2 : OVEREXPRESSION OF N5A FUSION IN CB-CD34+ CELLS INDUCES ACUTE MEGAKARYOBLASTIC LEUKEMIA AND MULTILINEAGE LEUKEMIA SUBTYPES IN XENOGRAFT MODELS.....	127
FIGURE 3-3 : DISTINCT EXPRESSION PROFILES OF NUP98-KDM5A LEUKEMIA SUBTYPES COMPARED WITH NORMAL CB CD341 CELLS.....	128
FIGURE 3-4 : MOLECULAR CHARACTERIZATION OF N5A AMKL.....	130
FIGURE 3-5 : SPECIFIC BIOMARKERS OF AMKL.....	132
FIGURE 3-6 : PRIMARY NUP98R XENOGRAFT CELLS ARE VULNERABLE TO JAK-STAT SIGNALING INHIBITORS.....	134
FIGURE 3-7 - ÉVALUATION DU POTENTIEL DE TRANSFORMATION LEUCÉMIQUE DE LA FUSION <i>NUPT98-BPTF</i>	146

FIGURE 3-8 – CARACTÉRISATION MOLÉCULAIRE DES MODÈLES AMKL NUP98R	147
FIGURE 4-1 – GENERATION OF HUMAN MODELS OF CBFA2T3::GLIS2 LEUKEMIA.....	158
FIGURE 4-2 – GENE EXPRESSION IN CBFA2T3::GLIS2 LEUKEMIA MODELS CORRELATE WITH PEDIATRIC DISEASE. ...	162
FIGURE 4-3 – CBFA2T3::GLIS2 LEUKEMIA CONSIST OF IMMATURE MEGA-ERYTHROID STEM AND PROGENITOR LINEAGES.	164
FIGURE 4-4 – CBFA2T3::GLIS2 ND NUP98R AMKL XENOGRAFTS ARE SENSITIVE TO INDUCTION OF THE INTRINSIC APOPTOTIC PATHWAY.	166
FIGURE 4-5 – AMKL XENOGRAFTS DEPEND ON PRO-SURVIVAL PROTEIN BCL-XL FOR SURVIVAL.	170
FIGURE 4-6 – CBFA2T3::GLIS2 AMKL IS IMPAIRED BY NAVITOCCLAX AND DT2216 TREATMENT <i>IN VIVO</i>	174
FIGURE 4-7 – SUPPLEMENTAL FIGURE S1. PHENOTYPIC CHARACTERISTICS OF RECIPIENT MICE SERIALY TRANSPLANTED WITH MCG2-2 AND MCG2-6 AMKL.....	193
FIGURE 4-8 – SUPPLEMENTAL FIGURE S2. EXTRAMEDULLARY INVOLVEMENT IN LUCIFERASE-EXPRESSING MODELS OF CBFA2T3::GLIS2 AMKL SIMILAR TO PATIENT DISEASE.....	194
FIGURE 4-9 – SUPPLEMENTAL FIGURE S3. CBFA2T3::GLIS2 LEUKEMIC CELLS EXPRESS MEGAKARYOCYTIC AND ERYTHROID LINEAGE MARKERS.	195
FIGURE 4-10 – SUPPLEMENTAL FIGURE S4. SYNTHETIC MODELS OF CG2 LIE IMMUNOPHENOTYPICALLY IN THE MEGA-ERYTHROID SPACE.	196
FIGURE 4-11 – SUPPLEMENTAL FIGURE S5. MAINTENANCE OF LEUKEMIC POTENTIAL IN OPTIMIZED CULTURE CONDITIONS.	197
FIGURE 4-12 – SUPPLEMENTAL FIGURE S6. TRANSCRIPTOMIC PROFILING OF CBFA2T3::GLIS2 MODELS CORRELATES WITH PATIENT DISEASE AND DEFINES NON-HOXA/B AND NON-MEIS1/2 LEUKEMIA.	199
FIGURE 4-13 – SUPPLEMENTAL FIGURE S7. COPY NUMBER VARIATIONS (CNVS) DETECTED IN CBFA2T3::GLIS2 LEUKEMIA MODELS.	201
FIGURE 4-14 – SUPPLEMENTAL FIGURE S8. EXPRESSION OF CBFA2T3::GLIS2 (CG2) GENE FUSION IN CG2 MODELS.	202
FIGURE 4-15 – SUPPLEMENTAL FIGURE S9. LENTIVIRAL INTEGRATION SITES IN MODELS OF CBFA2T3::GLIS2 AMKL.	202
FIGURE 4-16 – SUPPLEMENTAL FIGURE S10. CELL SURFACE PROTEOMICS OF CBFA2T3::GLIS2 (CG2) AND NUP98 REARRANGED (NUP98R) ACUTE MEGAKARYOBLASTIC LEUKEMIA (AMKL) MODELS.	205
FIGURE 4-17 – SUPPLEMENTAL FIGURE S11. EXPRESSION OF GENES ENCODING CBFA2T3::GLIS2 (CG2)-ASSOCIATED CELL SURFACE PROTEINS IN AN EXTERNAL TRANSCRIPTOMIC DATASET OF PEDIATRIC AMKL.	206
FIGURE 4-18 – SUPPLEMENTAL FIGURE S12. VALIDATION OF CBFA2T3::GLIS2 (CG2) AMKL-ASSOCIATED CELL SURFACE PROTEINS BY FLOW CYTOMETRY.	207

FIGURE 4-19 – SUPPLEMENTAL FIGURE S13. CORRELATIVE EXPRESSION OF CELL SURFACE MARKER GENES ASSOCIATED WITH CBFA2T3::GLIS2 (CG2) SUBTYPE IN AN EXTERNAL TRANSCRIPTOMIC DATASET OF PEDIATRIC AMKL ¹⁵	208
FIGURE 4-20 – SUPPLEMENTAL FIGURE S14. CELLULAR IDENTITY OF CBFA2T3::GLIS2 LEUKEMIA ASSESSED BY SCRNASEQ.....	209
FIGURE 4-21 – SUPPLEMENTAL FIGURE S15. UMAP EMBEDDED GENE EXPRESSION OF RELEVANT MARKERS.	210
FIGURE 4-22 – SUPPLEMENTAL FIGURE S16. EXPRESSION OF RELEVANT MARKER.....	211
FIGURE 4-23 – SUPPLEMENTAL FIGURE S17. CO-EMBEDDING OF NORMAL BONE MARROW CELLS WITH CELLS FROM PATIENTS AND MODELS.....	212
FIGURE 4-24 – SUPPLEMENTAL FIGURE S18. INHIBITION OF BCL-XL IMPAIRS AMKL.	213
FIGURE 4-25 – SUPPLEMENTAL FIGURE S19: ADDITIONAL MODELS OF CG2 AND NUP98R PATIENT-DERIVED XENOGRAFT ARE SENSITIVE TO NAVITOCLOX TREATMENT IN VIVO.	214
FIGURE 4-26 – SUPPLEMENTAL FIGURE S20: ADDITIONAL MODELS OF CG2 AND NUP98R PATIENT-DERIVED XENOGRAFT ARE SENSITIVE TO DT2216 TREATMENT IN VIVO.....	215
FIGURE 4-27 – SUPPLEMENTAL FIGURE S21: COMBINATION OF INHIBITION OF BCL-XL WITH CYTARABINE REDUCES LEUKEMIC BLASTS IN VIVO.	216
FIGURE 5-1 - COURBES DOSES RÉPONSES DES INHIBITEURS DES JAK ET EFFET DES INHIBITEURS SUR LA PROLIFÉRATION ET LA VIABILITÉ CELLULAIRE.....	224
FIGURE 5-2 - COURBES DOSES RÉPONSES DES INHIBITEURS DE LA VOIE PI3K-AKT-MTOR.....	228
FIGURE 5-3 - LE RUXOLITINIB ET LE VISTUSERTIB INDUISENT L'APOPTOSE DES MODÈLES AMKL DE MANIÈRE SYNERGIQUE.....	231

VI. Liste des sigles et abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN Codant

AEL : Acute erythroid leukemia

AGM : Aorte-gonade-mésonephros

ALL : Acute lymphoblastic leukemia

AMKL : Acute megakaryoblastic leukemia

AML : Acute myeloblastic leukemia

ARN : Acide ribonucléique

BCLQ : Banque de cellules leucémiques du Québec

BCR : Breakpoint cluster region

BDB : Bris double brin

BPTF : Bromodomain and PHD finger transcription factor

CAR-T : Chimeric antigen receptor T-cells

CB : Cord Blood

CD : Cluster of differentiation

CFU : Colony forming units

CG2 : CBFA2T3::GLIS2

circARN : ARN circulaire

CoREST : Corepressor of RE1 silencing transcription factor

CMP : Common myeloid progenitor

CNA : Copy number alteration

CNV : Copy number variation

COMPASS : Complex associated with SET

CRISPR : Clustered regularly interspaced short palindromic repeats

CSF2RA : Colony stimulating factor 2 receptor subunit alpha

CSFE : Carboxyfluorescein succinimidyl ester

CSH : Cellules souche Hématopoïétique

CUL3 : Cullin 3

ddPCR : PCR par gouttelettes digitalisées

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMT : Désordre myéloprolifératif transitoire

DS : Down syndrome

EPCY : Evaluation of predictive capability

FAB : French-American-British

FACS : Fluorescence activated cell sorting

FLT3 : FMS related receptor tyrosine kinase 3

FOG1 : Friend of GATA 1

FPKM : Fragments per kilobase of transcript per million mapped reads

GLFG : Glycine-leucine-phénylalanine-glycine

GM-CSF : Granulocyte macrophage-colony stimulating factor

GFP : Green fluorescent protein

GSEA : Gene set enrichment analysis

GVH : maladie du greffon contre l'hôte

HDAC2 : Histone deacetylase 2

HSPC : Hematopoietic stem and progenitor cells

IL3 : Interleukine 3

IL6 : Interleukine 6

ITD : Internal tandem duplication

JAK : Janus kinases

KBTBD4 : Kelch repeat and back to back domain containing 4

LSD1 : Lysine-specific histone demethylase 1A

KMT2Ar : KMT2A réarrangé

L2FC : Log 2 fold change

LAL : Leucémie aiguë lymphoblastique

LC-MS : Liquid chromatography-Mass spectrometry

LDA : Limiting dilution assay

LEDGF : Lens epithelium-derived growth factor 1

LMA : Leucémie myéloblastique aiguë

LSC : Leukemic stem cells

LTRC : Long term repopulating cells

mCG2 : modèle CBFA2T3::GLIS2

MEN1 : Multiple Endocrine Neoplasia 1

MEP : Megakaryocytic/Erythrocytic progenitor

MLL : Mixed lineage leukemia (KMT2A)

mNSA : modèle NUP98::KDM5A

MPP : Multipotent progenitor

MRD : Minimal residual disease

mTOR : Mammalian target of rapamycin

mTORC1/2 : mTOR Complexe 1/2

NSA : NUP98::KMD5A

NGS : Next generation sequencing

NHEJ : Non-homologous end joining

NHR : Nery homology region

NSG : NOD scid gamma null

NSG-SGM3 : NSG-Steel facteur-GM-CSF-IL3

NSL : Non-specific lethal

NTF : NUP98::BPTF

NTF1/2 : NUP98::BPTF 1/2 PHD domain

NUMT1 : Nuclear protein in testis midline carcinoma 1

NUP98r : NUP98 réarrangé

PC : Post conception

PCA : Principal component analysis

PcG : Polycomb group

PCR : polymerase chain reaction

pdx : patient derived xenograft

pdxNTF : modèle pdx NUP98::BPTF

PRE : Polycomb response elements

qRT-PCR : PCR quantitatif à temps réel

RB1 : Retinoblastoma 1

RCOR1 : REST corepressor 1

RH : Recombinaison homologue

RT-PCR : Reverse transcription-PCR

RUNX1 : RUNX Family Transcription Factor 1

scADN/ARNseq : Séquencage de l'ADN/ARN de cellule unique

SCF : Stem cell factor

SDBS : Shwachman-Bodian-Diamond syndrome

seqARN : séquencage de l'ARN

SNL : Signal de localisation nucléaire

SR1 : StemRegenin 1

SSC : Side scatter

STAT : Signal transducer and activator of transcription

STRC : Short term repopulating cells

SET : Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste

T21 : Trisomie 21

THPO : Thrombopoïétine

Trx : Trithorax

WES : Whole exome sequencing

À ma famille et ami(e)s.

“Words are employed to convey ideas; but when the ideas are apprehended, we forget the words.
Fain would I talk with such a person who has forgot the words!”

- Zhuang Zhou

VII. Remerciements

J'aimerais remercier ma directrice de thèse, Sonia Cellot, pour son soutien inestimable ainsi que son fervent engagement envers ma réussite tout au long de ces années. Tu m'as permis de réaliser un rêve et je t'en serai pour toujours très reconnaissant.

Merci à Mélanie Bilodeau pour tous ces fous rires! Tu étais la première juge de toutes mes idées folles et je te remercie de les avoir toutes écoutées. Merci pour ton temps, ton soutien moral et technique ainsi que pour la révision de tous ces documents que l'on écrit tout au long d'un Ph.D. Merci énormément !

Merci à Louise et Sophie pour m'avoir accueilli au laboratoire il y a maintenant plusieurs années. Merci pour votre soutien technique et de m'avoir montré les ficelles à mon arrivée. Vous avez fait tant de travail pour la réussite de mes expériences. Je ne vous remercierai jamais assez.

Aux membres présents et anciens du labo Cellot : Billy, Emma, Furat, Julian, Luc, Nadia, Nehme et Verena, merci beaucoup pour votre précieuse contribution, pour votre soutien technique lors des différentes expériences et analyses.

Il y a tant de gens au centre de recherche que je veux remercier. Merci à Alexis, Alice, Aurélien, Blandine, Camille, Chloé, Clara, Cynthia, Damien, Delphine, Gaël, Hugo, Josée-Anne, Lorie, Marie-Lyn, Mélanie D, Mitra, Paolo, Renaud et William pour votre écoute, le café, le troubleshooting, les échanges de réactifs à la dernière minute ainsi que pour toutes ces belles soirées. Chaque jour, je savais que je pouvais venir vous trouver pour passer un bon moment. Vous allez très certainement me manquer.

Merci à mes collaborateurs Éric, Léo et Louis du laboratoire de Philippe Roux pour tout ce travail, vos explications et les discussions scientifiques. Merci pour votre engagement et votre expertise. Votre contribution est une partie importante de ce travail.

Je tiens à souligner le soutien de mes parents et de plusieurs ami(e)s de longue date. Très chères parents et ami(e)s, je vous remercierai individuellement et personnellement pour toute votre écoute et vos encouragements.

Merci à mon jury pour votre temps et vos précieux commentaires lors de la révision de cette thèse ainsi qu'aux administrateurs des différentes plateformes de recherche et biobanques pour votre soutien.

Merci aussi aux multiples organismes qui ont supporté notre travail : Fondation Cole, Fondation Charles-Bruneau, Fondation CHU Sainte-Justine, Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC), Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS), Société canadienne du cancer (CCSRI), Société du leucémie et lymphome du Canada (LLSC), Fondation Richard et Edith Strauss, Fondation canadienne pour l'innovation (John R. Evans Leaders Fund). Merci pour votre générosité.

Merci aux familles et aux patients pour votre confiance et votre intérêt envers la recherche.

Finalement, j'aimerais remercier d'anciens professeurs qui m'ont poussé à faire des études universitaires : Marielle, Mireille et Richard.

1 Introduction

1.1 L'hématopoïèse normale chez l'humain

1.1.1 Identification des caractéristiques des cellules souches hématopoïétiques

L'hypothèse de l'existence d'une cellule souche hématopoïétique (CSH) provient indirectement des recherches menées en physique sur la radioactivité et son effet sur les êtres vivants. Les essais de transplantation de moelle osseuse chez la souris, afin de traiter l'aplasie médullaire engendrée par l'exposition à la radiation, permettra aux Canadiens James E. Till et Ernest A. McCulloch d'avancer l'hypothèse de l'existence d'une cellule multipotente, ayant la capacité d'auto-renouvellement, à l'apex du système hématopoïétique.

En effet, la transplantation de cellules de la moelle osseuse provenant d'un donneur murin sain à une souris irradiée entraîne non seulement la survie de la souris receveuse en régénérant le système hématopoïétique, mais génère aussi la formation d'îlots de cellules hématopoïétiques au niveau de la rate de la souris receveuse¹. Le nombre de ces îlots est directement proportionnel à la dose de cellules saines transplantées. Ce progéniteur « spleen colony-forming unit » (CFU-S) est présente à une fréquence d'environ 1/1 000 cellules nucléées de moelle osseuse murine. Selon la morphologie des cellules au sein de ces îlots, ils ont pu démontrer qu'ils étaient formés de cellules myéloïdes, érythrocytaires et mégacaryocytaires à différents stades de maturation¹. Des études subséquentes démontreront que ces CFU peuvent aussi générer des cellules de type lymphocytaires B et T^{2,3}. Cette découverte suggère que les CFU sont multipotentes.

Dans une expérience qui révolutionnera le domaine de l'hématologie, Till et McCulloch ont préalablement irradié des cellules de la moelle osseuse de souris avant de les transplanter à une souris receveuse. En examinant le nombre de chromosomes ainsi que le type de mutations, engendrées de manière aléatoire par l'irradiation préalable des cellules transplantées, Till et McCulloch en sont venus à la conclusion que chacun de ces îlots était le résultat de l'expansion clonale d'une cellule unique. La retransplantation des cellules provenant d'un de ces îlots à une souris secondaire entraîne la re-formation de plusieurs îlots spléniques présentant les mêmes

caractéristiques ^{4,5}. Puisque chaque îlot provient d'une cellule unique, Till et McCulloch ont suggéré que les CFU sont dotées de la capacité d'autorenouvellement.

Les travaux de Till et McCulloch ont eu un grand impact en hématologie. À ce jour, nous définissons les CSH selon leur capacité d'autorenouvellement ainsi que leur propriété à régénérer l'entièreté du système hématopoïétique.

1.1.2 L'autorenouvellement des CSH

Tel que proposé par Till et McCulloch, les CSH sont dotées de la capacité d'autorenouvellement. Cette fonction cruciale permet aux CSH d'augmenter en nombre durant l'embryogenèse tout en maintenant un niveau de production hématopoïétique fonctionnel lors de la vie adulte. L'autorenouvellement des CSH peut survenir de deux manières, c'est-à-dire lors de division symétrique ou asymétrique. Le type de division reflète les besoins physiologiques de l'organisme.

Lors d'une division symétrique, la CSH peut se diviser en deux cellules filles identiques et ayant les mêmes propriétés que la cellule CSH initiale. Ce type de division permet d'augmenter le nombre absolu de CSH chez un individu et survient majoritairement lors du développement embryonnaire (autorenouvellement d'expansion). Chez la souris, les CSH sont en constante division jusqu'à trois semaines après la naissance ⁶. Suivant cette phase d'expansion et ce jusqu'à l'âge adulte, la majorité des CSH sont maintenues en état de quiescence et entreprennent peu de division ⁶. Cette propriété permet entre autres aux CSH de préserver leur potentiel unique d'autorenouvellement et de multipotence, tout en assurant le maintien de l'intégrité du génome.

Les divisions asymétriques sont caractérisées par un maintien du nombre de CSH chez l'individu. Lors de la division cellulaire, une nouvelle CSH ainsi qu'une cellule progénitrice ayant perdu sa capacité d'autorenouvellement sont générées (autorenouvellement de maintenance). Cette dernière cellule continuera de se diviser et de se commettre à un sous-type cellulaire et générera une cellule totalement différenciée.

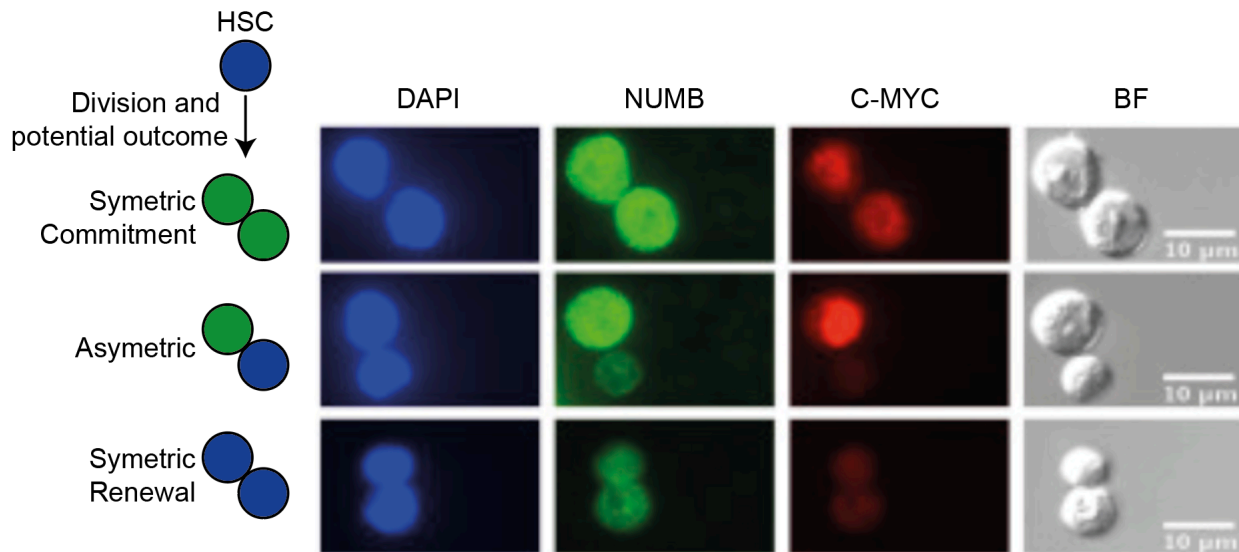


Figure 1-1 - Division symétrique et asymétrique des cellules souches hématopoïétiques.

CSH murines (Lin-, Sca+, Kit+, CD150+, CD48-) démontrant leur potentiel de division symétrique et asymétrique. NUMB et MYC, normalement faiblement exprimés chez les CSH, augmentent significativement chez les cellules commises ^{7,8}. Adapté de Yuanming Cheng et al. ⁷

Le maintien de l'équilibre entre autorenouvellement et différenciation est important ⁹. Un déséquilibre peut entraîner des pathologies telles que la leucémie ou l'aplasie médullaire. Dans le cas de la leucémie, on peut constater une diminution du temps entre les divisions cellulaires ainsi qu'un maintien de la capacité d'autorenouvellement, concomitante à un blocage de la différenciation cellulaire. Dans son cas, l'aplasie médullaire est engendrée par la division sans maintien de l'autorenouvellement des CSH menant à un épuisement de la réserve des CSH chez un individu (divisions symétriques ou asymétriques impliquant de la différenciation et/ou de la mort cellulaire) ¹⁰. Ces épuisements peuvent survenir en présence de stress chronique ou aigu notamment l'inflammation chronique ainsi que l'exposition à des agents chimiothérapeutiques ¹¹.

1.1.3 Les agonistes de l'autorenouvellement

Bien que les CSH soient dotées de la capacité d'autorenouvellement, celles-ci se différencient rapidement lorsque placées en culture *ex vivo* ¹². Le maintien de leurs propriétés est donc primordiale afin de les étudier efficacement. Suivant le retrait du sérum des milieux de culture afin d'assurer un meilleur contrôle de leur composition, la recherche n'a pas cessé afin d'identifier des conditions de cultures adaptées au maintien des capacités uniques des cellules souches *in*

vitro. Suivant cet objectif, des agonistes de l'autorenouveau, tel que le StemRegenin 1 (SR1) et la molécule UM171, ont été identifiés et sont maintenant utilisés lors de la culture des cellules souches et progénitrices hématopoïétiques (HSPC) afin de préserver leurs propriétés ^{13,14}.

SR1 est un antagoniste du récepteur AHR (Aryl Hydrocarbon Receptor) et qui fut identifié lors d'une analyse à haut débit de 10,000 composés mesurant l'expansion des cellules CD34+/CD133+ (cluster of differentiation) provenant du sang humain mobilisé ¹³. Après 7 jours en culture en combinaison avec de la THPO (thrombopoïétine), SCF (stem cell factor), FLT3 (FMS related translocated) et IL6 (interleukine 6), SR1 permet l'expansion des HSPC CD34+ tout en préservant un immunophénotype indifférencié (CD34+, CD133+ et CD90+) ¹³. Sur le long terme, 35 jours après leur mise en culture, les HSPC exposés à SR1 peuvent encore former des colonies de types GEMM (Granulocytaire, Erythrocytaire, Monocytaire et Megacaryocytaire) témoignant de la capacité de SR1 à préserver la multipotence ¹³. SR1 permet aussi d'augmenter la fréquence des cellules ayant la capacité à reconstituer une souris NSG (NOD scid gamma null) (augmentation de 8 fois par rapport aux contrôles après 21 jours de culture) ¹³.

La classe des pyrimidoindoles se démarqua lors d'un crible de composés chimiques servant à identifier des molécules favorisant l'expansion de cellules humaines CD34+ et CD45Ra- ^{15,16}. Bien que l'expansion du nombre de cellules CD34+ est comparable à celle obtenue avec SR1 à 12 jours de culture, le composé UM171 permet l'expansion de cellules présentant un immunophénotype plus immature (CD34+, CD38-, CD45RA- et CD90+) comparativement à lorsque SR1 est employé seul ¹⁶. De plus, UM171 permet l'expansion de CSH ayant un potentiel de reconstitution hématopoïétique sur le long terme, 20 semaines suivant la transplantation, lorsque que les cellules progénitrices ne participent plus à la production hématopoïétique ¹⁶.

Il fut récemment démontré que UM171 induit la dégradation de membres importants du complexe CoREST (corepressor of RE1 silencing transcription factor) comprenant RCOR1 (REST corepressor 1), LSD1 (Lysine-specific histone demethylase 1A) et HDAC2 (Histone deacetylase 2) ^{17,18}. Cette dégradation induite par UM171 est médiée par l'interaction de KBTBD4 (Kelch repeat and back to back domain containing 4) avec l'ubiquitine ligase CUL3 (Cullin 3). La dégradation du complexe CoREST induit une préservation des marques épigénétiques H3K4me2 et H3K27ac

généralement perdue après trois jours de culture de cellules CD34+ de sang de cordon ¹⁷. La rétention de ces deux marques épigénétiques est importante dans le maintien de la multipotence et d'autorenouveaulement des cellules souches ^{19,20}.

1.1.4 Multipotence des CSH

1.1.4.1 Le modèle classique de l'hématopoïèse

L'hématopoïèse permet la génération des cellules effectrices du sang. Le modèle « classique » de l'hématopoïèse présente celle-ci comme une arborescence cellulaire très hiérarchisée et ayant à son apex la CSH. Sous la CSH, nous retrouvons les cellules progénitrices et différenciées. Ces dernières se divisent en en deux grandes catégories, soit les cellules de types myéloïdes et lymphoïdes ²¹. Les cellules myéloïdes comprennent les lignées cellulaires suivantes : érythrocytaire, mégacaryoblastique, monocytaire et granulocytaire ²². Le compartiment lymphocytaire comprend les lymphocytes B, T et NK ²². Il est à noter que les cellules dendritiques peuvent émaner à la fois du compartiment myéloïde et lymphoïde ²³. De plus, souvent oubliés, les ostéoclastes dérivent aussi de la cellule CSH ²⁴ (voir figure 1-2-A). À chaque étape de cette différenciation, les HSPC acquièrent graduellement les propriétés et l'immunophénotype associés aux cellules différenciées.

L'évidence de la multipotence des CSH provient de leur capacité à reconstituer le compartiment lymphoïde et myéloïde d'un organisme. Dans le cas d'une xénotransplantation, afin de s'assurer que les cellules détectées par cytométrie en flux correspondent bien à la descendance des CSH humaine plutôt que des cellules progénitrices chez la souris, la détection de la reconstitution du système hématopoïétique doit être faite au plus tôt 20 semaines après la transplantation (voir figure 1-2-B et C) ²¹. Cette reconstitution lympho/myéloïde est définie par la présence de cellules humaines positives à des marqueurs spécifiques aux cellules de chaque lignée au sein de la moelle osseuse murine ^{25,26}. Ces cellules myéloïdes sont généralement décrites comme CD33 et/ou CD11b positives et les cellules lymphoïdes sont identifiées par la présence des marqueurs CD19 ou CD3, caractérisant les lymphocytes B et T respectivement. Il est aussi possible d'identifier des cellules de la lignée érythrocytaire (CD45-, CD71+, CD235+) et mégacaryoblastique (CD41+ CD61+) au niveau de la moelle osseuse des souris reconstituées. Lors de ces essais, l'utilisation de séquences génétiques uniques, parfois appelé « code-barres génétiques », permet de confirmer

que la reconstitution lympho/myéloïde des cellules humaines chez la souris receveuse provient bien de clones multipotents ²⁷.

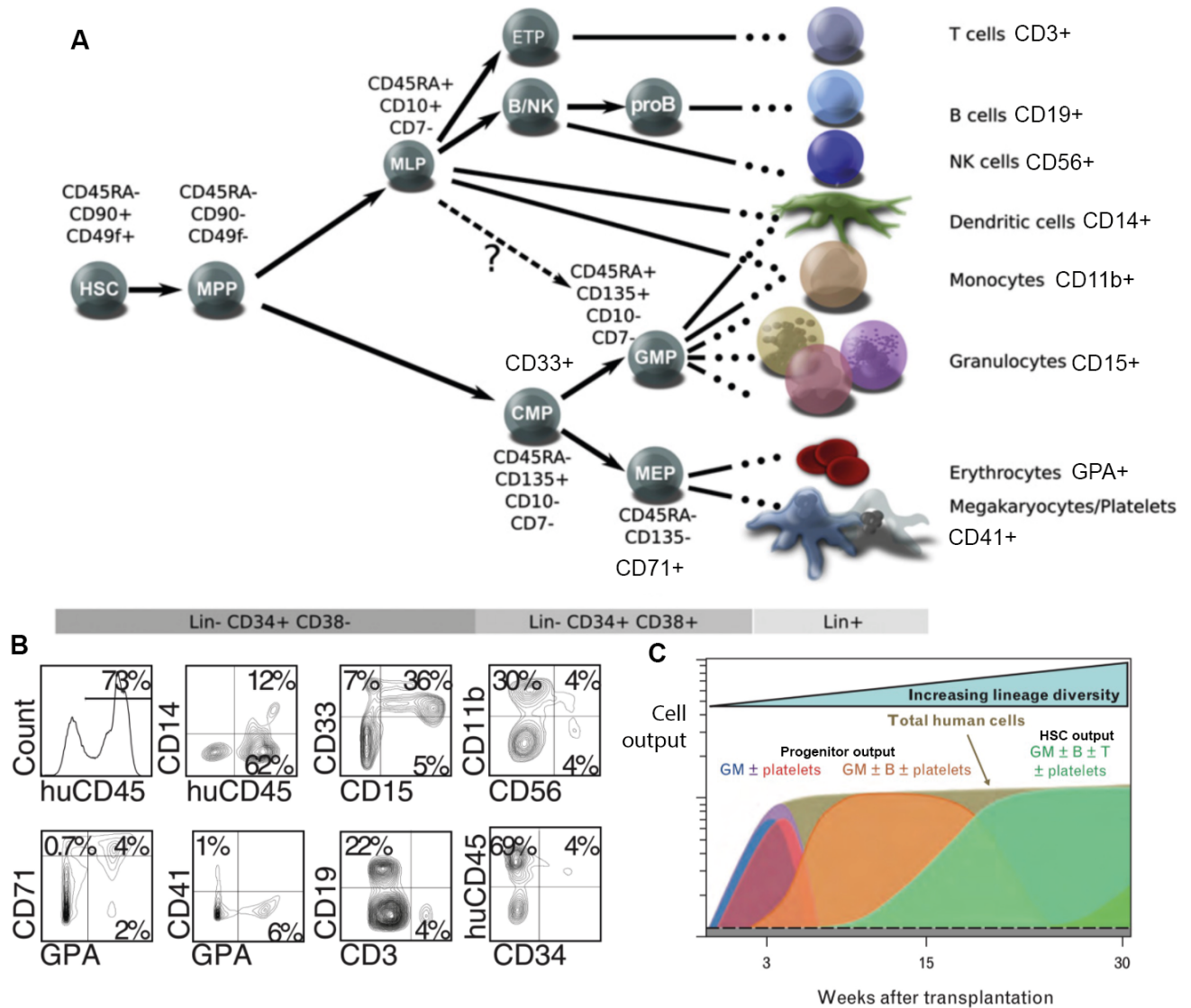


Figure 1-2 - Démonstration de la capacité de multipotence des cellules souches hématopoïétiques humaines.

A) Modèle classique de l'hématopoïèse humaine où le compartiment de cellules souches et progénitrice se divisent en deux branches principales, lymphoïde et myéloïde. Ces progéniteurs terminent ensuite leur différenciation et génèrent des ces cellules totalement différenciées effectrices du système hématopoïétique reconnaissables par l'expression de marqueurs immunophénotypiques. B) Reconstitution hématopoïétique normale 30 semaines suivant la transplantation d'une souris NSG par une suspension cellulaire de cellules humaines CD34⁺ isolées de sang de cordon. La présence de cellules terminalement différenciées pour chacune des branches de l'hématopoïèse à ce stade démontre le potentiel des CSH à reconstituer globalement le système hématopoïétique de son hôte sur le long terme. Lin : Lineage, HSC : Hematopoietic stem cell, MPP: multipotent progenitor, MLP: Multipotent lymphoid progenitor, ETP: E T-cells progenitor, ProB: Progeniteur B, CMP: Commun myeloid progenitor, GMP: Granulocytic myeloid progenitor, MEP : Megakaryocytic/Erythroid progenitor. Figure adapté de Sergei Doulatov et al.²² ainsi que de Iman Fares et al.¹⁶ C) Suivant la transplantation d'une souris, les CSH humaines ont le potentiel de reconstituer, sur le long-terme, le compartiment lymphoïde et myéloïde de de son hôte. Cette reconstitution survient par

phase et est initiée par les cellules progénitrices (progenitor). Au plus long terme (>20 semaines après transplantation), les cellules humaines présentes chez la souris sont dérivées des CSH (HSC : hematopoietic stem cell). Cette différence temporelle s'accompagne d'une augmentation de la diversité cellulaire générée par le greffon. Figure adaptée de Paul H. Miller et al²⁸.

1.1.4.2 Les précisions apportées au modèle classique

La définition des cellules HSPC au sein de ce modèle « classique » est maintenant remise en question. Ce modèle a grandement évolué dans les dernières années avec l'arrivée du séquençage de l'ARN de cellules uniques (scARNseq).

La classification actuelle des HSPC est basée sur la présence de marqueurs de surface distinctifs ainsi qu'à leur potentiel à se commettre définitivement à un sous-type cellulaire en passant à travers des étapes de différenciation intermédiaires bien définies ^{21,22}. Or, les cellules HSPC répondent à une myriade de facteurs internes et externes afin de se commettre définitivement. Ces facteurs influencent le programme transcriptomique des HSPC sans être nécessairement reflétés par un changement immunophénotypique. Le groupe de cellules HSPC serait potentiellement mieux décrit comme un continuum de cellules présentant une faible amorce de différenciation (Figure 1-3) ^{29,30}.

L'analyse scRNAseq des cellules HSPC, conjuguée à des essais fonctionnels, démontre qu'il est possible d'identifier des cellules définitivement commises vers la lignée mégacaryoblastique ou érythroblastique émanant directement des groupes de cellules définies comme CSH, MPP et CMP ^{29,31,32}. Cette observation est en contradiction avec le modèle classique qui présente l'hématopoïèse comme une série de choix binaires tout au long du processus de maturation.

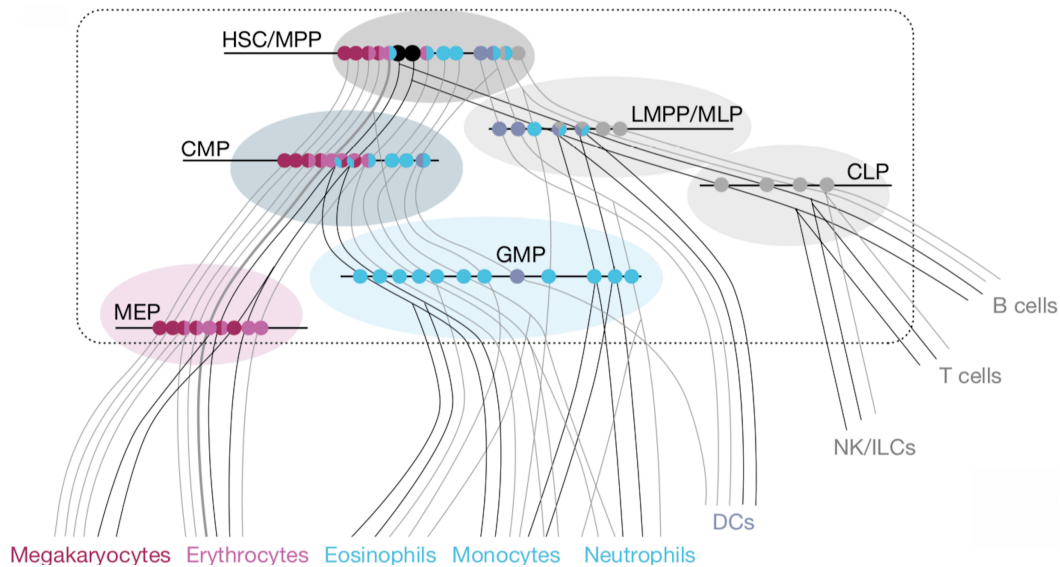


Figure 1-3 - Représentation actuelle de l'hématopoïèse humaine émanant des analyses de transcriptomique de cellules individuelles.

Comparativement au modèle classique, les stades de différenciation cellulaire, représentés par des zones, sont définies plus largement. Cependant, la hiérarchie est conservée. Certaines cellules du contingent HSC/MPP présentent un destin cellulaire pré-établi, représentés par des cercles de couleurs, alors que d'autres démontrent une certaine flexibilité quant à leur lignée terminale. Ces cellules réellement multipotentes sont représentées par des billes noires ou de couleur multiple. Figure adaptée de l'article d'Elisa Laurenti et Berthold Göttgens³⁰.

1.1.4.3 La mégacaryopoïèse et les mégacaryocytes normaux

Émanant de l'hémangioblaste, les premières cellules mégacaryoblastiques apparaissent au niveau du sac de vitellin autour du jour E7.5 chez la souris et 4 semaines après la conception chez l'humain³³⁻³⁵. À ce stade, ces cellules mégacaryoblastiques primitives ne présentent qu'un ou deux noyaux et ont la possibilité de générer des proplaquettes *in vitro*^{33,34,36}.

Lors de la maturation mégacaryocytaire, les cellules MEP (Megakaryocytic/Erythrocytic progenitor) entreprennent une série d'endomitoses donnant aux cellules mégacaryoblastiques leur morphologie polyploïde particulière³⁷. Chez les cellules matures, il est possible de voir apparaître la présence de lobes proplaquettaires par examen cytologique³⁸. En plus de leur morphologie caractéristique, les cellules de la lignée mégacaryocytaire sont identifiables par cytométrie en flux et présentent un immunophénotype positif pour les marqueurs CD41, CD61, CD42a-b-c, VWF, CD9, MPIG6B, MPL et CXCL3^{39,40}.

Les mécanismes permettant à la cellule mégacaryoblastique de passer au-delà du point de contrôle tétraploïde, ce qui engendre normalement un arrêt de synthèse de l'ADN alors que la

cellule atteint un stade 4N, et d'atteindre un niveau de polyploidie pouvant atteindre 128N ne sont que partiellement compris (voir figure 1-4). Cette évation semble être générée par le découplage entre les voies Hippo et Rho. Normalement, lorsque qu'une cellule arrive à un stade tétraploïde (4N) suivant une cytokinèse ratée, LATS2, une kinase de la voie Hippo, stabilise TP53 et induit la phosphorylation inhibitrice de YAP/TAZ^{41,42}. L'augmentation de TP53 ainsi que la séquestration de YAP/TAZ au cytoplasme entraînent normalement un blocage dans la progression du cycle cellulaire. Or chez les mégacaryoblastes, ce point de contrôle tétraploïde semble inactif⁴³. Ce découplage entre la voie Hippo et l'arrêt du cycle cellulaire permet aux cellules mégacaryoblastiques d'amorcer plusieurs cycles d'endomitose sans entraîner la mort cellulaire.

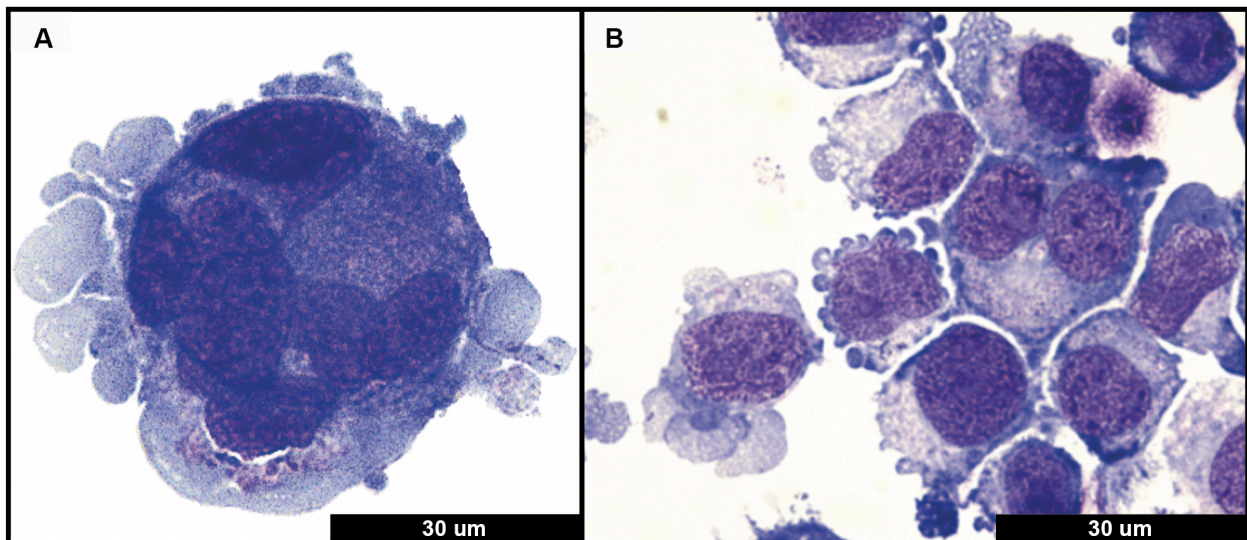


Figure 1-4 - Les mégacaryocytes matures sont de larges cellules polynucléés.

A) Un mégacaryocyte mature dérivé de la différenciation *in vitro* de cellules humaines CD34+ normales isolées à partir d'un sang de cordon. **B)** Prolifération mégacaryocytaire immature CD41+/CD61+ dérivé de la transduction de NUP98::BPTF dans des cellules CD34+ humaines isolés de sang de cordon. Coloration Giemsa de cytopins, 63X.

Au niveau de la moelle osseuse, les mégacaryocytes matures sont de larges cellules pouvant aller jusqu'à 100 nm retrouvés près des vaisseaux sanguins sinusoides. Dans ce processus, les mégacaryocytes sont attirés par les cellules réticulaires abondantes en CXCL12 retrouvées près des vaisseaux sanguins sinusoides^{44,45}. Ceux-ci engendrent ensuite la dégradation de la lame basale afin de se retrouver directement en contact avec les cellules endothéliales avant d'étendre leur protrusion vers la lumière des vaisseaux⁴⁶. Bien que les mégacaryocytes matures répondent à la THPO par une augmentation de la production plaquettaire⁴⁷, cette stimulation n'est pas

nécessaire. En effet, CXLC12, le ligand de CXCR4, peut à la fois promouvoir la relocalisation des mégacaryocytes vers les capillaires sinusoides par chemoattraction, induire leur maturation ainsi que la production plaquettaire chez les souris *Thpo*^{-/-} ou *Mpl*^{-/-} (récepteur de la Thpo)⁴⁸.

1.1.5 L'ontogénie des CSH

Chez le fœtus humain, tout comme chez la souris, l'hématopoïèse évolue au niveau temporel et spatial. Les premières évidences de l'hématopoïèse surviennent au jour 16-19 suivant la conception au sein d'îlots retrouvés au niveau de la paroi interne du sac de vitellin⁴⁹. Ces cellules hématopoïétiques primitives présentent un biais de différenciation vers la lignée érythroïde tout comme vers la lignée mégacaryoblastique^{35,49}.

Les premières CSH dotées de la capacité d'autorenouvellement apparaissent chez le fœtus au niveau de l'AGM (aorte-gonade-mésonephros) et émergent entre 4.5 et 6 semaines suivant la conception (PC)^{35,50}. Ces CSH émanent de cellules endothéliales qui transitent en co-exprimant CDH5, CXCR4 et RUNX1 avant de réprimer CXCR4 et d'exprimer les marqueurs CD45 (PTPRC), CD43 (SPN) et CD44³⁵. Des études récentes identifient *RUNX1*, *HOXA9*, *MLLT3*, *MECOM*, *HLF* et *SPINK2* comme significativement surexprimés dans les CSH comparativement aux autres cellules du tissu hématopoïétique embryonnaire. Plus particulièrement, HLF est identifié comme le marqueur le plus prédictif des CSH à ce jour^{35,51}.

Les CSH nouvellement formées transitent au niveau du foie fœtal autour de 6 semaines PC où elles entreprennent une phase d'expansion rapide augmentant significativement leur nombre absolu⁵². C'est aux environs de la dixième semaine de gestation que l'on peut retrouver des CSH au niveau de la moelle osseuse de l'embryon humain^{53,54}. Cependant, le moment exact où l'hématopoïèse est soutenue par ces CSH nichées au sein de la moelle osseuse reste éluif^{55,56}.

1.1.5.1 Différence entre le programme fœtal et adulte des CSH

Il existe plusieurs indications pointant vers des différences entre le programme transcriptionnel des CSH retrouvées chez le fœtus, l'embryon et l'adulte. La présence chez l'embryon d'une population érythrocytaire primitive nucléé qui viendra à disparaître en laissant place à des globules rouges matures sans noyau en est un exemple⁵⁷. Un autre exemple de ces changements transcriptionnels peut être décelé lors du passage de l'hémoglobine fœtal à l'hémoglobine adulte.

La globine gamma est produite seulement chez le fœtus et le nourrisson formant ainsi le complexe alpha2-gamma2. Débutant autour de la mi-gestation et se terminant autour d'un an après la naissance, le nourrisson cessera alors de produire la globine gamma et remplacera progressivement celle-ci par la globine beta au sein d'un complexe alpha2-beta2 ⁵⁸.

Ce changement vers un programme hématopoïétique adulte peut être entraîné par des facteurs intrinsèques ou extrinsèques aux CSH. Chez la souris, ce passage est marqué par une diminution de l'expression de Lin28 et une augmentation de let-7, un micro ARN ⁵⁹. Chez l'humain, les gènes initiateurs, effecteurs et régulateurs de ce passage restent élusifs.

Chez la CSH, des changements transcriptionnels semblent aussi se produire avec le vieillissement. Contre intuitivement, les cellules qui présentent un immunophénotype associé aux CSH semblent augmenter avec l'âge, tant chez l'humain ^{60,61} que chez la souris ^{62,63}. Ces CSH âgées démontrent une augmentation du temps entre les divisions ainsi qu'un débalancement dans le ratio de cellules commises. Les CSH âgées générées favorisant les cellules de type myéloïdes plutôt que lymphoïdes.

1.1.6 Isolation des CSH humains

Plusieurs tentatives visant à reprogrammer des cellules hématopoïétiques différenciées afin de générer des CSH de novo ont échoué ⁵⁵. L'isolation de CSH humaines à partir de différents échantillons physiologiques, tels que le sang de cordon ombilical, la moelle osseuse ou le sang périphérique après mobilisation par le GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor), reste l'un des meilleurs moyens afin d'en obtenir ²⁸ (voir figure 1-5).

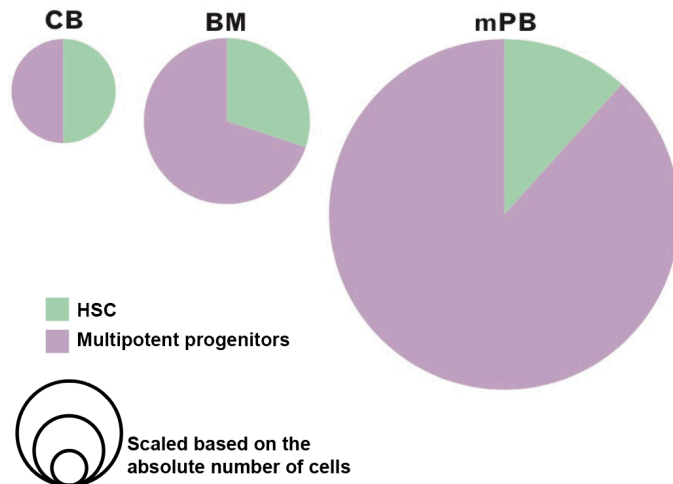


Figure 1-5 - Le nombre et la proportion de CSH est différentes selon le tissu.

Représentation du nombre et de la proportion des CSH selon le tissu. HSC : cellules souches hématopoïétiques (hematopoietic stem cells), CB : sang de cordon (cord blood), BM : moelle osseuse (bone marrow), mPB : sang périphérique mobilisé (mobilized peripheral blood). Figure adapté de Paul H. Miller et al²⁸.

La capacité d'étudier singulièrement les CSH est primordiale afin de bien saisir leurs propriétés et découvrir les mécanismes régulant de celles-ci. L'obtention d'une suspension cellulaire pure en CSH n'est toujours pas à la portée des techniques de laboratoire actuelles. N'ayant pas de marqueur de surface pouvant identifier spécifiquement une CSH à ce jour, la recherche doit se tourner vers des stratégies d'enrichissement par la sélection positive et négative de plusieurs marqueurs immunophénotypiques.

L'isolation de la fraction cellulaire CD34+ du sang de cordon permet d'obtenir une population cellulaire enrichie en CSH. Dans cette population leur fréquence est d'environ 1/1 000^{13,16,27}. Le meilleur schéma immunophénotypique caractérisant les CSH est : CD34+, CD38-, CD45RA-, CD90+, RHO^{low} et CD49f+⁶⁴. Cette stratégie de tri permet d'obtenir une population cellulaire présentant une fréquence de CSH se situant entre 14 et 28%. Puisque la CSH ne présente pas de marqueur immunophénotypique pouvant l'identifier, cette quantification est effectuée grâce à des essais de transplantation à dilution limite.

1.1.6.1 Quantification des CSH par essais fonctionnels

Puisque nous n'avons pas à notre portée un marqueur immunophénotypique unique servant à l'identification des CSH, leur quantification nécessite toujours des essais fonctionnels *in vivo*. La quantification des CSH par l'essai de transplantation à dilution limite (LDA : Limiting Dilution

Assay) se base sur la révélation des caractéristiques singulières des CSH telles que la multipotence ainsi que leur capacité d'autorenouveaulement ⁶⁵.

La LDA nécessite la transplantation d'une suspension cellulaire « test » à des dilutions croissantes dans des groupes de souris receveuses. Ces transplantations doivent être effectuées chez une souris permissive, c'est-à-dire sujette à une xéno greffe sans possibilité de rejet, puisque le rejet de la greffe par le système immunitaire murin fausserait le résultat. Dans le contexte où la LDA est effectuée afin de quantifier le nombre de cellules humaines au sein d'une suspension cellulaire, la souris la plus couramment utilisée pour ces essais est la souris NSG (Nod Scid Gamma null), vu son immunodéficiencce sévère.

Les souris sont euthanasiées 20 semaines suivant la transplantation et la moelle osseuse est récoltée. Ce délai est requis afin de quantifier les cellules émanant de la différenciation des CSH plutôt que des cellules progénitrices ^{28,66}. La suspension cellulaire obtenue est analysée par cytométrie en flux pour des marqueurs identifiant les cellules myéloïdes (CD33, CD11b) et lymphoïdes (CD19, CD3).

Une souris présentant des cellules myéloïdes et lymphoïdes humaines suivant ce délai est considérée comme « positive ». La probabilité de la reconstitution hématopoïétique des souris suit une distribution de Poisson et la quantification des CSH présentes dans la suspension initiale est généralement calculée sur la fraction des souris non-reconstituées (négatives).

1.1.7 Régulation épigénétique des CSH

L'étude des CSH est un défi vu la difficulté à obtenir une population pure ainsi que leur propension à se différencier en culture *in vitro*. Cette différenciation entraîne ainsi la perte de leurs propriétés d'autorenouveaulement et de multipotence. Cette perte de propriétés est largement attribuée à des changements épigénétiques chez la CSH en culture. Deux complexes protéiques, le groupe des Polycomb et le groupe Trithorax présentent des rôles antagonistiques quant à la régulation de l'expression des gènes impliqués dans le développement. Ces complexes régulent entre autres le locus des gènes *HOX*, un groupe important dans la régulation de l'hématopoïèse normale et fréquemment dérégulé chez les cellules leucémiques ⁶⁷⁻⁶⁹.

1.1.7.1 Les Polycombs

Les protéines du groupe polycombs interagissent avec la chromatine au sein de larges complexes multimériques appelés *Polycomb répressive complexe 1 et 2* (PRC1 et PRC2). Selon le modèle actuel, PRC2 se lie premièrement à l'ADN au site *polycomb-group reponse elements* (PRE) et entraîne la triméthylation de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27me3) via EZH1/2⁷⁰. Cette marque épigénétique entraîne la répression de la transcription des gènes avoisinants et le recrutement du PRC1. Ensuite, PRC1 induit l'ubiquitination H2AK11 depuis la sous-unité RING E3 ligase, stabilisant la répression des gènes cibles^{71,72}. De nombreuses protéines du groupe des polycombs sont retrouvées surexprimées au niveau des cellules matures comparativement aux cellules primitives CD34+⁷³. Cette augmentation est concomitante avec une réduction de l'expression des gènes *HOX* lors de la différenciation des cellules CD34+⁷⁴.

1.1.7.2 Les Trithorax

L'activité des polycombs est antagonisée par les protéines de la famille des Trithorax dont le gène *Trx*, l'homologue de *KMT2A* chez l'humain, est le membre fondateur. *KMT2A*, aussi connu sous le nom de *MLL* (Mixed Lineage Leukemia) est présent à la bande cytogénétique 11q23 et est souvent retrouvé réarrangé chez les cellules leucémiques. *KMT2A* présente le domaine protéique SET (Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste) pouvant apposer de un à trois groupes méthyl à la lysine 4 de l'histone 3 (H3K4me1-3). La méthylation de l'H3K4, et en particulier sa triméthylation, est associée avec une transcription active des gènes^{69,75,76}.

KMT2A interagit avec la chromatine au sein d'un groupe protéique appelé COMPASS (COMPLex ASSociated with Set) comprenant entre autres WDR5. Il est intéressant de noter que WDR5 ainsi que la marque H3K4me3 sont associés avec le recrutement du complexe NURF (NUclear Remodeling Factor) au niveau du cluster des gènes *HOX* afin d'en favoriser l'expression⁷⁷.

KMT2A est particulièrement important pour le développement embryonnaire. Sa perte chez l'embryon est létale et engendre une diminution du nombre de CFU au niveau du sac de vitellin et du foie foetal. Or, les cellules hématopoïétiques récoltées chez ces embryons de souris *Kmt2a*^{-/-} peuvent toujours arriver à une différenciation terminale⁷⁸. Lorsque l'ablation du gène *Kmt2a* survient chez une souris adulte ou que l'ablation du gène est restreinte au système

hématopoïétique lors de l'embryogenèse, celle-ci développe une insuffisance médullaire létale trois semaines après l'induction^{79,80}. Ces résultats semblent démontrer que *Kmt2a* est nécessaire au maintien de la capacité d'autorenouvellement de cellules multipotentes plutôt qu'à leur maturation.

KMT2A suscite un grand intérêt en leucémie. De plus, plusieurs protéines du complexe COMPASS se retrouvent associées avec l'activité régulatrice transcriptionnelle de la nucléoporine NUP98.

1.1.8 Les gènes *HOX*

Les gènes *HOX* codent pour des facteurs de transcription capables de lier l'ADN par leur homéodomaine, aussi appelé homéobox, hautement conservés à travers les espèces. Ces gènes sont essentiels puisqu'ils coordonnent l'organisation spatio-temporelle du développement embryonnaire⁸¹. Les gènes *HOX*, pour un total de 39 gènes, sont organisés au sein de quatre régions chromosomiques distinctes (Locus A : 7p14 n= 11, B : 17q21 n= 10, C : 12q12 n=9 et D : 2q31 n=9). De plus, 197 gènes supplémentaires contiennent un domaine homéobox et sont distribués de manière disparate sur le génome, tel que les gènes *DLX1-6* et *IRX1-6*. La spécificité des gènes *HOX* à lier différentes séquences d'ADN provient des différences peptidiques entre les homéodomains⁸².

1.1.8.1 Le rôle des gènes *HOX* lors de l'hématopoïèse

Les gènes *HOX* sont non seulement importants pour le développement coordonné de la structure morphologique de l'embryon, mais ils le sont aussi pour la régulation de l'hématopoïèse.

Les gènes *HOX* sont exprimés majoritairement chez les cellules immatures et diminuent tout au long de leur maturation⁸³. Des quatre groupes de gènes *HOX*, l'expression du groupe A semble caractériser les cellules les plus immatures de l'hématopoïèse murine tant au niveau de la moelle osseuse des souris qu'au niveau du foie fœtal. Pour sa part, les *Hox* du groupe B peuvent toujours être retrouvés exprimés chez les cellules myéloïdes matures⁸³. Seul le groupe D n'est pas exprimé au sein des cellules hématopoïétiques.

Plusieurs phénotypes ont été recensés concernant la surexpression des gènes *HOX* au niveau du système hématopoïétique. Notamment, la surexpression de *HOXA9* ou de *HOXA10* chez des cellules de la moelle osseuse murine entraîne à elle seule une leucémie myéloïde chez la souris

receveuse^{84,85}. Dans ces deux cas, le temps de latence est de 3 à 10 mois pour *HOXA9* et entre 5 à 12 mois pour *HOXA10*.

Malgré leur importance lors du développement, il est intéressant de noter que les gènes *HOX* ne semblent pas indispensables au développement des CSH. En effet, les souris *Hoxa9*^{-/-}, *Hoxa10*^{-/-} ou encore les souris dont près de la totalité du cluster B est manquant (*Hoxb1-9*^{-/-}), ne présentent pas d'insuffisance médullaire à la naissance⁸⁶⁻⁸⁸. Cependant, il est à noter que les souris *Hoxa9*^{-/-} n'arrivent pas à régénérer les cellules de la moelle osseuse perdues après irradiation et présentent une perte de compétitivité versus des cellules *Hoxa9*^{+/+} lorsque transplantées à une souris receveuse⁸⁶.

1.1.9 Les gènes *GATA1* et *GATA2*

GATA1 et *GATA2* font partie d'une famille composée de six gènes (*GATA1-6*) et sont d'un intérêt particulier dans la l'hématopoïèse normale et leucémique. Respectivement retrouvés sur le chromosome X et le chromosome 3, les protéines *GATA1* et *GATA2* présentent deux domaines juxtaposés d'interaction à l'ADN de type doigt de zinc. Le doigt de zinc en C-terminal permet la liaison aux motifs (A/T)GATA(A/G) alors que le doigt de zinc en N-terminal stabilise cette interaction⁸⁹. La partie en N-terminal, en amont des doigts de zinc permet l'association de *GATA1* avec *FOG1* (Friend of *GATA 1*), *RUNX1* (*RUNX* Family Transcription Factor 1) et *RB1* (*Retinoblastoma 1*)⁹⁰⁻⁹³.

Les gènes *GATA* sont importants pour l'expansion des CSH et le développement de la lignée mégacaryoblastique et de la lignée érythrocytaire. Les embryons murins *Gata1*^{-/-} et *Gata2*^{-/-} meurent d'une anémie sévère autour du jour E10^{94,95} et, contrairement aux souris *Gata2*^{-/-} qui présentent un déficit en HSPC, les souris *Gata1*^{-/-} contiennent plusieurs érythroblastes immatures bloqués en différenciation.

GATA2 est exprimé au niveau des cellules immatures hématopoïétiques de l'AGM et du foie foetal^{35,96}. Lors de la différenciation cellulaire, l'expression de *GATA1* abroge l'activité transcriptionnelle de *GATA2* en le déplaçant de ses sites de liaison à l'ADN et en réprimant son expression^{97,98}. Cette dynamique de diminution du niveau d'expression de *GATA2* concomitante à une augmentation de l'expression de *GATA1* est appelée « *GATA switch* »⁹⁹. Ce « *GATA switch* » ainsi que

l'association de GATA1 avec FOG1 sont essentiels au développement et à la maturation des progéniteurs érythroïdes et mégacaryoblastiques^{91,100}.

Ce « GATA switch » ne semble pas s'effectuer normalement chez les cellules AMKL induites par la fusion *CBFA2T3::GLIS2*. De plus, démontrant l'importance de GATA1 dans la différenciation cellulaire, le gain de fonction de GATA1 induit un biais de différenciation des progéniteurs myéloïdes vers la lignée mégacaryoblastique et la lignée érythroïde^{101,102} alors que sa perte entraîne un blocage dans la maturation de ces populations^{95,103}..

1.2 La leucémie

La leucémie est le cancer le plus répandu chez l'enfant de moins de 15 ans et présente une fréquence populationnelle de 3.51 cas sur 100,000 enfants au niveau mondial¹⁰⁴. La génération de cette pathologie est engendrée par le maintien de l'autorenouvellement cellulaire concomitante à un blocage dans la différenciation d'une HSPC. Ces défauts entraînent une augmentation de cellules immatures dans la moelle osseuse, et puisque celle-ci est un espace fini, les cellules leucémiques entrent en compétition avec les cellules normales pour l'espace. Lors d'une leucémie aiguë, les cellules leucémiques viennent à gagner cette compétition et entraînent une réduction marquée de l'hématopoïèse normale chez les patients. La perte de ces cellules normales au sein de la moelle osseuse entraîne plusieurs des aspects physiopathologiques associés aux leucémies tels qu'une thrombopénie, une anémie et une immunodéficience.

1.2.1 La classification des leucémies

Selon le stade de maturation de la HSPC à l'origine de la maladie, la leucémie est généralement classée en deux grands sous-groupes immunophénotypiques, soit myéloïdes ou lymphoïdes. Certaines leucémies peuvent être considérées comme biphénotypiques ou ambiguës, dans ce cas l'organisation mondiale de la Santé recommande l'appellation MPAL (Mixed Phenotype Acute Leukemia). Dans cette thèse, nous nous concentrerons sur les leucémies myéloïdes aiguës (LMA) et les leucémies lymphoïdes aiguës (LAL) retrouvées en pédiatrie.

Aujourd'hui la classification fine des leucémies est basée sur plusieurs critères notamment : la morphologie, l'immunophénotype, les anomalies cytogénétiques et la présence de mutations

caractéristiques, telles que la présence de transcrite chimérique causée par des translocations chromosomiques.

1.2.1.1 Les leucémies myéloïdes chroniques

Les leucémies peuvent être décrites selon leur caractère «aiguë» ou « chronique». Contrairement aux leucémies myéloïdes aiguës, l'examen cytologique de l'aspiration médullaire provenant de patients atteints d'une leucémie chronique présentera des cellules totalement différenciées ainsi qu'un contingent blastique plus ou moins imposant selon la phase de la pathologie; chronique ou blastique.

Dans le cas des leucémies myéloïdes chroniques, celles-ci sont caractérisées par la présence de la fusion *BCR::ABL*, générée par la translocation des chromosomes $t(9;22)(q34;q11.2)$, et n'ont qu'un blocage partiel de la différenciation^{105,106}. Chez ces patients, près de la totalité des mitoses présenteront la translocation *BCR::ABL*¹⁰⁶. Les leucémies myéloïdes chroniques sont retrouvées majoritairement chez la population adulte où elle représente environ 15% des nouveaux cas de leucémie avec une fréquence populationnelle de 2 par 100,000 personnes aux États-Unis¹⁰⁶. Bien qu'une leucémie myéloïde chronique peut-être identifiée chez un enfant, celles-ci sont très rares et représentent environ 2% de tous les cas de leucémies en pédiatrie¹⁰⁷.

1.2.1.2 La classification FAB

La classification FAB provient d'un groupe de sept hématologistes français, américains et britanniques désirant uniformiser la nomenclature de la leucémie. Cette classification avait pour but de mieux définir les différents sous-types de leucémie afin de trouver des corrélations avec la réponse aux traitements.

Les leucémies furent divisées en deux grands groupes : les leucémies lymphoïdes et les leucémies myéloïdes. De ceux-ci, les leucémies lymphoïdes furent subdivisées en trois sous-types (L1, L2 et L3) et les myéloïdes en six sous-types (M1 à M6)¹⁰⁸. Les leucémies étaient classées selon leur morphologie cellulaire ainsi que leur réaction à certaines colorations spécialisées, telles que la révélation des niveaux de la myéloperoxidase typiquement élevée chez certaines leucémies myéloïdes. Cette classification a subi plusieurs modifications à travers les années notamment

avec l'ajout des sous-types myéloïdes M0 et M7, respectivement décrite comme indifférenciée et mégacaryoblastique ^{109,110}.

La classification FAB est toujours utilisée de nos jours dans le langage scientifique courant afin de désigner un sous-type morphologique particulier. Cependant, cette nomenclature basée sur la morphologie a plusieurs limites.

1.2.1.3 La classification moléculaire

Raffiner la classification des leucémies permet une précision du diagnostic ainsi que l'identification des patrons de réponse liant les sous-types leucémiques aux réponses thérapeutiques. Plusieurs consortiums internationaux ont œuvré dans cette optique et aujourd'hui la classification des leucémies est chapeautée par l'Organisation mondiale de la Santé ¹¹¹. La précision du diagnostic a un impact direct sur le choix du traitement et permet d'éclairer l'approche thérapeutique grâce à une stratification du risque. L'avancement des biotechnologies et le traitement de large jeu de données par des approches bio-informatiques continuent de mener à la découverte de nouvelles mutations, précisant ainsi l'identité des sous-groupes leucémiques et autres désordres hématologiques. En plus de guider le choix thérapeutique, l'identification des différentes fusions et mutations est un atout important afin de suivre la réponse des patients aux traitements.

1.2.1.4 La cytogénétique

Peu de temps après l'adhésion à la nomenclature normalisée FAB, les analyses de cytogénétique ont permis d'identifier des réarrangements chromosomiques récurrents en leucémie ¹¹². À ce moment, seules les anomalies chromosomiques apparentes lors de l'examen des chromosomes en cytogénétique étaient décrites. Parmi celles-ci, nous retrouvons la trisomie 8, la monosomie 7 et les translocations $t(9;22)(q34;q11)$ et $t(15;17)(q24;q21)$, menant aux fusions BCR::ABL et PML::RARA respectivement ^{105,113}.

Les analyses utilisant le FISH (Fluorescence In Situ Hybridisation) permettent de plus facilement attester de la structure des chromosomes et ainsi repérer certaines translocations cryptiques. L'analyse par FISH a permis d'identifier plusieurs nouveaux réarrangements impliquant le gène KMT2A et *NUP98*. La plupart des gènes de fusions identifiés en leucémie présentent des

partenaires uniques, mais *KMT2A* et *NUP98* pour leur part, présentent chacun de multiples partenaires. *KMT2A* et *NUP98* furent retrouvés réarrangés avec plus de 100 et 30 partenaires différents respectivement ^{114,115}.

1.2.1.5 Le séquençage de l'ARN

L'arrivée du séquençage à haut débit de l'ADN et de l'ARN, toujours couramment nommé « Next Generation Sequencing » (NGS) malgré l'émergence actuelle de techniques plus récentes, a permis de séquencer l'entièreté du génome humain en 2001 ¹¹⁶. Cette avancée majeure a permis d'amasser une quantité colossale d'informations génétiques et a ouvert la voie à l'étude des cancers sous un nouvel aspect oncogénomique.

Le séquençage de l'ARN (ARNseq), aussi appelé Séquençage du transcriptome, permet de mesurer l'expression des gènes et permet d'identifier rapidement les réarrangements génétiques menant à des transcrits chimériques. Selon une récente estimation, un total de 1 118 gènes de fusion, dont 207 sont récurrents, furent identifiés en leucémies ^{117,118}.

Cette classification fine des leucémies est importante vu la différence des pronostics entre les groupes et sous-groupes génétiques, tels qu'exemplifiés par les fusions *KMT2A* dont le pronostic diffère selon le partenaire de fusion ¹¹⁹.

1.2.2 Les cellules souches leucémiques

1.2.2.1 Concept Historique

Le concept de clonalité tumorale est plus que centenaire. En effet, dès 1902, l'allemand Theodor Boveri a formulé l'hypothèse où le développement des cancers pouvait émaner de cellules aneuploïdes ¹²⁰. En 1914, Boveri écrivit un ouvrage, « *Concerning the Origin of Malignant Tumours* », qui encore aujourd'hui entre en concert avec notre vision des tumeurs malignes ^{121,122}. Dans cet ouvrage, Boveri décrit l'évolution des tissus normaux vers un état tumoral comme le résultat d'erreurs de réplifications stochastiques, rares et survenant au niveau cellulaire, plutôt que le résultat d'une transformation du tissu dans son ensemble. Puisant dans la théorie de l'hérédité mendélienne, cette réflexion décrit le concept de clonalité des tumeurs, où la cellule tumorale a la possibilité de passer son matériel génétique anormal vers ses descendantes. Boveri décrit aussi l'évolution tumorale comme un processus séquentiel. Il propose que les événements

stochastiques ayant entraîné l'évolution d'une cellule tumorale bénigne vers un état tumoral malin soient du même ordre que ceux qui ont généré la cellule tumorale bénigne depuis les cellules normales.

1.2.3 La transformation leucémique

Plusieurs des réflexions de Théodore Boveri sont toujours d'actualité en cancérologie. Dans notre contexte, l'évolution du tissu hématopoïétique sain vers l'état leucémique implique la transformation d'une cellule HSPC unique. Afin de générer une leucémie, cette transformation doit entraîner un blocage dans la différenciation cellulaire, le maintien de la capacité l'autorenouvellement ainsi que la génération soutenue de cellules filles ayant les mêmes propriétés. Ce processus peut survenir par étapes, avec l'acquisition de mutations et une sélection naturelle des clones les plus compétitifs (voir figure 1-6). Dans le contexte des leucémies pédiatriques, les transcrit chimériques sont des mutations à fort potentiel de transformation tumorale et souvent la seule mutation décelée chez un patient.

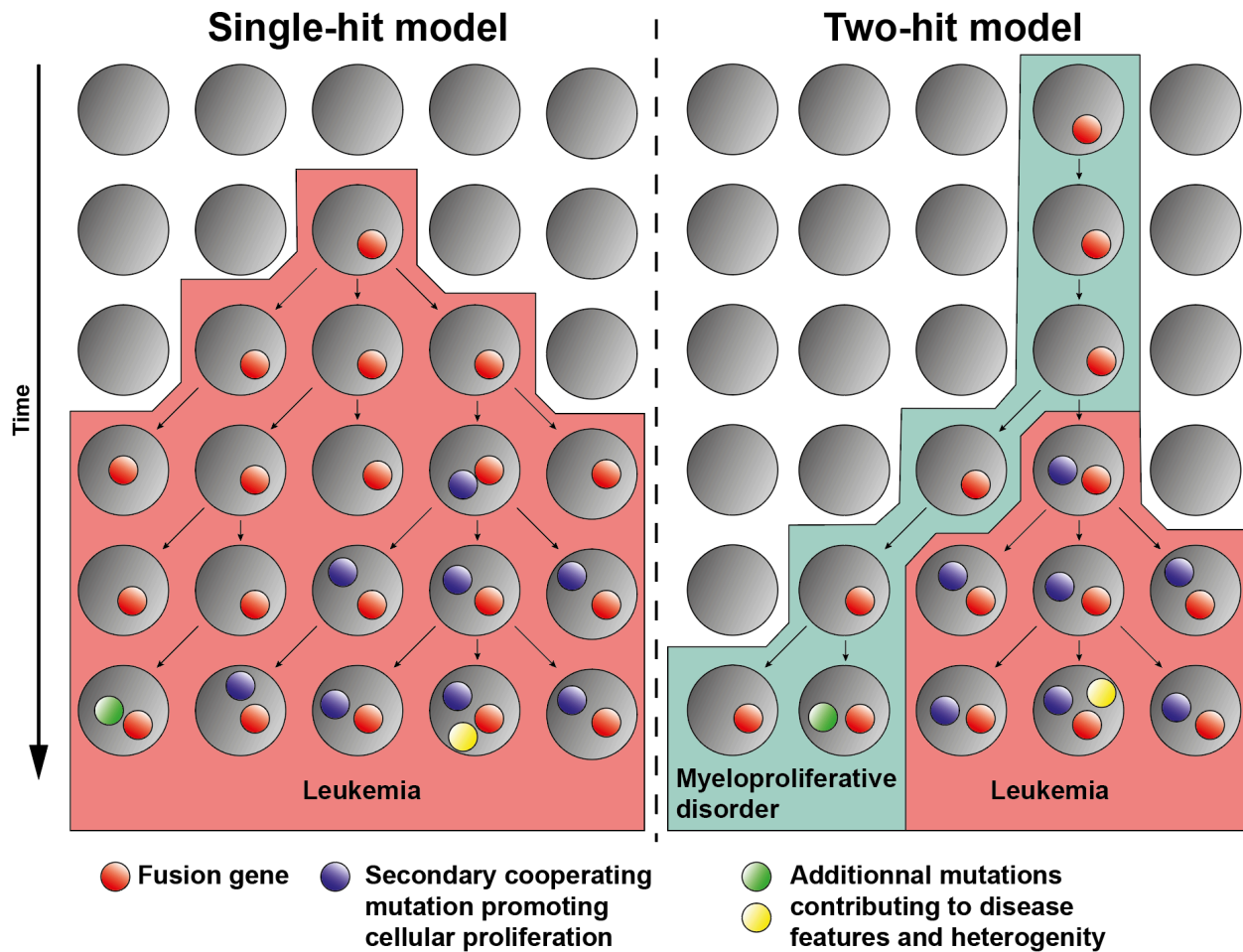


Figure 1-6 - Modèles «single hit» et «multi hits» d'évolution de la leucémie.

Dans le cas du modèle d'évolution leucémique « single hit », bien que des mutations secondaires peuvent apparaître, la présence d'un gène de fusion est suffisante à la transformation leucémique. Dans le cas du modèle « two hits », le gène de fusion nécessite une mutation secondaire afin d'entreprendre une rapide prolifération caractéristique à la leucémie. Dans les deux cas, plusieurs autres mutations peuvent apparaître entraînant une augmentation de l'hétérogénéité de la masse tumorale. Figure inspirée de David P. Steensma et al¹²³.

1.2.4 Les caractéristiques de la LSC

Le concept des cellules souches leucémiques (LSC) implique une certaine hiérarchie. À l'image de la CSH normale présente à l'apex de l'hématopoïèse et pouvant reconstituer l'entièreté du système hématopoïétique, la LSC est une cellule complètement transformée présentant à elle seule la capacité de générer une leucémie chez son hôte.

Les cellules souches leucémiques, maintenant une capacité d'autorenouvellement, peuvent générer des cellules filles ayant amorcé une différenciation vers une des branches terminales de l'hématopoïèse. Cette amorce de différenciation confère plusieurs aspects phénotypiques de la

leucémie chez un patient. Dans ce contexte hiérarchique, seule la LSC maintient la capacité à régénérer la leucémie.

Les LSC et les cellules leucémiques sous-jacentes peuvent être immunophénotypiquement identiques. Ainsi, leur identification tient dans leur capacité fonctionnelle à générer une leucémie chez son hôte. Un essai de transplantation à dilution limite peut donc être utilisé afin de déterminer la fréquence de LSC au sein d'un échantillon.

1.2.5 Les LAL

Survenant majoritairement entre 3 et 5 ans, la leucémie lymphoblastique aiguë (LAL) est le sous-type de leucémie le plus commun en pédiatrie ¹²⁴. Malgré un pronostic généralement favorable, avec plus de 90% de taux de survie, les LAL sont tout de même la cause d'un plus grand nombre de décès associés au cancer chez les moins de 20 ans ^{124,125}. Les LAL peuvent affecter les lignées cellulaires lymphoïdes B (LAL-B) et T (LAL-T) dans une proportion de 85 et 15 % en pédiatrie ¹²⁶.

Selon la nature des altérations génétiques présentes au diagnostic, les LAL-B pédiatriques peuvent être classées en différents sous-groupes. De ceux-ci nous retrouvons les LAL-B hautement aneuploïdes (>50 chromosomes) représentant environ 25% des cas ¹²⁷, les LAL-B présentant une translocation *ETV6::RUNX1* ainsi que les cas impliquant une fusion du gène *KMT2A*, retrouvés dans environ 25% et 5% des cas respectivement ^{126,128}. Il existe un grand écart au niveau du pronostic entre ces sous-types ce qui reflète l'importance de la précision du diagnostic.

De manière intéressante, près de 2 à 3% des cas de LAL-B présentent des translocations génétiques impliquant la région promotrice de la chaîne lourde ou légère de l'immunoglobuline ¹²⁹. Ces translocations entraînent une expression anormalement élevée du gène retrouvé en 3' du promoteur. De telles translocations chez les LAL-B ont été décrites pour entraîner la surexpression de C-MYC, CRLF2 et EPOR ¹³⁰⁻¹³².

L'amélioration du taux de survie des patients ayant une LAL peut être attribuée en grande partie aux raffinements des connaissances en oncogénétique. Ces connaissances sont précurseurs à l'émergence des thérapies ciblant les voies signalétiques dérégulées et à la génération de tests de laboratoire diagnostique.

1.2.6 Les LMA pédiatriques

Les leucémies myéloïdes aiguës (LMA) représentent près de 20% des nouveaux cas de leucémie pédiatrique diagnostiquée ¹³³. Son diagnostic dans la population générale suit une courbe bimodale avec une fréquence plus élevée chez le nouveau-né (1.5 cas par 100,000, < 1 an) que chez l'enfant entre 5 et 9 ans (0.4 cas par 100,000 personnes). Le risque de LMA augmente ensuite graduellement avec l'âge pour atteindre environ 16.2 cas par 100,000 personnes chez l'adulte de plus de 65 ans. Tous sous-types confondus, les LMA représentent 15 à 20% des leucémies pédiatriques avec un taux de survie et de rechute d'environ 70% et 30% respectivement ¹³³.

La LMA pédiatrique est une maladie très hétérogène et la présence de gènes de fusion mutuellement exclusifs en est un point saillant. Parmi les fusions les plus récurrentes en LMA pédiatrique, nous retrouvons les fusions impliquant KMT2A, NUP98, CBFA2T3::GLIS2 ainsi que RUNX1::RUNX1T1 ^{134,135}. Il est intéressant de noter que KMT2A est réarrangé dans près de 70% des LMA du nourrisson. Le complexe protéique formé par KMT2A réarrangé s'apparente à celui généré par les fusions impliquant NUP98.

Les LMA présentent l'un des niveaux de mutations somatiques les plus faibles de tous les cancers, tant chez l'adulte que chez l'enfant ^{134,136}. Cependant, certaines mutations coopératrices peuvent être présentes au diagnostic ou apparaître lors de la rechute. Parmi les gènes les plus couramment mutés en LMA pédiatrique on retrouve les gènes *RAS*, *KIT*, *WT1*, *FLT3*, *CBL* et *GATA2*.

1.2.6.1 Les leucémies mégacaryoblastiques

La leucémie mégacaryoblastique aiguë (AMKL) est un sous-type de LMA correspondant à la classification FAB : M7. Les AMKL sont normalement reconnaissables grâce à leur immunophénotype comparable aux mégacaryocytes normaux. Celles-ci sont majoritairement positives aux marqueurs CD41, CD61 et CD42a-c. Ce sous-type particulier survient majoritairement chez les enfants en bas âge, avec une médiane d'âge au diagnostic de 1.5 an ¹³⁷. L'AMKL est retrouvée très rarement chez l'adulte avec une fréquence de 0.6% des LMA chez les patients de plus de 15 ans ¹³⁸.

Les AMKL peuvent se différencier en deux sous-groupes majeurs, soit : les AMKL associées à un syndrome de Down (DS), et les AMKL qui ne sont pas associées à un DS. Cette distinction est importante vu la grande disparité du pronostic entre les deux sous-types.

1.2.6.2 La leucémie mégacaryoblastique associée au syndrome de Down

Environ 30% des patients présentant une trisomie 21 à la naissance, également connue sous le nom de syndrome de Down, développeront une mutation caractéristique du gène *GATA1*¹³⁹. Cette mutation entraîne la génération d'une version courte de *GATA1* (*GATA1s* : *GATA1short*) dont les 83 premiers acides aminés en N-terminal sont manquants^{139,140}. Plus d'une mutation peut entraîner la génération de ce variant court¹⁴⁰. Ce variant plus court n'a plus la capacité de s'associer avec *FOG1*, *RUNX1* et *RB1*⁹⁰⁻⁹³. La présence de ce variant *GATA1s* entraîne une augmentation de la prolifération des cellules progénitrices mégacaryoblastiques au niveau embryonnaire ainsi qu'*in vitro*^{141,142}.

Les patients DS et qui expriment *GATA1s* développeront un désordre myéloprolifératif transitoire (DMT) qui se va se résoudre de manière spontanée et sans traitement dans la majorité des cas¹⁴³. Toutefois, environ 15 à 20% des patients avec un DMT vont évoluer vers une forme plus agressive d'AMKL^{144,145}.

L'évolution du phénotype depuis le DMT vers la leucémie est associée par l'acquisition de mutations complémentaires, notamment au niveau des gènes: *NRAS*, *CTCF*, *EZH2*, *JAK1*, *JAK2* et *MPL*¹⁴³. Quelques très rares cas, pour l'instant anecdotiques, de DS vont développer une leucémie concomitante à l'expression d'un transcrite chimérique retrouvé chez les non-DS-AMKL¹⁴⁶. À ce jour, il n'est pas possible de prédire quels seront les patients qui vont transiter depuis le DMT vers la leucémie aiguë.

1.2.6.3 Non-DS-AMKL

1.2.6.3.1 Fusions récurrentes et niveau de risque

Contrairement aux DS-AMKL et aux autres sous-types de LMA, les non-DS-AMKL pédiatriques sont un sous-groupe particulier qui présentent un pronostic plus sombre¹⁴⁷. Les non-DS-AMKL (maintenant : AMKL) présentent différents transcrits chimériques récurrents et mutuellement

exclusifs. De ceux-ci; *CBFA2T3::GLIS2* (CG2), *NUP98::KDM5A* (N5A), *RBM15::MKL1* ainsi que les fusions impliquant le genre *KMT2A* (*KMT2Ar* : *KMT2A* réarrangé) comptent pour environ 18%, 11.5%, 10.2% et 17.2% de cas respectivement ¹⁴⁸. Les AMKL présentant les fusions CG2, N5A et *KMT2A2r* forment un sous-groupe d'AMKL ayant les plus hauts risques de mortalité ^{149,150}.

L'identification des mutations récurrentes est primordiale à la stratification du risque encouru par les patients ayant une AMKL. Dans cette optique, plusieurs cas d'AMKL pédiatriques restent à définir. Les techniques de FISH peuvent parfois permettre d'identifier *NUP98* ou *KMT2A* comme étant muté, mais sans révéler le partenaire de fusion. Le séquençage à haut débit permettant l'identification des transcrits chimériques est un atout majeur dans ce contexte.

1.2.6.3.2 Aspect particulier de la maladie

Les AMKL présentent un nombre plus élevé d'anomalies chromosomiques (CNA : Copy Number Alteration) comparativement aux autres LMA pédiatriques. Effectivement les LMA non-AMKL présentent un nombre moyen de CNA de 1.76 par patient alors que ce nombre atteint 9.33 chez les patients AMKL ¹⁵¹. Toutefois, les patients exprimant la fusion *CBFA3T3::GLIS2* (CG2) positifs tendent à présenter un caryotype normal comparativement aux autres sous-types d'AMKL ¹⁵⁰.

En plus de la présence de gènes de fusion, les non-DS-AMKL sont associées avec certaines mutations coopératives, dont la plupart sont aussi retrouvées chez les DS-AMKL. Les gènes les plus souvent mutés chez les non-DS-AMKL sont : *GATA1*, *MPL*, *NRAS*, *CTCF* et *JAK2*. Ici aussi, les AMKL CG2 positives ne présentent que peu de mutations somatiques comparativement aux autres sous-groupes d'AMKL ¹⁴⁸.

Les AMKL présentent un programme transcriptionnel grandement influencé par le gène chimérique qu'elles expriment ¹⁴⁸. L'expression des gènes *HOX* est un exemple de la disparité entre les groupes AMKL. Contrairement à la fusion CG2, la présence d'une fusion *NUP98r* ou *KMT2Ar* est associée avec une augmentation de l'expression des gènes *HOX*, plus particulièrement *HOXA9* et *HOXA10*, tout comme des cibles de *HOXA9* ^{137,148}.

1.2.7 Les modèles leucémiques

Plusieurs défis se dressent face à l'étude des AMKL. La rareté des cas, la petite taille des patients ainsi que la présence d'une myélofibrose, rendant la ponction de moelle osseuse laborieuse, font en sorte qu'il est difficile d'obtenir une quantité abondante de cellules leucémiques. La création de modèles a pour but de pallier ce manque.

Plusieurs modèles de leucémie existent, mais afin d'être utiles, ceux-ci doivent répondre à trois critères primordiaux. Premièrement, les modèles doivent recréer fidèlement la maladie telle que vue chez les patients. La comparaison des programmes transcriptionnels entre le modèle leucémique et les cellules provenant de patients est une des manières de s'en assurer. Deuxièmement, le modèle leucémique doit être simple d'utilisation afin de générer la biomasse nécessaire aux besoins de la recherche. Finalement, le modèle doit être stable afin de permettre la mesure répétée des paramètres d'une expérience.

Dans le but d'obtenir un modèle leucémique, plusieurs stratégies sont envisageables. La manière la plus simple et potentiellement la plus efficace est la xénotransplantation de cellules de patient (PDX : Patient Derived Xenotransplantation) chez la souris immunodéficiente. Alors que le maintien des cellules leucémiques de patient *in vitro* entraîne généralement leur différenciation spontanée, la transplantation chez la souris des échantillons de patients permet l'exposition du greffon à une myriade de facteurs biologiques et d'interactions cellulaires avec la niche qui sont encore à ce jour inconnue ou qui sont difficiles à recréer *in vitro* ^{14,152,153}.

Les modèles de transformation de cellules normales vers l'état leucémique, appelés ci-dessous « modèles synthétiques », sont plus complexes à générer. Premièrement, la population cellulaire utilisée lors des essais de surexpression doit être définies. Un protocole de surexpression d'un oncogène, tel un gène chimérique, chez des populations cellulaires différentes peut générer différents types de leucémies ^{154,155}. Ceci est aussi exemplifié par le fait que, bien que les fusions *KMT2A::MLLT3* et *KMT2A::MLLT10* soient retrouvées chez des patients atteints d'une AMKL, la surexpression de ces oncogènes dans des cellules hématopoïétiques normales entraîne la création de modèle leucémique de type LAL et AML sans générer d'AMKL ^{148,156-158}. Puisque ces modèles sont issus de cellules saines, cette approche rend possible la génération de modèles

leucémiques provenant de différents donneurs. Cet avantage permet de réduire le biais associé à l'étude d'un modèle issue d'un donneur unique et est plus représentatif de la diversité génétique retrouvée dans la population.

Tableau 1-1 - Liste des tentatives de modélisation de leucémie induites par les fusions *NUP98::KDM5A*, *NUP98::BPTF* et *CBFA2T3::GLIS2*.

Fusions et mutations secondaires	Espèce	Méthode	Cellules d'origine	Résultat	Pénétrance	Transpl. sériée	Ref
NUP98::KDM5A	Murin	Transduction	Moelle osseuse	AML	12/12	NM	159
NUP98::KDM5A	Humain	PDX	Patient	AMKL	4/4	Oui	160
NUP98::KDM5A	Humain	Transduction	CB-CD34+	AMKL, AML, LAL-B et LAL-T	25/69	Oui	Chap. 3 ¹⁶¹
NUP98::BPTF	Humain	PDX	Patient	AMKL	3/3	Oui	Chap. 3 ¹⁶¹
NUP98::BPTF	Humain	Transduction	CB-CD34+	Myéloprolifération	3/43	Non	Annexe chap. 3
CBFA2T3::GLIS2	Murin	Transduction	Moelle osseuse	Tentative échouée	NA	NA	162
CBFA2T3::GLIS2	Humain	PDX	Patient	AMKL	2/5	Oui	160
CBFA2T3::GLIS2	Murin	Transduction	Moelle osseuse	Tentative échouée	NA	NA	163
CBFA2T3::GLIS2	Murin	Transduction	Moelle osseuse	Tentative échouée	NA	NA	164
CBFA2T3::GLIS2	Murin	Transduction	Cellules foie foetal	AMKL	NM	NM	165
CBFA2T3::GLIS2	Murin	Transduction	Lin-	Tentative échouée	0/9	NA	166
CBFA2T3::GLIS2 +JAK2-V617F	Murin	Transduction	Lin-	AMKL	3/13	Oui	166
CBFA2T3::GLIS2	Human	PDX	Patient	AMKL	NM	Oui	166
CBFA2T3::GLIS2	Human	Transduction	IPS	Tentative échouée	NA	NA	167
CBFA2T3::GLIS2	Human	Translocation médiée par CRISPR	IPS	AMKL	100%	Oui	Poster ISEH 2022
CBFA2T3::GLIS2	Humain	Transduction	CB-CD34+	AMKL	6/10	Oui	Chap. 4 ¹⁶⁸
CBFA2T3::GLIS2	Humain	Transduction	CB-CD34+	AMKL	4/4	Oui	169

NM: Non mentionné dans l'article, NA : Non applicable

La création de modèles mégacaryoblastiques humains semble généralement être plus ardue que les LMA. Cela peut être exemplifié par les tentatives échouées de modélisation d'AMKL initiées par CG2 (voir tableau 1-1).

Le fait que les leucémies de l'enfant ne présentent que très peu de mutations secondaires suggère que les différentes protéines de fusions soient suffisantes pour la transformation leucémiques.

Cependant, les difficultés rencontrées lors de la modélisation par une approche de surexpression sont nombreuses, tel que démontré par les tentatives infructueuses de modéliser les AMKL. Il est difficile d'exclure la possibilité qu'une mutation coopérative soit nécessaire à la transformation leucémique engendrée par un oncogène chimérique. De plus, les tentatives de modélisation de leucémies humaines en utilisant la souris comme hôte peuvent se heurter à des différences inter espèces encore incomprises.

1.3 La transformation leucémique engendrée par *KMT2Ar*, *NUP98r* et *CBFA3T3::GLIS2*

L'identification des translocations génétiques générant des oncogènes chimériques chez les patients leucémiques permet une meilleure stratification du risque. De plus, dans la plupart des cas, les cellules leucémiques qui réapparaîtront lors d'une rechute présenteront la fusion initialement trouvée au diagnostic. Sa détection par RT-PCR permet d'identifier rapidement la réapparition de la maladie. Une bonne compréhension du point de fusion, ainsi que des potentiels transcrits générés par épissage alternatif, permet d'éviter les faux négatifs lors du suivi par RT-PCR.

Dans cette section, seront détaillés les mécanismes à l'origine de la génération de transcrits chimériques, ainsi que la description des complexes associés aux fusions impliquant *KMT2A*, *NUP98* et *CBFA2T3::GLIS2*.

1.3.1 Mécanisme de génération des fusions

1.3.1.1 Les bris double brin

La majorité des translocations surviennent suivant la réparation erronée d'un bris double brin (BDB) de l'ADN. Le risque qu'un gène présente des BDB et qu'il soit impliqué dans une translocation génomique est directement proportionnel à sa taille¹⁷⁰. Dans le même ordre d'idée, ce qui augmente les chances de générer des BDB augmente aussi les chances de générer des translocations chromosomiques. Par exemple, l'utilisation d'inhibiteurs de topoisomérase tel que les anthracyclines, couramment utilisés en oncologie, entraîne la génération de BDB. Ces agents sont aussi associés à la génération de translocations impliquant le gène *KMT2A* pouvant entraîner des leucémies secondaires au traitement¹⁷¹.

Afin de générer une translocation chromosomique, deux BDB doivent survenir au même moment et de manière rapprochée dans l'espace ¹⁷². Il est estimé qu'une cellule humaine produit environ 50 BDB par divisions cellulaires ¹⁷³. Une grande partie des BDB sont causés par les radicaux libres naturellement produits par la cellule ainsi que la radiation présente dans notre environnement ¹⁷⁴.

Différents facteurs de stress peuvent aussi être à l'origine de BDB. Lors des étapes initiales de l'apoptose, le clivage de l'ADN est favorisé au niveau de sites spécifiques. KMT2A présente un tel site de coupe au niveau de la région BCR ce qui explique en partie le nombre de réarrangements chromosomiques l'impliquant ^{175,176}. Selon ce modèle, l'apoptose serait initiée et ensuite avortée. La réparation des coupes initiales entraîne une augmentation importante du risque d'erreur menant à des translocations chromosomiques.

Une erreur de ségrégation des chromosomes survenant lors de la mitose peut aussi générer des BDB. Les nouvelles cellules filles peuvent alors se retrouver avec un bout de chromosome brisé suivant la cytokinèse. Cette aneuploïdie peut mener à la génération de translocations chromosomiques non balancées ¹⁷⁷.

1.3.1.2 Mécanismes impliqués dans la génération de translocations

La réparation d'un BDB peut survenir de deux manières, soit par la reconnexion de deux brins libres sans contrôle pour l'homologie du site de réparation (NHEJ : Non Homologous End Joining) ou par la recombinaison homologue (RH) des brins libres. La rapidité de la réparation de ces BDB ainsi que la réparation par RH sont des facteurs protecteurs contre la génération de mutations. Bien que la majorité des cas de translocation génétique soient générés par la reconnexion de deux brins libres par NHEJ ¹⁷⁸, il existe de rares occasions où la réparation des BDB par RH fut identifié comme étant à l'origine de translocations chromosomiques ¹⁷⁹.

La recombinaison VDJ est un processus survenant chez les cellules progénitrices lymphocytaires permettant la génération d'une grande diversité d'anticorps. Contrairement aux mécanismes de réparation de l'ADN permettant la réapparition une section d'ADN avec sa partie originelle, la recombinaison VDJ a pour but d'unir deux séquences d'ADN qui n'étaient pas originellement jointes. Lors d'erreur, la recombinaison VDJ peut entraîner la formation de translocations

chromosomiques. Les fusions générées ainsi impliquent majoritairement le locus de la chaîne lourde de l'immunoglobuline et mènent à la surexpression de son partenaire de fusion, tel que *MYC*¹⁸⁰⁻¹⁸².

L'analyse de 1700 points de fusion récurrents en leucémie et lymphome a pu démontrer que les îlots CpG peuvent aussi être à la source de translocations chez les progéniteurs lymphocytaires B. Effectivement, la désamination spontanée de la méthylcytosine au niveau d'un motif CpG entraîne un mésappariement de l'ADN. Cette mutation peut ensuite recruter l'endonucléase RAG1/2 et engendrer un BDB. Ce mécanisme est associé avec la majorité des translocations t(14;18)(q32;q21) et t(11;14)(q13;q32), impliquant *BCL2* et *BLC1* respectivement¹⁸³.

Plusieurs autres mécanismes peuvent générer des transcrits chimériques tel que les insertions/délétions, les inversions intrachromosomiques et les *read-throughs*¹⁸⁴. La génération de la protéine chimérique DHH::RHEBL1, retrouvée chez près de la moitié des patients ayant une leucémie mégacaryoblastique CG2 positive, est un exemple de *read-through* qui n'implique pas de mutation au niveau de la structure chromosomique¹⁸⁵. Effectivement, *DHH* et *RHEBL1* sont retrouvés côte à côte au niveau du chromosome 12 et la génération du transcrit *DHH::RHEBL1* est induite par épissage d'ARN chimérique.

1.3.1.3 Les fusions impliquant KMT2A

Les translocations impliquant *KMT2A* sont couramment retrouvées dans les leucémies de patient, plus particulièrement chez les nourrissons et indépendamment du sous-type morphologique¹⁸⁶. Cette caractéristique a valu à *KMT2A* le nom de «MLL» pour Mixed Lineage Leukemia¹⁸⁷. L'activité méthyltransférase est une fonction caractéristique de la famille des protéines Trx, dont *KMT2A* fait partie.

La majorité de ces translocations ont lieu au niveau d'une portion du gène appelé BCR (Break Point Cluster Region). *KMT2A* ainsi tronqué retient au niveau N-terminal plusieurs sites d'interaction à l'ADN, tel que trois domaines AT-Hook, et d'interaction protéine-protéine permettant à *KMT2A* d'interagir avec MEN1 et LEGF. La délétion des domaines AT-Hook et des signaux de localisation nucléaire (SNL) entraîne une diminution des niveaux d'expression des gènes *HOX*⁷⁹ (voir figure 1-7).

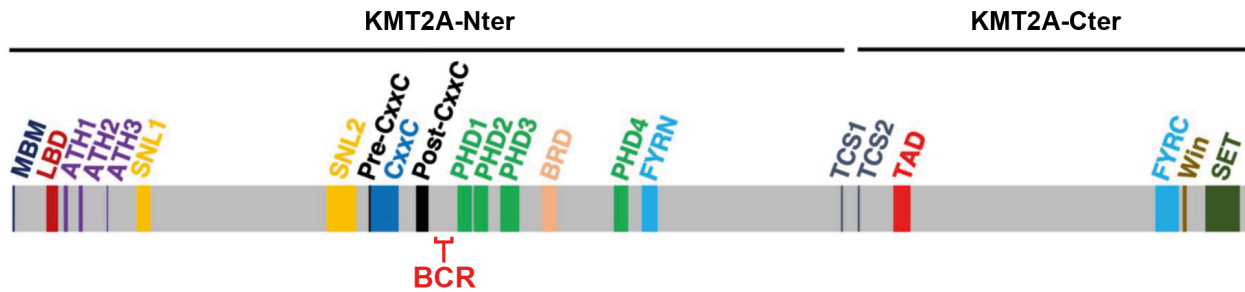


Figure 1-7 - Schéma de la structure de KMT2A.

KMT2A est une large protéine de 3969 acides aminés présentant plusieurs sites d'interaction avec l'ADN (ATH : AT-Hook, CxxC domain) et la chromatine (BRD : bromodamine, PHD : Plant homéodomaine). Menin s'associe à KMT2A au site MBM (Menin Binding Motif) alors que LEDGF interagit avec le domaine LBD (LEDGF Binding Domain). La majorité des translocations ont lieu au niveau de la région BCR (Breakpoint Cluster Region). KMT2A présente deux sites de clivages engendrés par la taspase (TCS1/2 : Taspase clivage site 1 and 2). KMT2A-N et C-terminal se réassocie ensemble. Le domaine SET est responsable de l'activité méthyltransférase de KMT2A. Figure adaptée de Anthony K. N. Chan et Chun-Wei Chen¹⁸⁸.

1.3.2 Mécanisme de transformation de KMT2Ar

1.3.2.1 Les interactions communes entre KMT2A wt et réarrangé

KMT2A recrute plusieurs complexes protéiques à la chromatine. Depuis sa région N-terminal, conservée chez KMT2A réarrangé (KMT2Ar), KMT2A recrute MEN1 (Multiple endocrine neoplasia 1) et LEDGF (Lens epithelium-derived growth factor 1) alors que sa partie C-terminale recrute les complexes COMPASS (COMPLEx Associated with SET) et NSL (Non Specifically Lethal).

Initialement identifiés dans le contexte entourant la protéine KMT2A, ces complexes sont aussi impliqués dans le cas de la leucémogénèse induite par les fusions NUP98.

1.3.2.2 Les interactions de KMT2A

Puisque KMT2A s'associe avec NUP98 wt ou réarrangé, il est important de comprendre la fonction de KMT2A ainsi que les complexes protéiques qui lui sont reliés.

La portion N-terminale de KMT2A interagit avec MEN1 et le variant long de LEDGF (LEDGF/P75)¹⁸⁹. Ces interactions sont nécessaires à la leucémogénèse tout comme le maintien de l'expression élevée du locus des gènes *HOXA* et son cofacteur *MEIS1*¹⁸⁹⁻¹⁹¹. Selon le modèle actuel, MEN1 et LEDGF recrutent KMT2A au site actif de la chromatine H3K36me depuis le domaine PWWP de LEDGF¹⁹². Une diminution de l'expression de MEN1 ou de LEDGF chez les cellules leucémiques entraîne une réduction de l'expression du locus des gènes *HOXA* et de *MEIS1*, permettant ainsi aux cellules de franchir le blocage dans leur différenciation^{190,193}. Ces interactions avec MEN1 et

LEDGF sont conservées chez les différentes fusions impliquant KMT2A et ont encouragées le développement d'inhibiteurs de MEN1.

1.3.2.3 Les interactions de KMT2A avec COMPASS et NSL

Depuis sa portion C-terminale, KMT2A interagit avec les complexes protéiques COMPASS et NSL (voir figure 1-8). Les composantes ASH2L, RBBP5 et WDR5 sont des sous-unités conservées aux complexes COMPASS ¹⁹⁴. Dans ce contexte, l'interaction de KMT2A avec WDR5 permet à KMT2A de reconnaître l'H3K4 et d'en induire la méthylation (mono-, di- ou triméthylation) depuis son domaine SET ¹⁹⁵⁻¹⁹⁷. Cette sous-unité, WDR5, est partagée entre les complexes COMPASS et NSL (Non-Specific Lethal). Pour sa part, le complexe NSL comprend l'acétyltransférase MOF ou MOZ responsable de l'acétylation de H4K16 ¹⁹⁸. L'acétylation de l'H4K16 ainsi que la triméthylation de l'H3K4 sont deux marques associées avec la transcription active des gènes, dont le locus des gènes *HOXA* ¹⁹⁸.

Des études récentes de résonance magnétique nucléaire ont permis de démontrer que LEDGF forme un dimère au niveau de la chromatine et que chacune de ces deux protéines LEDGF aurait le potentiel d'accommoder un complexe LEDGF-MENIN-KMT2A¹⁹⁹. Il est aussi intéressant de noter que KMT2Ar nécessite la présence de KMT2Aw afin d'induire la transcription de *HOXA9* ^{200,201}. Ce potentiel rapprochement stérique entre deux complexes LEDGF-MENIN-KMT2A, wild type ou réarrangé, ajoute un niveau de complexité quant à la régulation de l'expression génique des cellules leucémique présentant une fusion KMT2Ar.

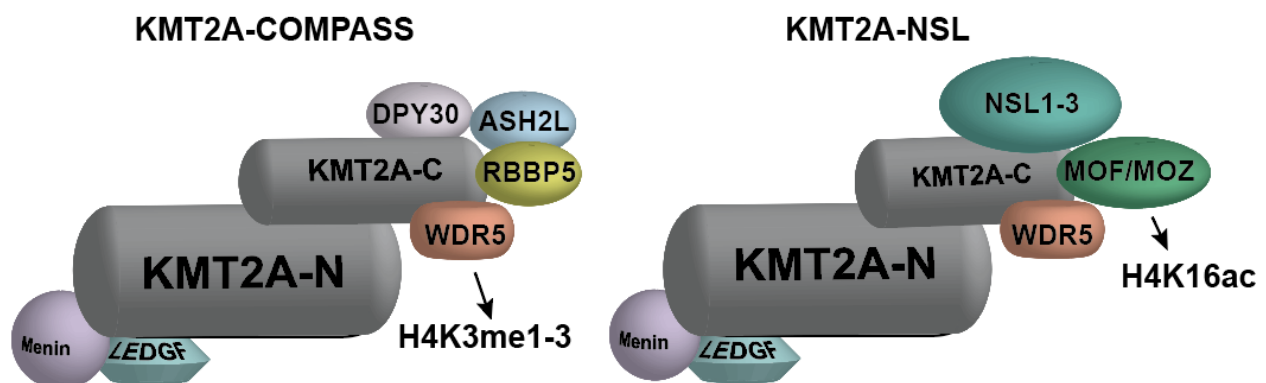


Figure 1-8 - Représentation des complexes interagissant avec KMT2A.

En plus de Menin et LEDGF, les complexes COMPASS et NSL interagissent avec la partie C-terminal de KMT2A. La sous-unité WDR5 est conservée entre ces deux complexes. Certaines protéines ne sont pas représentées par souci de clarté. Figure adaptée de Anthony K. N. Chan et Chun-Wei Chen¹⁸⁸.

1.3.3 Les fusions du gène NUP98

1.3.3.1 Les rôles de NUP98 wild type

Le pore nucléaire est composé d'une trentaine de protéines différentes nommées les NUPs (Nucleoporins). Les NUPs forment un complexe octogonal d'environ 120 mégadaltons au niveau de la membrane nucléaire permettant l'échange entre le milieu cytoplasmique et le nucléoplasme. NUP98 fut premièrement identifié comme une composante du pore nucléaire où il régule le trafic depuis ses motifs répétitifs GLFG (Glycine-leucine-phénylalanine-glycine) et leurs interactions avec les karyophérines, une classe de protéines interagissant avec l'ARN messenger, l'ARN ribosomal ainsi que différentes protéines afin de permettre leur transport entre le cytoplasme et le noyau ²⁰²⁻²⁰⁴.

NUP98 est aussi normalement retrouvé au niveau de la chromatine formant des structures dynamiques appelées corps GLFG pouvant recruter l'ARN polymérase 2 ²⁰⁵⁻²⁰⁷. Ces interactions entre NUP98 et l'ARN polymérase 2 surviennent au niveau des régions transcriptionnellement actives de la chromatine ²⁰⁵. Au sein du noyau, NUP98 est une protéine très mobile qui se déplace rapidement entre les corps GLFG et la membrane nucléaire. L'utilisation d'actinomycine D, une molécule se liant à l'ADN pour en réduire la transcription, entraîne une réduction de la vitesse de déplacement de NUP98 entre les corps GLFG suggérant un lien entre la transcription active et la mobilité de NUP98 au sein du nucléoplasme ²⁰⁷.

1.3.3.2 Les partenaires de fusion de NUP98

Tout comme KMT2A, la nucléoporine NUP98 peut être fusionnée (NUP98r : NUP98réarrangé) à une multitude de partenaires (>30 partenaires connus) chez différents sous-types FAB de leucémie ^{115,161,208,209}. Bien que des fusions impliquant NUP98 ont été retrouvées chez des patients atteints de leucémie LAL-T, leur identification chez les patients présentant une LAL-B reste anecdotique ²¹⁰.

Certains partenaires de fusion sont associés avec un sous-type particulier de leucémie. Par exemple, la fusion NUP98::NSD1 est généralement retrouvée chez les patients atteints d'une leucémie promyélocytaire alors que la fusion NUP98::KDM5A est associée aux leucémies myélomonocytaire et mégacaryoblastique.

Les partenaires de NUP98 peuvent se regrouper en trois sous-groupes qui se distinguent par les domaines composant la fraction fusionnée à NUP98. Parmi ceux-ci nous retrouvons les domaines homéobox, de liaison à la chromatine dont la majorité sont des domaines PHD et des bromodomaines, les motifs coiled-coils ainsi qu'une catégorie «autre»²¹¹. Bien que NUP98 est majoritairement retrouvée fusionnée avec des protéines présentant un domaine Coiled-coil, les mécanismes leucémogéniques impliquant ce domaine sont toujours mal compris^{211,212} (voir figure 1-9).

1.3.3.3 Mécanismes de leucémogénèse induits par les fusions NUP98

Tel que mentionné précédemment, NUP98 et NUP98r peuvent interagir avec plusieurs composantes des complexes associés à KMT2A tels que les complexes COMPASS et NSL. Ces interactions laissent présager un potentiel mécanisme leucémogénique partagé entre ces gènes de fusion.

Contrairement à NUP98wt, qui se retrouve majoritairement au niveau de l'enveloppe nucléaire, les fusions impliquant NUP98 se retrouvent de manières prédominantes au niveau de la chromatine²¹³. La surexpression de NUP98 fusionné à des domaines de reconnaissance de la chromatine ou à un homéodomaine, tel que NUP98::KDM5A ou NUP98::HOXA9, chez des cellules immatures hématopoïétiques, entraînent une augmentation de l'expression des gènes *HOXA9*, *MEIS1* et *PBX1*^{159,161,214}.

Puisque la portion N-terminale de NUP98 est conservée entre les différentes fusions l'impliquant et que cette portion permet à NUP98 de s'associer avec la machinerie transcriptionnelle, il semble probable qu'il existe un mécanisme leucémogénique unifiant les différentes fusions de NUP98. La découverte d'un tel mécanisme permettrait potentiellement le développement de thérapies ciblées.

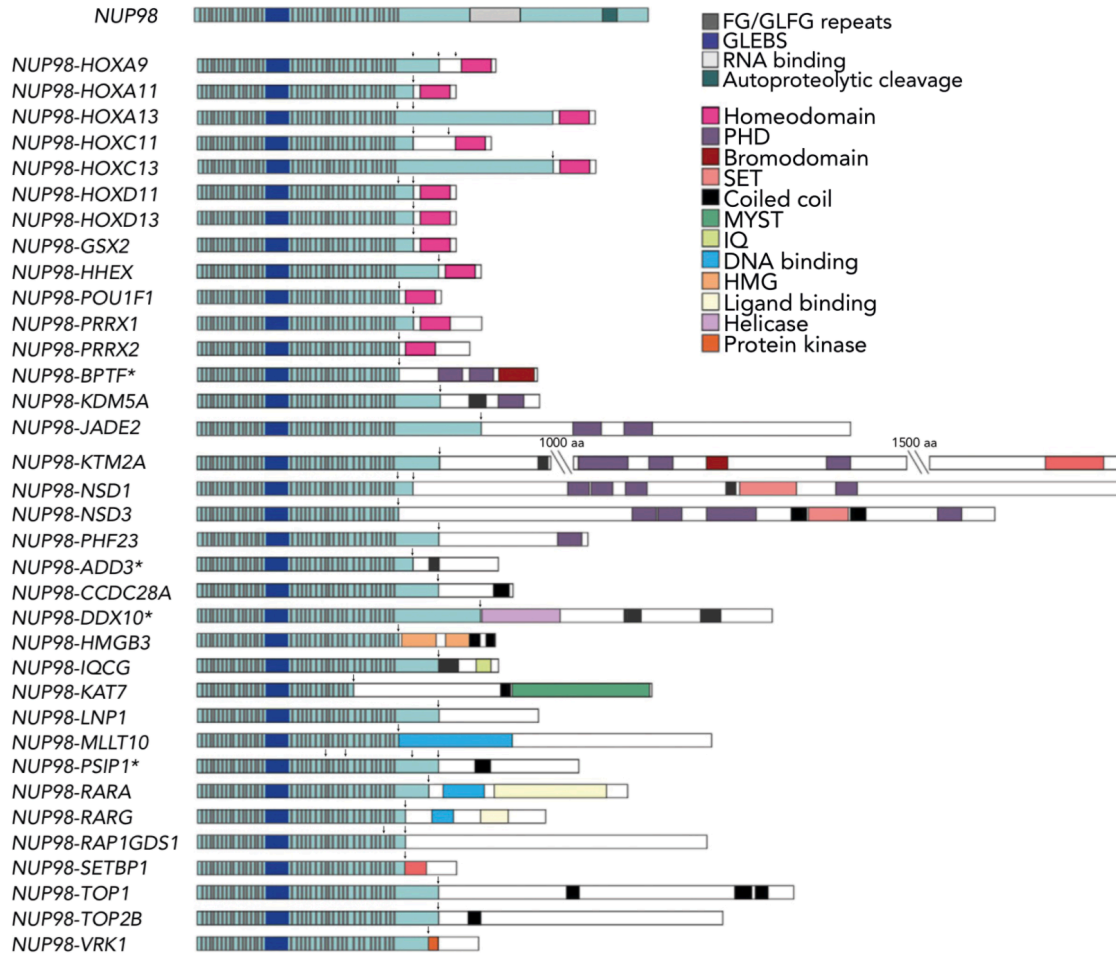


Figure 1-9 - Représentation graphique des domaines protéiques formant les fusions NUP98.

NUP98, représenté en bleu pâle, retient l'intégralité de ses répétitions FG et GLFG lorsque retrouvé fusionné avec son partenaire. La majorité des partenaires de fusions de NUP98 présentent un homéodomaine, un motif coiled-coil ou un domaine de liaison à la chromatine. Figure adaptée de Nicole Michmerhuizen et al. ²¹¹

1.3.3.4 Association de NUP98r avec KMT2A

Plusieurs groupes ont démontré l'association de NUP98 avec des membres de la famille des Trx, dont KMT2A, ainsi que leur complexe COMPASS respectifs (voir figure 1-10)^{195,213,215,216}. Ces interactions surviennent majoritairement près de promoteurs actifs de gènes développementaux présentant des marques H3K4me3 associée à la transcription active des gènes. La présence de cette marque, ainsi que des larges complexes COMPASS, aux promoteurs des gènes entraînerait l'exclusion du complexe des polycombs. L'exclusion du groupe des polycombs et de son activité répressive à ces promoteurs permet le maintien de l'expression aberrante des gènes développementaux.

En plus de l'association de NUP98r avec le complexe COMPASS de KMT2A, NUP98r peut aussi interagir avec le complexe d'acétylation des histones NSL. Cette interaction permet à NUP98 de s'associer avec l'acétyltrasférase MOF et d'induire l'acétylation de l'H4K16^{215,216}. Cette marque H4K16ac est aussi retrouvée au niveau des gènes activement transcrits.

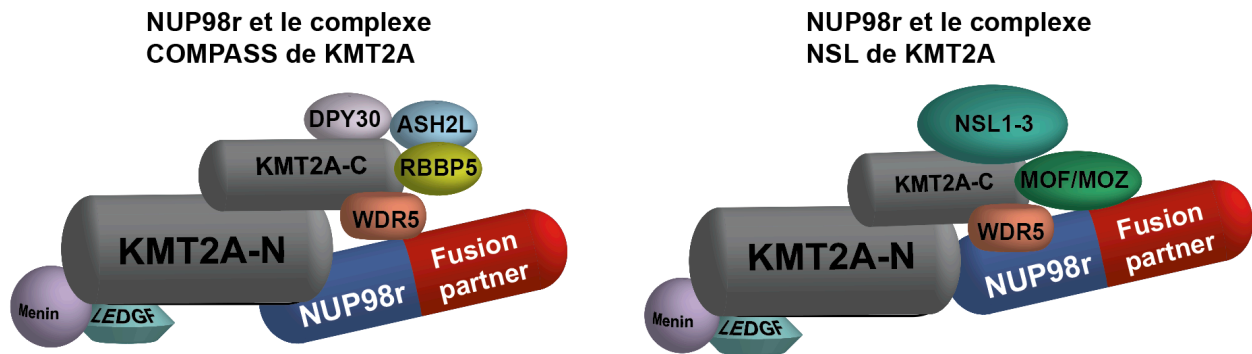


Figure 1-10 - La portion N-terminal de NUP98, retenue chez NUP98r, lui permet de s'associer avec le complexe NSL et COMPASS de KMT2A.

Ces interactions surviennent au niveau de la chromatine et est médié par les séquences GLFG retrouvé en N-terminal de NUP98. Certaines protéines ne sont pas représentées afin de favoriser la compréhension. Figures inspirées de Anthony K. N. Chan et Chun-Wei Chen¹⁸⁸ ainsi que de Haiming Xu et al²¹⁶.

NUP98r semble nécessiter la présence de KMT2A afin d'exercer son plein pouvoir leucémogénique. Cette dépendance est exemplifiée par des essais de réduction de l'expression de *Kmt2a* chez un modèle de leucémie murine induite par NUP98::HOXA9. La réduction de l'expression de *Kmt2a* entraîne une augmentation du temps de latence dans l'induction de la leucémie induite par NUP98::HOXA9 ainsi qu'une diminution de l'expression des gènes des loci *HoxA* et *HoxB* ainsi que du gène *Meis1*²¹⁶.

L'interaction entre NUP98r et KMT2A au niveau des marques H3K4m3 peut expliquer en partie les similarités du programme transcriptionnel entre les AMKL NUP98r et KMT2Ar comparativement aux AMKL exprimant la fusion CBFA2T3::GLIS2 (voir figure 1-11)¹⁴⁸. Cependant, ces deux sous-types de leucémie présentent plusieurs différences telles qu'exemplifiées par l'expression du cluster des gènes *HOXB* par les NUP98r et non pas par les leucémies présentant une fusion du gène *KMT2A*^{137,217}.

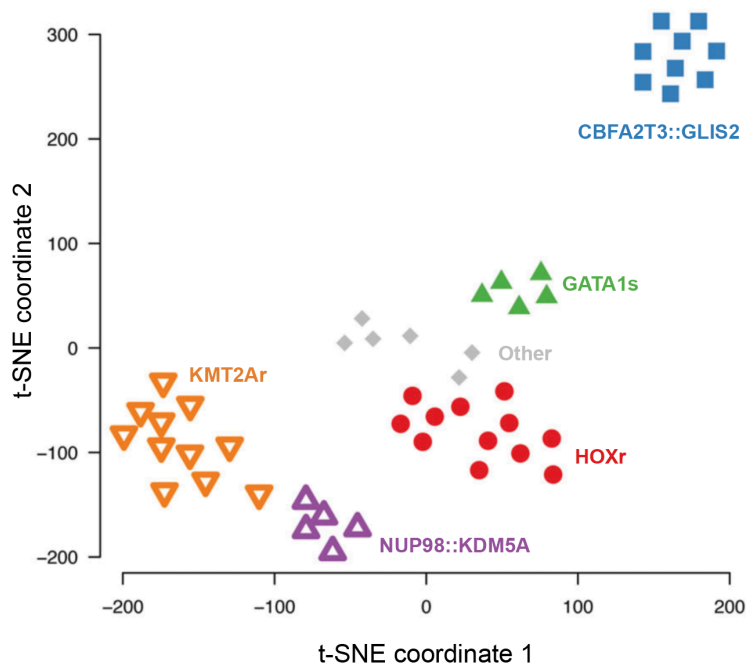


Figure 1-11 - Les AMKL présentent une expression génique distinctive entre les différents sous-groupes.

Représentation d'un partitionnement de données non supervisé T-SNE se basant sur les 100 gènes les plus différemment exprimés entre les sous-groupes d'AMKL. Chacun des points représente une leucémie AMKL d'une cohorte de patients pédiatriques. Illustration adaptée de Jasmijn D.E. de Rooij et al ¹⁴⁸.

1.3.4 La fusion CBFA2T3::GLIS2

1.3.5 Les rôles de CBFA2T3 et GLIS2 non fusionnés

CBFA2T3, membre de la famille des facteurs de transcription « Eight Twenty One » (ETO), fut premièrement identifié comme fusionné à RUNX1 dans de rares cas de LMA induite par des agents chimiothérapeutiques ²¹⁸. CBFA2T3 est nécessaire au développement des CSH au niveau embryonnaire et son association avec GATA1 coordonne l'expression des gènes associés au développement des mégacaryocytes. Dans ce contexte, l'abondance de CBFA2T3 diminue tout au long de la maturation mégacaryocytaire ^{219,220}.

CBFA2T3 se retrouve normalement associé à TAL1, une protéine qui ne présente pas de domaine de liaison à l'ADN et qui joue un rôle important au niveau de la différenciation cellulaire lors de l'hématopoïèse embryonnaire. TAL1 se retrouve au sein d'un large complexe protéique formé de LMO2, RUNX1 et GATA2 ²²¹. La stœchiométrie de ce complexe est variable et son association avec CBFA2T3 induit la répression des gènes liés à la différenciation des lignées érythrocytaire et

mégacaryoblastique ^{219,222}. Cette répression de l'expression génique est médiée depuis son interaction avec NCOR1/2 et le recrutement d'histones déacétylases (HDAC) ²²³.

Il est intéressant de noter que certains essais de *knockdown* ainsi que de surexpression de CBFA2T3 influencent le destin megacaryocytaire. La diminution de l'expression de *Cbfa2t3* par l'utilisation de shARN permet à la lignée L8057, une lignée mégacaryocytaire murine, d'exprimer *Pf4*, un gène associé avec la différenciation terminale des mégacaryocytes ²¹⁹. D'autre part, en présence de THPO, la surexpression de CBFA2T3 chez des HSPC de souris en culture augmente le nombre de progéniteurs de la lignée mégacaryoblastique tout en restreignant leur différenciation ¹⁶³.

Dans son cas, GLIS2 est normalement associé à la régulation de la transcription de la voie sonic hedgehog et sa perte au niveau germinale induit la néphronophtise, une pathologie ciliaire rare ^{224,225}. L'ARN messager de *GLIS2* fut récemment identifié comme ayant la capacité de former des structures circulaires (circARN). Ces circARN de *GLIS2* induisent l'activation de la voie NF-κB et permettent la séquestration du microARN miR-671 au niveau des cancers colorectaux ²²⁶. Cependant, cette propriété de *GLIS2* à former des circARN n'est pas décrite dans le contexte hématopoïétique.

D'autre part, toujours en présence de THPO, la surexpression de *GLIS2* chez des HSPC murins entraîne l'expression de marqueurs de différenciation mégacaryoblastiques terminaux tels que les marqueurs immunophénotypiques CD42a, CD42b et CD42c.

1.3.5.1 La fusion CBFA2T3::GLIS2 et son impact sur l'hématopoïèse

Identifiée en 2012, la fusion CBFA2T3::GLIS2 (CG2) est générée par une inversion cryptique du chromosome 16 ¹⁶⁰. CG2 est le transcrite chimérique le plus récurrent chez les patients non-DS-AMKL en plus d'être associée avec un faible pronostic ¹⁴⁸. Tout comme les fusions impliquant KMT2A et NUP98, CG2 n'est pas restreinte qu'aux AMKL. En effet, près de la moitié des cas de LMA pédiatriques, présentant une fusion CG2, ne sont pas associées au sous-type FAB M7 ²²⁷.

Malgré que CG2 soit retrouvé au sein de leucémies de différents sous-types FAB, les leucémies CG2 positives présentent majoritairement le phénotype RAM. Ce phénotype particulier fut nommé ainsi se basant sur les initiales du patient où il fut premièrement décrit et se définit par

une fluorescence élevée pour le marqueur NCAM1 (CD56), négative pour HLA-DR ainsi qu'une très faible positivité pour CD45 et CD38 ^{228,229}. L'expression de *NCAM1* étant normalement réservée aux cellules NK (Natural Killer) alors que *HLA-DR* est exprimée chez les cellules normales de la moelle osseuse ainsi que généralement positif dans les cas de leucémies myéloïdes autre que promyélocytaire ²³⁰⁻²³². Cette combinaison de marqueurs est particulièrement efficace afin d'identifier les cas de leucémies CG2 positifs potentiels.

Dans la majorité des cas, l'inversion du chromosome 16 entraîne une fusion entre l'exon 11 de *CBFA2T3* avec l'exon 3 de *GLIS2* formant ainsi un transcrite chimérique de 2889 paires de base (voir figure 1-12). Ce transcrite CG2 retient trois domaines NHR (Nervy homology region) provenant de *CBFA2T3* ainsi que les cinq doigts de zinc de la partie C-terminal de *GLIS2* ^{160,162}. De rares variations au niveau du point de fusion existent. Cependant, dans tous les cas rapportés à ce jour, les deux premiers domaines NHR en N-Terminal de *CBFA2T3* ainsi que les cinq doigts de zinc de *GLIS2* sont retenus. L'interaction de *CBFA2T3* avec ces cofacteurs depuis son domaine NHR2 ainsi que la capacité de *GLIS2* à lier l'ADN sont nécessaires à la transformation leucémique alors que le troisième domaine NHR de *CBFA2T3* semble être facultatif ^{163,233,234}.

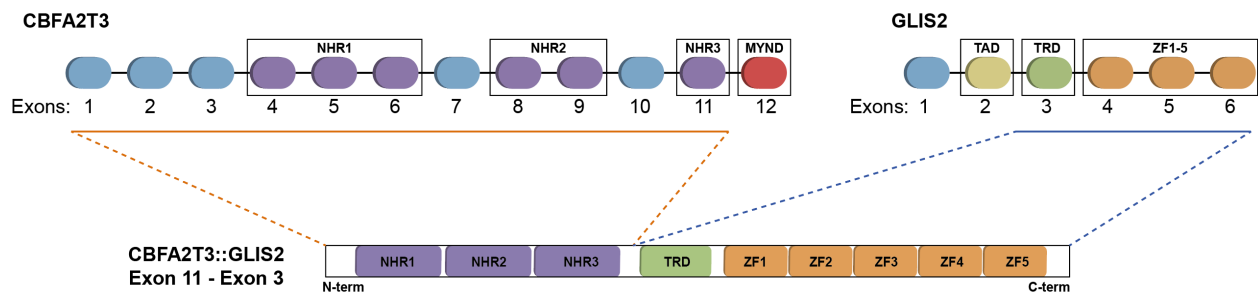


Figure 1-12 - Représentation la fusion CBFA2T3::GLIS2.

L'exon 11 de *CBFA2T3* se trouve fusionné à l'exon 3 de *GLIS2* codant ainsi pour une protéine de fusion de 2889 paires de base. MYND: myeloid, nervy and DEAF-1 ; NHR: nervy homology regions ; TAD: topologically associating domain ; TRD: trans-Repression Domain ; ZF: zinc finger. Figure inspirée de Masetti et al²³⁵.

Les AMKL CG2 positives présentent un programme transcriptionnel différent des autres AMKL ^{148,160}. Ceci peut être représenté par le fait que les AMKL CG2 positives n'expriment pas HOXA9, HOXA10 et MEIS1, comparativement aux DS-AMKL ou celles associées aux fusions KMT2Ar et NUP98r ¹⁶⁰. De plus, les AMKL CG2 positives présentent une augmentation de l'expression de ERG tout comme une diminution de l'expression de GATA1 sans augmentation concomitante de GATA2 ¹⁶³. Un des mécanismes proposés afin d'expliquer la transformation leucémique induite

par CG2 est soutenu par l'incapacité des cellules à exprimer GATA1, ce qui entraîne un blocage dans la différenciation cellulaire. Ce blocage est accompagné d'une expression élevée de ERG et KIT entraînant un maintien dans la capacité d'autorenouveaulement^{163,236}. Les composantes faisant partie du complexe protéique de la fusion CG2 ainsi que les mécanismes précis de la transformation leucémique induite par celle-ci restent à être identifiés.

Bien que peu de modèles leucémiques exprimant CG2 existent à ce jour, les leucémies CG2 positives ne présentent que très peu de mutations coopératrices récurrentes. Cette observation suggère que CG2 présente une force oncogénique élevée¹⁴⁸.

1.4 Le traitement ciblé des LMA

Depuis les débuts de l'utilisation de la cytarabine et de l'antracycline, deux antimétoproliques, en 1973, les traitements des LMA ont très peu évolués²³⁷. Pendant près de 40 ans, l'augmentation des taux de survie fut majoritairement due à une meilleure classification du risque ainsi qu'une optimisation des protocoles de greffes et de traitements utilisant ces agents^{238,239}.

Le principe de la thérapie ciblée tient dans sa qualité à influencer les cellules tumorales sans impacter les cellules normales. La stratification du risque et la classification moléculaire, morphologique et immunophénotypique permettent d'identifier des points communs parmi les sous-groupes leucémiques les plus à risque. Devant l'inefficacité des traitements associés à ces sous-groupes, l'évaluation d'approches thérapeutiques alternatives est judicieuse.

Le premier exemple de traitement ciblant un sous-type génétique particulier remonte à 1985 lors de l'introduction de l'acide rétinoïque afin de traiter la leucémie promyélocytaire. Autrefois considérée comme un sous-type des plus mortels, l'utilisation de l'arsenic et de l'acide rétinoïque a permis d'augmenter le taux de survie d'environ 35% à près de 75%²⁴⁰. Plutôt que d'entraîner la mort des cellules leucémiques, la combinaison de l'arsenic et de l'acide rétinoïque pousse les cellules immatures à la différenciation. Cette combinaison témoigne du début d'une nouvelle approche dans le traitement de la leucémie²⁴¹.

L'utilisation des inhibiteurs de tyrosine kinase, telle que l'imatinib, afin de traiter les CML présentant une fusion BCR::ABL suit la même direction. L'imatinib entraîne la différenciation des cellules immatures et a permis d'améliorer grandement le pronostic chez ces patients ²⁴²⁻²⁴⁵.

Plus récemment, la caractérisation fine des leucémies émanant de l'utilisation des techniques de séquençage de nouvelle génération a permis d'identifier des mutations récurrentes affectant les tyrosines kinases chez les AML réfractaires aux traitements, tels que la mutation FLT3-ITD (Internal tandem duplication). Cette découverte a permis de concentrer les efforts de la recherche afin d'identifier des inhibiteurs spécifiques à ce récepteur tyrosine kinase muté. Dans ce contexte, le sorafenib et le midostaurin, deux inhibiteurs ciblant plusieurs kinases incluant FLT3, ont à leur tour augmenté les taux de survies des patients atteints d'AML ²⁴⁶⁻²⁴⁸.

Tel que discuté précédemment, l'interaction de MEN1 avec KMT2Ar est essentielle à la surexpression du cluster des gènes *HOXA* tandis que cette interaction n'est pas nécessaire chez les cellules hématopoïétiques normales ²⁴⁹. Les inhibiteurs de MEN1 sont présentement utilisés dans plusieurs essais cliniques impliquant des patients présentant une leucémie KMT2Ar positive, où près de 50% atteignent la rémission ²⁵⁰. Puisque NUP98r et KMT2A peuvent interagir physiquement, un inhibiteur de MEN1 fut récemment testé dans un modèle de leucémie murine exprimant NUP98::KMD5A ²⁵¹. Cet inhibiteur mène à l'inhibition de l'interaction de NUP98r avec KMT2A et entraîne une prolongation de la survie des souris leucémique ainsi qu'une diminution de l'expression du locus des gènes *HOXA*.

1.4.1 La voie JAK-STAT

Les récepteurs cytokiniques associés aux protéines Janus Kinase (JAK) sont dépourvus d'activité tyrosine kinase et ne présentent qu'un seul domaine transmembranaire servant à la liaison constitutive des protéines JAK ainsi qu'au recrutement des STAT. ²⁵²⁻²⁵⁴. Les protéines de la famille des JAK (JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2) sont formées des domaines protéiques : FERM, SH2, pseudokinase et kinase. En absence de cytokine, le domaine pseudokinase reste lié au domaine kinase et entraîne son inhibition ^{255,256}. Il est à noter que la majorité des mutations activatrices des protéines JAK se retrouvent à l'interface des domaines pseudokinase-kinase et entravent l'activité inhibitrice de cette interaction.

Les protéines JAK présentent une région régulatrice formée d'une boucle d'activation comprenant deux tyrosines consécutives en C-terminal de son domaine kinase. Ces tyrosines sont conservées à travers les différents JAK. La liaison des différentes cytokines à leurs récepteurs entraîne un changement de conformation de la partie cytoplasmique ce qui entraîne également une séparation du domaine pseudokinase du domaine kinase. Les JAK liés au récepteur se rapprochent et se transphosphorylent au niveau de leur boucle d'activation. JAK phosphoryle ensuite le récepteur et les protéines STAT ²⁵⁷.

Chez l'humain on retrouve sept protéines STAT (STAT1-4, STAT5a/b et STAT6). Il est à noter que STAT5a et STAT5b sont communément englobés sous l'appellation « STAT5 ». Depuis la partie N-terminal, les STAT présentent un domaine d'interaction protéine « coiled-coil », un domaine de liaison à l'ADN et un domaine SH2. Lorsqu'inactifs, les STAT sont normalement retrouvées au niveau du cytoplasme sous forme de dimer. Lorsque phosphorylé par JAK, ces dimères changent de conformation et se déplacent ensuite au noyau afin de lier l'ADN au niveau des séquences GAS (interferon-gamma activated sequence) « TTCN₂₋₄GAA » afin d'y recruter des facteurs de transcription ²⁵⁸⁻²⁶¹.

1.4.1.1 La voie JAK-STAT dans l'hématopoïèse normale et leucémique

La voie JAK-STAT est grandement conservée à travers les espèces et a comme rôle essentiel l'induction de la signalisation des cytokines depuis ses récepteurs (voir figure 1-13).

Les kinases JAK sont nécessaires au développement hématopoïétique normal. Les embryons de souris Jak1^{-/-} peuvent arriver à terme, mais ne survivent pas plus de 24h ²⁶². Ces souris présentent un développement normal du compartiment myéloïde, mais présentent une déficience de la maturation de la lignée lymphocytaire B. JAK1 est aussi nécessaire au maintien de la capacité d'autorenouvellement des CSH ²⁶³. Son ablation au niveau des CSH entraîne leur maintien dans un état de quiescence et abroge leur capacité à se diviser. Dans leur cas, les souris Jak2^{-/-} meurent au niveau embryonnaire autour du jour 12.5 d'un défaut de maturation de la lignée érythrocytaire ²⁶⁴. Lorsque l'ablation de Jak2 est restreinte au niveau des CSH, contrairement aux CSH Jak1^{-/-}, les cellules perdent leur capacité à maintenir leur état de quiescence et entraîne l'induction de l'apoptose ²⁶⁵. Cette observation va de concert avec des données récentes qui démontrent que

l'axe JAK2-STAT5 régule l'expression des protéines pro survies telles que BCL-XL chez les HSPC ^{258,266-271}.

JAK2 présente aussi une activité non canonique au sein du noyau des cellules normales et leucémiques. JAK2 déplace CBX5 au niveau de la tyrosine 41 de l'histone 3 (H3K41) et entraîne sa phosphorylation ²⁷¹. Cette marque épigénétique entraîne l'expression de gènes associés à l'hématopoïèse telle que *LMO2*, *TAL1* et *GATA2* ²⁷².

1.4.1.2 Le dérèglement de la voie JAK-STAT en leucémie

Près de 17% des AMKL présentent une mutation activatrice de la voie JAK-STAT ¹⁴⁸. Parmi les mutations les plus courantes engendrant une activation de la voie nous retrouvons; JAK2-V617F, MPL-W515L, FLT3-ITD ainsi que les mutations activatrices du récepteur tyrosine kinase KIT ²⁷³⁻²⁷⁵. Bien que MPL ne présente pas d'activité kinasique, plusieurs indications démontrent que la présence d'une leucine en position W515 de MPL entrainerait sa dimérisation constitutive ainsi que la phosphorylation de JAK2 ²⁷⁶⁻²⁷⁸. L'importance de la voie JAK-STAT dans la différenciation des HSPC ainsi que la présence de plusieurs mutations activatrices de la voie retrouvée chez les AMKL expose la voie JAK-STAT comme une cible thérapeutique potentielle ^{161,166}.

Les mutations de la voie JAK-STAT sont aussi associées avec l'évolution du désordre hématopoïétique transitoire vers la leucémie chez les patients atteints du syndrome de Down ²⁷⁹. Pour leur part, dans la population adulte, la mutation JAK2-V617F peut être retrouvée chez près 97% des patients atteints de *polycythemia vera* ainsi que 57% des patients atteints de thrombocythémie essentielle et la moitié des patients présentant une myélofibrose liée à un désordre myéloprolifératif ²⁸⁰⁻²⁸².

1.4.2 La voie de mTOR et ces complexes

mTOR est la pièce maitresse de deux complexes protéiques, mTORC1 et mTORC2 (mammalian Target Of Rapamycin Complexe 1/2), servant à contrôler l'utilisation des ressources métaboliques de la cellule. L'activation de mTORC1 entraîne la synthèse des protéines, lipides et nucléotides, ainsi que la répression de leur catabolisme, dans le but de promouvoir la croissance de la cellule.

L'activation de mTORC1 par RHEB survient lorsque les ressources métaboliques sont en abondance. Cette activation a lieu au niveau de la membrane externe du lysosome et est contrôlée par RHEB, qui est pour sa part normalement maintenu inhibé par l'activité GTPase de TSC1/2^{283,284}. L'augmentation du niveau d'acides aminés, l'activation de l'axe PI3K-AKT ou de l'axe RAS-RAF-MEK-ERK par des récepteurs de facteurs de croissance à activité tyrosine kinase mènent à l'inhibition de l'activité inhibitrice de TSC1/2 sur RHEB qui activera ensuite mTORC1^{284,285}. L'activation de mTORC1 permet le recrutement ainsi que la phosphorylation de S6K et 4EBP1^{283,286-288}. S6K et 4EBP1, toutes deux phosphorylées, mènent respectivement à la phosphorylation et l'activation de l'unité ribosomale S6 ainsi qu'à la libération du facteur d'initiation de la traduction eIF4E (voir figure 1-13).

Pour sa part, mTORC2 est activé principalement depuis la voie PI3K-AKT au niveau de la membrane plasmique. mTORC2 régule principalement la prolifération cellulaire ainsi que l'organisation du cytosquelette^{289,290}. Contrairement à mTORC1, mTORC2 n'est pas sensible à la rapamycine et autres rapalogues^{290,291}. L'inhibition de mTORC2 ne survient qu'après un traitement prolongé et l'utilisation de forte dose de rapalogues. L'étude de la structure de mTORC2 démontre que RICTOR bloque l'accès de la rapamycine à mTOR au sein du complexe 2²⁹². Une exposition prolongée aux rapalogues pourrait séquestrer la majorité des protéines mTOR et entraîner l'inhibition de mTORC2.

Deux boucles semblent coexister au sein de la voie PI3K-AKT-mTOR. La première est une boucle de rétro-inhibition engendrée par la cible de mTORC1, S6K1, qui phosphoryle IRS1 entraînant sa dégradation et l'inhibition de la signalisation engendrée par le récepteur^{293,294}. La deuxième est une boucle de rétroactivation positive entre AKT et mTORC2 qui peuvent s'entre phosphoryler²⁸⁹. Le débalancement entre ces boucles de rétroactivation semble être à l'origine de l'augmentation de la phosphorylation de AKT lors de l'utilisation de rapalogues²⁹⁵. Dans ce cas, l'inhibition de mTORC1 par un rapalogue inhibe les deux boucles de rétroactivation négative et laisse mTORC2 et AKT actif²⁹⁵. Cette augmentation de la phosphorylation d'AKT fut aussi observée lors d'une étude clinique utilisant le rapalogue everolimus²⁹⁶.

1.4.2.1 L'inhibition de la voie PI3K-AKT-mTOR en leucémie

Près de 60% des cas de LMA sont associés à une activation constitutive de cette voie ^{297,298}. Des mutations récurrentes chez les LMA telles que FLT3-ITD, JAK2-V617F et les mutations affectant le récepteur KIT sont responsables de cette activation constitutive ^{274,299}.

Sous l'axe PI3K-AKT-mTOR, la voie signalétique mTOR-4EBP1-EIF4E est responsable de la traduction cap-dépendante de MCL1, une protéine rapidement dégradée nécessitant un renouvellement constant ^{300,301}. L'inhibition combinée de l'axe PI3K-AKT-mTOR ainsi que des facteurs pro-survies, tels que BCL2 et BCLXL, fut proposée comme une approche potentiellement synergique dans l'induction de l'apoptose des cellules d'AML *in vitro* et *in vivo*. De plus, cette combinaison impacte plus faiblement les cellules CD34+ normales de sang de cordon ³⁰²⁻³⁰⁴.

L'utilisation de la rapamycine, et autres rapalogues, lors d'essais cliniques a démontré une efficacité limitée à traiter la leucémie ³⁰⁵⁻³⁰⁸. Cependant, les rapalogues semblent démontrer une faible toxicité et sont bien tolérés. Le faible taux de succès des rapalogues peut être expliqué par une inhibition incomplète de mTORC1 permettant le maintien de la phosphorylation de 4EBP1 et de l'activité de mTORC2 ^{309,310}. De plus, plusieurs mutations secondaires, entraînant une résistance aux rapalogues, ont été rapportées ³¹¹. Dans ce contexte, les inhibiteurs mTORC1/2 furent développés afin de contrecarrer ces désavantages. Cependant, plusieurs de ces composés, tels que le BEZ235, un inhibiteur de PI3K et mTORC1/2, présentent une forte toxicité ³¹².

L'inhibition combinée d'un inhibiteur de JAK ou d'un inhibiteur de tyrosine kinase avec un inhibiteur de l'axe PI3K-AKT-mTOR induit l'apoptose de manière synergique de la lignée cellulaire mégacaryoblastique SET-2, présentant une mutation activatrice JAK2-V617F ^{313,314}. Cet effet fut aussi démontré *in vivo* et *in vitro* au sein de plusieurs modèles myéloprolifératifs de cellules murines et entraîne une diminution de l'expression des protéines pro-survie BCLXL et MCL1 chez les cellules traitées ^{297,315-317}.

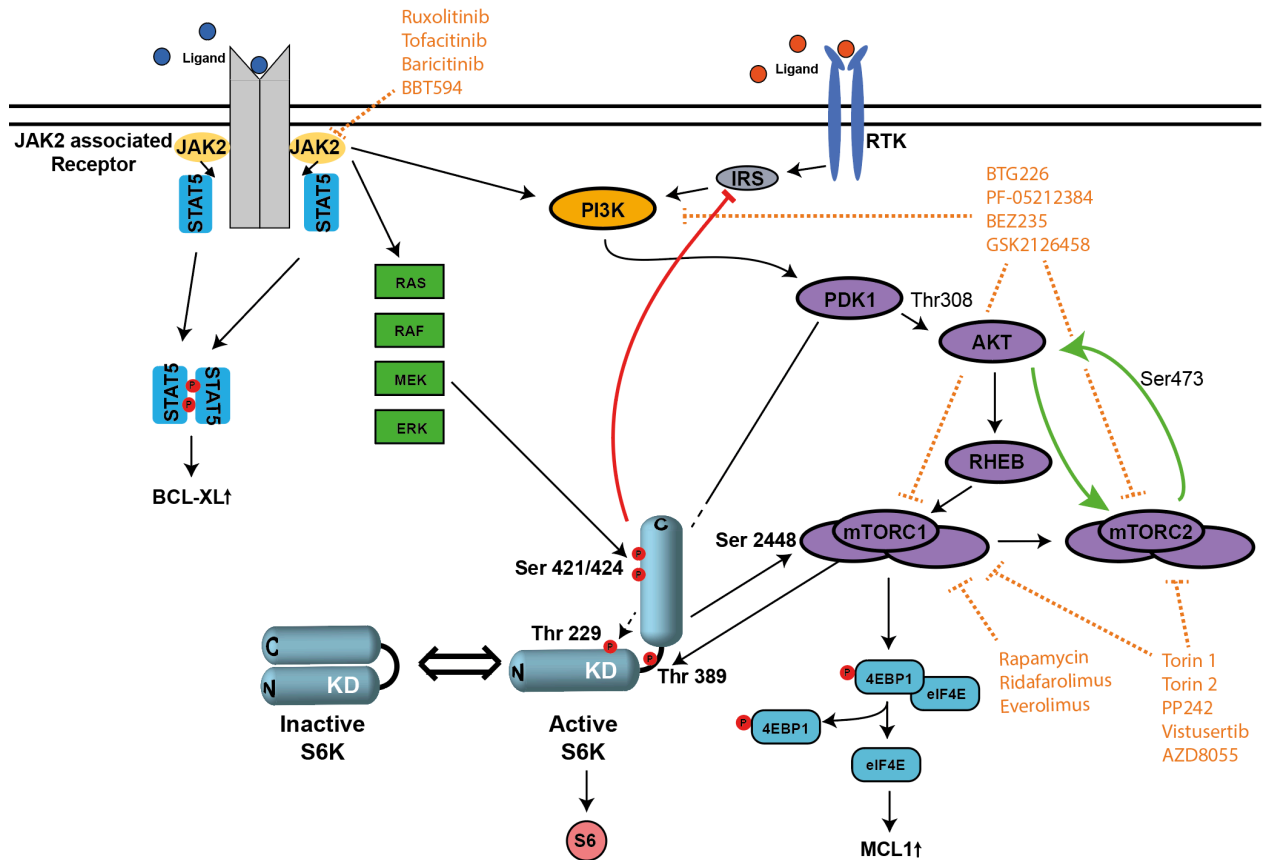


Figure 1-13 - Représentation des interactions entre l'axe JAK2-STAT5 et l'axe PI3K-ATK-mTOR.

Représentation graphique des voies signalétiques induites par l'activation de JAK2 et les récepteurs tyrosines kinases (RTK). Une boucle de rétroactivation positive, où AKT et mTORC2 s'entre phosphorylent, ainsi qu'une boucle de rétroinhibition sont présentées (flèches vertes et rouge respectivement). L'inhibition de l'axe PI3K-AKT-mTOR est initiée par la kinase S6K en phosphorylant IRS (Insuline Receptor Substrate) au niveau de plusieurs sérines. Les différents inhibiteurs étudiés par notre laboratoire et présentés au chapitre 5, sont dépeints en orange. AKT peut être phosphorylé par PDK1 au niveau de la thréonine 308 alors et au niveau de la serine 473 par mTORC2.

1.5 Contexte, hypothèse et objectifs de recherche

1.5.1 Le contexte

L'avancement de la recherche en leucémie pédiatrique est freiné par le manque de modèles cellulaires représentatifs de la maladie. Cette problématique est particulièrement importante pour les sous-types leucémiques plus rares et de haut risque tels que les leucémies aiguës mégacaryocytaires du jeune enfant.

1.5.2 Hypothèse

L'hypothèse de ce travail est la suivante : les fusions *NUP98::KDM5A* et *CBFA2T3::GLIS2* sont oncogéniques et leur expression chez des cellules souches hématopoïétiques et progénitrices humaines normales entraîne une transformation en leucémie aiguë mégacaryoblastique (myéloïde) lorsque transplantées dans les souris receveuses immunodéficientes, générant des modèles de xénogreffe.

Les modèles générés peuvent être utilisés afin d'identifier des mécanismes soutenant la leucémogénèse, de nouveaux biomarqueurs ainsi que des approches thérapeutiques innovantes.

1.5.3 Objectifs de recherche

Cette thèse fut subdivisée en trois objectifs :

Objectif 1 : Identifier de nouveaux oncogènes de fusion récurrents en leucémies pédiatriques (chapitre 2).

Objectif 2 : Valider le potentiel oncogénique des fusions récurrentes identifiées dans les leucémies mégacaryoblastiques aiguës (chapitres 3 et 4).

Objectif 3 : Identifier et évaluer de nouveaux biomarqueurs et approches thérapeutiques pour les leucémies induites par un réarrangement du gène *NUP98* et de la fusion *CBFA2T3::GLIS2* (chapitres 3, 4 et 5)

2 Utilisation du séquençage de l'ARN pour l'identification d'oncogènes de fusion qui sont cryptiques en cytogénétique conventionnelle.

2.1 Préface

Ce chapitre comporte deux articles portant sur la découverte de nouvelles fusions chez les leucémies du jeune enfant : *NUP98::BPTF* dans un sous-type AMKL et *ACIN1::NUTM1* dans des LAL à cellules B.

L'objectif de cette recherche est de mieux caractériser certains sous-groupes de leucémie au niveau moléculaire afin d'en raffiner la classification. La classification fine des leucémies permet de mieux comprendre les points communs et les différences associées aux différents sous-groupes hétérogènes et permet ainsi une meilleure stratification du risque. De plus, la détection des transcrits de fusion par RT-PCR ou ddPCR peut contribuer au diagnostic et au suivi de la maladie résiduelle minime (MRD) chez les patients atteints de leucémie.

2.1.1 Contribution

Dans le cas de la leucémie mégacaryoblastique présentant la fusion *NUP98::BPTF*, j'ai participé à l'identification du partenaire de fusion de *NUP98* ainsi qu'à la caractérisation de son profil transcriptomique. Lors de l'amplification par RT-PCR de la séquence d'ADNc couvrant le point de fusion entre *NUP98* et *BPTF*, j'ai découvert un second isoforme de *BPTF* issu de l'épissage alternatif de ce gène. Ce nouvel isoforme présente un second domaine PHD en C-terminal et il est aussi exprimé dans les cellules normales.

Dans le cas des patients présentant une fusion *ACIN1::NUTM1*, j'ai confirmé les partenaires de fusion par séquençage Sanger ainsi que détecté les différents variants d'épissage. J'ai participé à la révision de la littérature afin de rassembler les cas de leucémies impliquant *NUTM1*. De plus, j'ai formulé l'hypothèse que la détection de l'expression de *NUTM1*, par séquençage de l'ARN ou par immunohistochimie, pouvait prédire la présence d'une fusion impliquant ce gène chez les patients leucémiques.

2.2 *NUP98-BPTF* gene fusion identified in primary refractory acute megakaryoblastic leukemia of infancy

Mathieu Roussy^{1,2,3*}, Mélanie Bilodeau^{1*}, Loubna Jouan⁴, Pauline Tibout^{1,3}, Louise Laramée¹, Emmanuelle Lemyre^{3,5}, France Léveillé^{3,5}, Frédérique Tihy^{3,5}, Sophie Cardin¹, Camille Sauvageau^{1,3}, Françoise Couture⁶, Isabelle Louis¹, Aurélien Choblet¹, Natalie Patey^{3,7}, Patrick Gendron⁸, Michel Duval^{1,3}, Pierre Teira^{1,3}, Josée Hébert^{3,9,10,11}, Brian T. Wilhelm^{3,11,12}, John K. Choi¹³, Tanja A. Gruber^{13,14}, Henrike Bittencourt^{1,3} and Sonia Cellot^{1,3,10}

¹ Pediatric Hematology-Oncology Division, Charles-Bruneau Cancer Center, CHU Sainte-Justine Research Center, Montréal, Québec, Canada

² Department of Biomedical Sciences, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

³ Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

⁴ Integrated Centre for Pediatric Clinical Genomics, CHU Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada

⁵ Cytogenetics laboratory, genetics division, CHU Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada

⁶ Molecular diagnostic laboratory, CHU Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada

⁷ Department of Pathology, CHU Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada

⁸ Bioinformatics Core Facility, Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

⁹ Division of Hematology, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montréal, Québec, Canada

¹⁰ Québec Leukemia Cell Bank, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montréal, Québec, Canada

¹¹ Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

¹² Laboratory for high throughput biology, IRIC, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

¹³ Department of Pathology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee

¹⁴ Department of Oncology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee

*These authors contributed equally to this work

Key words: *NUP98*, *BPTF*, AML, AMKL, chimeric oncogenes.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Reference : Roussy, M., M. Bilodeau, L. Jouan, P. Tibout, L. Laramée, E. Lemyre, F. Léveillé, F. Tihy, S. Cardin, C. Sauvageau, F. Couture, I. Louis, A. Choblet, N. Patey, P. Gendron, M. Duval, P. Teira, J. Hébert, B. T. Wilhelm, J. K. Choi, T. A. Gruber, H. Bittencourt, and S. Cellot. 2018. 'NUP98-BPTF gene fusion identified in primary refractory acute megakaryoblastic leukemia of infancy', *Genes Chromosomes Cancer*, 57: 311-19.

Status : Published

2.2.1 Abstract

The advent of large scale genomic sequencing technologies significantly improved the molecular classification of acute megakaryoblastic leukaemia (AMKL). AMKL represents a subset (~10%) of high fatality pediatric acute myeloid leukemia (AML). Recurrent and mutually exclusive chimeric gene fusions associated with pediatric AMKL are found in 60-70% of cases and include *RBM15-MKL1*, *CBFA2T3-GLIS2*, *NUP98-KDM5A* and *MLL* rearrangements. In addition, another 4% of AMKL harbor *NUP98* rearrangements (*NUP98r*), with yet undetermined fusion partners. We report a novel *NUP98-BPTF* fusion in an infant presenting with primary refractory AMKL. In this *NUP98r*, the C-terminal chromatin recognition modules of BPTF, a core subunit of the NURF (Nucleosome Remodeling Factor) ATP-dependent chromatin-remodeling complex, are fused to the N-terminal moiety of NUP98, creating an in frame NUP98-BPTF fusion, with structural homology to NUP98-KDM5A. The leukemic blasts expressed two NUP98-BPTF splicing variants, containing one or two tandemly spaced PHD chromatin reader domains. Our study also identified an unreported wild type BPTF splicing variant encoding for 2 PHD domains, detected both in normal cord blood CD34⁺ cells and in leukemic blasts, as with the fly BPTF homolog, Nurf301. Disease course was marked by rapid progression and primary chemoresistance, with ultimately significant tumor burden reduction following treatment with a clofarabine containing regimen. In sum, we report 2 novel NUP98-BPTF fusion isoforms that contribute to refine the *NUP98r* subgroup of pediatric AMKL. Multicenter clinical trials are critically required to determine the frequency of this fusion in AMKL patients and explore innovative treatment strategies for a disease still plagued with poor outcomes.

2.2.2 Introduction

Acute megakaryoblastic leukemia (AMKL) is a subgroup of acute myeloid leukemia (AML) that harbors megakaryocytic lineage markers (CD41, CD42, CD61) and usually presents with extensive myelofibrosis, often limiting optimal bone marrow sampling at diagnosis. AMKL represents ~10% of pediatric AML cases, typically affects young children (< 3 years of age) and remains plagued with poor treatment outcomes, mostly due to primary chemotherapy refractory disease and/or early relapse. The advent of high throughput sequencing technologies has shed significant light on the heterogeneous genetic aberrations that underlie AMKL, with mutually exclusive chimeric fusion oncogenes detected in 60-70% of cases³¹⁸. Recurrent translocations associated with AMKL include *RBM15-MKL1* (~13%), *MLL* rearrangements (*MLLr*, ~10%) and the more recently described *CBFA2T3-GLIS2* (~17%) and *NUP98-KDM5A* (~11%) fusions¹⁴³, which are often cryptic and undetected by conventional karyotyping. Functional susceptibilities across molecular AMKL subgroups are still being explored, but expression signatures appear to be distinct. For instance, *NUP98-KDM5A* and *MLLr* AMKL upregulate *HOX* cluster genes, whereas *RBM15-MKL1* and *CBFA2T3-GLIS2* fusions are emerging as non-*HOX* AMKL^{137,160,162}. In addition to *NUP98-KDM5A*, another fraction (~4%) of AMKL harbor *NUP98* rearrangements, but specific fusion partners remain to be identified¹³⁷. We report a case of infant AMKL associated with a *NUP98* rearrangement that involves *BPTF* (bromodomain PHD finger transcription factor), a C-terminal fusion partner that harbors structural homology with *KDM5A*.

2.2.3 Methods

2.2.3.1 Patient sample analyses

The Research Ethics Board of CHU Sainte-Justine approved the study and an informed consent was obtained from the parents. Bone marrow aspiration and biopsy were performed with standard procedures. Peripheral blood LDH level were analysed by the clinical biochemistry laboratory of the CHU Sainte-Justine following standard procedures.

2.2.3.2 Histology

Histological analyses of bone marrow biopsy at diagnosis were conducted at the Pathology department of St. Jude Children's Research Hospital. Hematoxylin and eosin staining, reticulin staining and immunohistochemistry were conducted with standard protocols.

2.2.3.3 Flow cytometry

Standard cell surface marker staining was performed at the Clinical Diagnosis laboratory of CHU Sainte-Justine using the following mouse anti-human antibodies recognizing CD45 (APC-H7, clone 2D1, BD Biosciences, cat. no. 641399), CD34 (PerCP, clone 8G12, BD Biosciences, cat. no. 340430) and CD41a (PE-Cy7, clone HIP8, BD Biosciences, cat. no. 561424). Analytic flow cytometry was conducted with a FACSCanto II (BD Biosciences, San Jose, CA) cytometer. Data were analysed with FACSDiva (BD Biosciences) software.

2.2.3.4 Cytogenetic studies

GTG-banded karyotype (350-band resolution) and split-signal fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis (NUP98 break-apart probe set from Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) were conducted with standard procedures by the Medical Genetics Service of our institution (CHU Sainte-Justine).

2.2.3.5 Isolation of human CD34⁺ cord blood cells (CB-CD34⁺ cells)

Umbilical cord blood units (less than 24 hours old), collected with the consent of the mothers, were obtained through Héma-Québec's Public Cord Blood Bank (Montréal, Québec, Canada). The protocol was approved by the Research Ethics Board of CHU Sainte-Justine (approval no. 3453). CD34 expressing cells were enriched by magnetic-activated cell sorting with the EasySep Human Cord Blood CD34 Positive Selection Kit (STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada, Cat. no.18096) following the manufacturer's recommendations. Purity check was done by flow cytometry. Total RNA was extracted with TRIzol and Direct-zol RNA MiniPrep (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, Cat. no. 15596026 and Zymo Research, Irvine, CA, USA, Cat. no.R2050, respectively).

2.2.3.6 RNA sequencing and bioinformatics analysis

Total RNA was extracted from bone marrow stored in RNA later with QIAamp[®] RNA Blood Mini or RNeasy Micro kit (Qiagen, Germantown, MD, USA). Quantification of total RNA was made by QuBit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) and 500 ng of total RNA was used for library preparation. Quality of total RNA was assessed with the BioAnalyzer Nano (Agilent) and all samples had a RIN above 8. Library preparation was done with the KAPA mRNAseq stranded kit

(KAPA Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Cat. no. KK8420). Ligation was made with 9 nM final concentration of Illumina index and 9 PCR cycles was required to amplify cDNA libraries. Libraries were quantified by QuBit and BioAnalyzer. All libraries were diluted to 10 nM and normalized by qPCR using the KAPA library quantification kit (KAPA Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Cat. no. KK4973). Libraries were pooled to equimolar concentration. Sequencing was performed with the Illumina Nextseq500 using the Nextseq High Output Kit (150 cycles, paired-end) and 1.8 pM of the pooled library. Around 92-104 million and 22-67 million read pairs passing quality filters were sequenced for NUP98-BPTF AMKL and control CD34⁺ cord blood cells, respectively. Library preparation and sequencing were performed at the Institute for Research in Immunology and Cancer's Genomics Platform (Université de Montréal, Montréal, Canada).

Sequences were trimmed to remove sequencing adapters and low quality 3' bases using Trimmomatic version 0.35 and then aligned to the reference human genome version GRCh38 (gene annotation from Gencode version 24) using STAR version 2.5.1b. Gene expression were estimated directly from STAR as readcount values as well as computed using RSEM version 1.2.28 in order to obtain transcript level expression. Sequences were subsequently analyzed using FusionCatcher 0.99.6a in order to identify potential gene fusions (Supplemental Table 1). Gene expression heat maps were generated with MeV (Multiple Experiment Viewer) (mev.tm4.org)³¹⁹.

2.2.3.7 RT-PCR and cDNA cloning

RT-PCR was performed with bone marrow cell total RNA (extraction described above), to clone NUP98-BPTF cDNA isoforms. Reverse transcription was conducted with the "RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit" (ThermoFisher Scientific, Cat. no. K1632) according to the manufacturer's recommendations. A specific primer annealing in BPTF 3'UTR (BPTF_3'UTR_Rev) was used for reverse transcription. cDNAs were amplified by PCR using primers annealing to 5'UTR and 3'UTR (NUP98_5'UTR_Frd and BPTF_3'UTR_Rev) and with Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Cat. no. F530S) (98°C – 2min, (98 °C – 15 sec, 63 °C – 10 sec, 72 °C – 60 sec) X 35, 72 °C – 5 min). cDNAs were cloned by recombination using "GeneArt™ Seamless Cloning and Assembly Kit" (ThermoFisher Scientific, Cat. no.13288) following the manufacturer's instructions. Sequences homologous to cloning vector were added to the fusion coding sequence by PCR (NUP98_Cloning_Frd and BPTF_Cloning_Rev). cDNAs coding for both

NUP98-BPTF isoforms were fully sequenced. PCR amplification of the NUP98-BPTF breakpoint junction was performed using Taq DNA polymerase (ThermoFisher Scientific, Cat. no. 10342020) and primers annealing to NUP98 exon 11 and the BPTF exon 25 (NUP98_Ex11_Frd and BPTF_Ex25_Rev, respectively). PCR amplification of BPTF wildtype allele was performed with primers annealing to exons 23 and 25 (BPTF_Ex23_Frd and BPTF_Ex25_Rev). PCR products were purified using the “Monarch® DNA Gel Extraction Kit” (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA, Cat. no. T1020) and sequenced. Sequencing of cDNAs and other PCR products were conducted with a 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) at the Institute for Research in Immunology and Cancer’s Genomics Platform (Université de Montréal, Montréal, Canada). Alignments and primer design were based on NCBI mRNA reference sequences of *NUP98* isoform 1 (NM_016320.4) and *BPTF* isoform 1 (NM_182641.3) and X1 (XM_005257150.3). Alignments were performed with ClustalW multiple sequence alignment tool³²⁰. Conserved domains were determined using Pfam³²¹ or NCBI Conserved Domain (CDD) Databases³²². See Supplemental Table 2 for primer sequences.

2.2.3.8 Exome sequencing and bioinformatics analysis

Exome sequencing and bioinformatics analysis are described in the Supplemental Methods.

2.2.4 Case report

A previously healthy 8-month-old male infant presented with recent bruising, petechiae and conjunctival hemorrhage, without significant trauma or systemic symptoms. Pallor and mild hepatosplenomegaly were noted on physical examination. Pancytopenia was detected on initial workup with marked anemia (Hb 67 g/L), neutropenia ($0.8 \times 10^9/L$) and thrombocytopenia ($60 \times 10^9/L$), along with elevated LDH levels (14x upper normal value) in the absence of tumor lysis syndrome or consumption coagulopathy. Familial history was unremarkable regarding cancer predisposition syndromes. Serial bone marrow (BM) aspiration specimens were hypocellular and non-contributive to diagnosis. Hematoxylin and eosin (H&E) stained sections of the BM biopsy showed hypercellular marrow (>95%), extensively infiltrated with medium to large sized mononuclear cells consistent with leukemic blasts (Figure 1a). Increased fibrosis was shown by reticulin staining (inlet, Figure 1a). Immunohistochemistry demonstrated an abnormal

CD45^{dim}CD34⁻ CD42b⁺ (megakaryocytic marker) cell population that was also partially positive for Factor 8. The blasts were negative for MPO, CD61, CD33, CD117, TdT, CD19, CD10, CD3, vimentin, ALK1, Keratin AE1/3, EMA (Epithelial Membrane Antigen), synaptophysin and myogenin. Overall, these pathological findings confirmed clinically suspected diagnosis of AMKL.

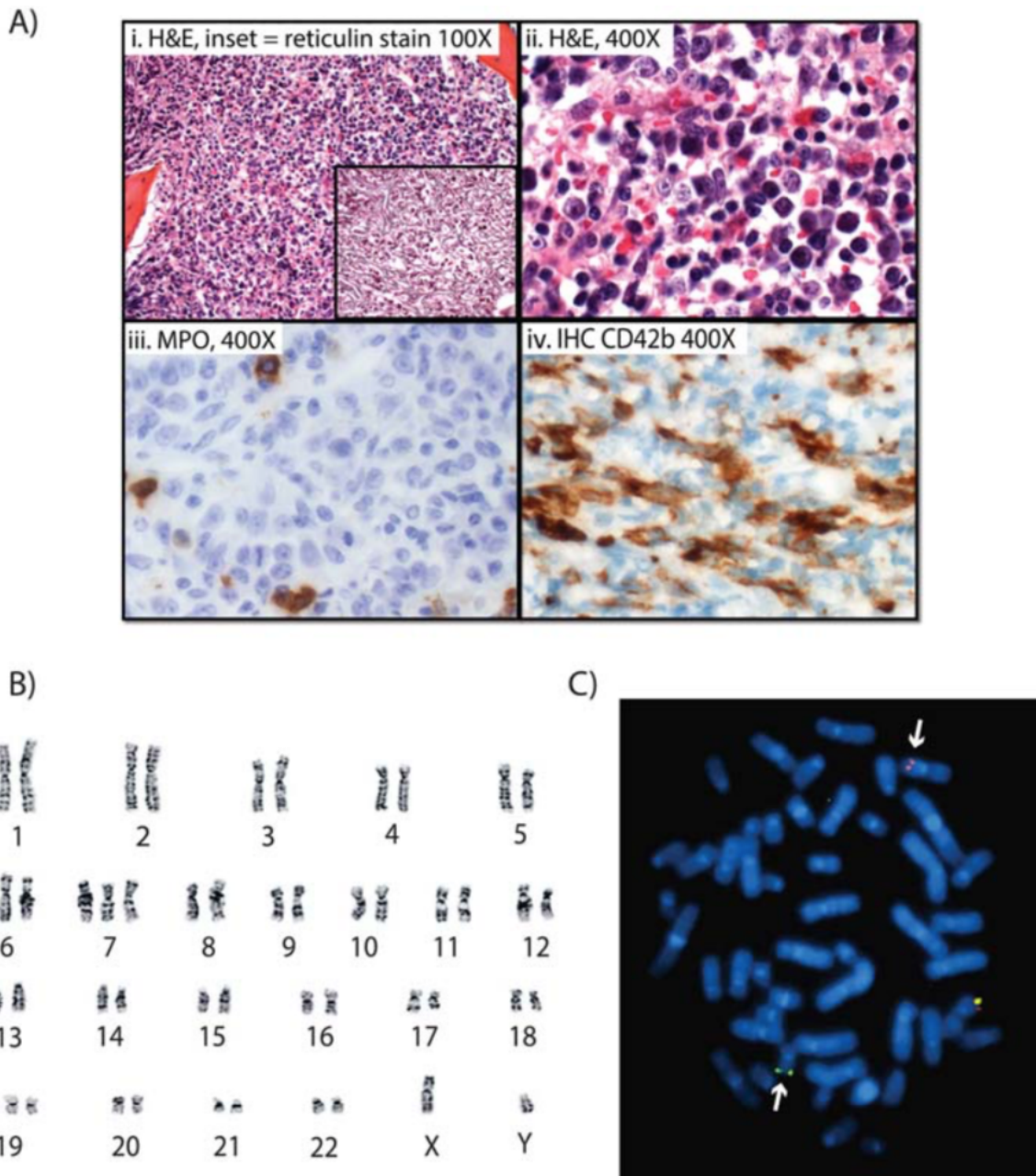


Figure 2-1 - Phenotypic and molecular characterization of diagnostic leukemia sample.

A) Histological analyses of bone marrow (BM) biopsy confirming the diagnosis of acute megakaryoblastic leukemia (AMKL): i. hematoxylin and eosin (H&E) stain, inset = reticulin stain, 100X magnification; ii. H&E stain, 400X magnification; iii-iv. immunohistochemistry (IHC) for the granulocytic antigen myeloperoxidase (MPO, negative) and for the megakaryocyte marker CD42b (positive). 400X magnification. **B)** GTG-banded karyotype of BM aspiration

sample at diagnosis. C) Metaphase FISH with a *NUP98* Agilent break-apart probe set showing a chromosomal translocation partitioning the locus (arrows).

Cytogenetic analyses performed on bone marrow (BM) cells demonstrated a complex karyotype with trisomy of chromosomes 6, 7, 19 and a t(11;17)(p15;q23) balanced translocation (Figure 1b). A dual-color split-signal fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis using an Agilent break-apart probe on metaphase chromosomes confirmed a chromosomal breakpoint within the *NUP98* locus at 11p15.4 (Figure 1c). A custom RT-PCR fusion panel could not detect the presence of a *NUP98-KDM5A* transcript, and also tested negative for other AMKL associated fusions (*CBFA2T3-GLIS2* and *RBM15-MKL1*, data not shown).

Transcriptome profiling using next generation sequencing (RNAseq) of RNA extracted from BM cells at diagnosis (e.g. D-AMKL) and at disease progression (or P-AMKL, from BM cells harvested after the fourth cycle of chemotherapy) confirmed expression of megakaryocytic and erythroid marker genes (e.g. *CD36*, *CD41*, *GATA1*, *CD42c*, Figure 2a) as well as upregulation of *HOXA9* and *HOXA10* cluster genes (Figure 2b), as seen with *NUP98* rearranged AML^{137,323}. RNAseq analysis also identified a novel chimeric fusion gene involving *NUP98* and *BPTF* in D-AMKL and P-AMKL cells. Out of five gene fusions detected in AMKL cells at diagnosis, only *NUP98-BPTF* had 17 unique spanning reads that support chimeric transcript, the 4 other candidates being supported by three or less unique sequencing spanning reads (Supplemental Table 1). The chimeric transcript corresponded to an in-frame fusion of exon 11 of *NUP98* with exon 24 of *BPTF* (bromodomain PHD finger transcription factor, at 17q24.2 chromosomal location), and the reciprocal *BPTF-NUP98* fusion was also detected by RNAseq in P-AMKL (Supplemental Table 1). *NUP98* and *BPTF* were expressed at comparable levels in D-AMKL, P-AMKL and CB-CD34⁺ cells (Supplemental Figure S1). To search for genetic alterations potentially cooperating with *NUP98-BPTF* fusion in AMKL, exome sequencing was performed with genomic DNA extracted from a BM aspiration sample at the stage of disease progression. Genomic variants were filtered on a list of 3014 oncology-related genes (Supplemental Table 3) and prioritized using *in silico* prediction tools for pathogenicity. Only variants predicted to be damaging by at least 3 out of 5 prediction tools in addition to nonsense and frameshift predicted variants are listed in Supplemental Table 4 (n=43 variants). None of these variants predicted to be damaging correspond to recurrent alterations

found in pediatric AMKL^{148,318}. Indels or other genetic alterations were not found in *RB1*, frequently mutated in NUP98-KDM5A AMKL¹⁴⁸. According to RNAseq data, the expression profile of *RB1* and G1/S cell cycle genes regulated by RB-E2F complexes³²⁴ was broadly similar in AMKL and CB-CD34⁺ cells (Supplemental Figure S1).

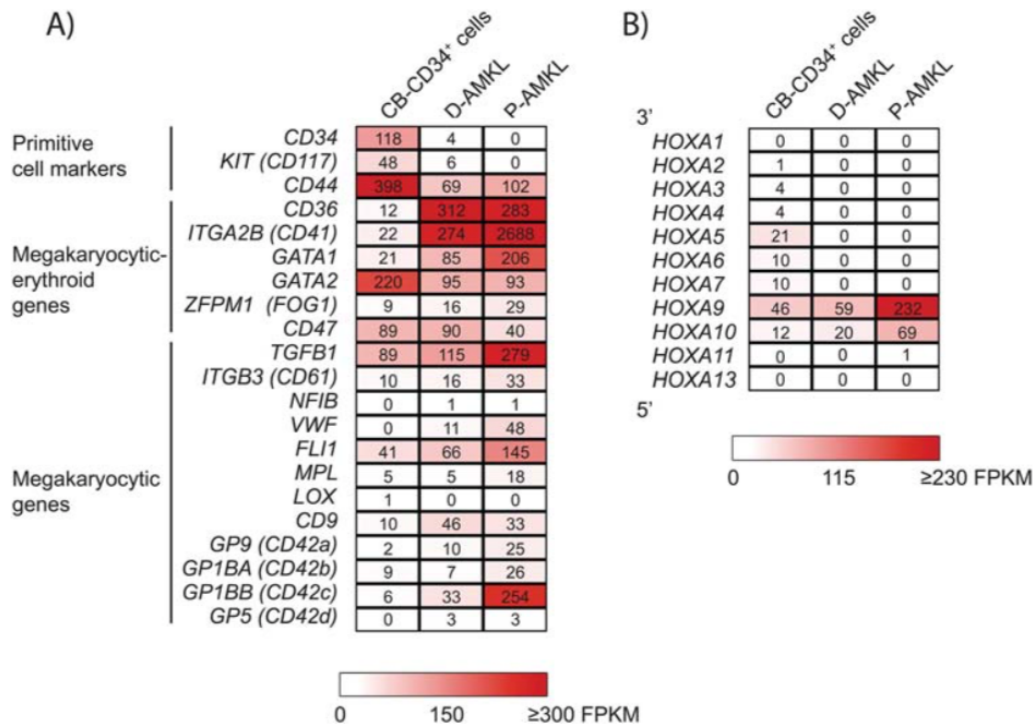


Figure 2-2 - Expression of mega-erythroid markers and HOXA cluster genes in NUP98-BPTF AMKL

Heat map representing expression values in FPKM (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads) for selected megakaryocytic and erythroid marker (A) or *HOXA* cluster (B) genes in leukemic cells from bone marrow aspirations compared to normal CD34⁺ cord blood cells (CB-CD34⁺, n=4, average). D-AMKL, AMKL at diagnosis; P-AMKL, AMKL at disease progression.

The presence of a *NUP98-BPTF* fusion transcript was further confirmed by RT-PCR and Sanger sequencing of the amplification product (Figure 3a). A schematic representation of the predicted *NUP98-BPTF* chimeric coding sequence is depicted in Figure 3b. The encoded chimeric protein consists of the N-terminal portion of NUP98 that includes two FG domains (nucleoporin phenylalanine-glycine repeats) and the C-terminal portion of BPTF that codes for a PHD domain (plant homeodomain, recognising di- and tri-methylated histone 3 lysine 4, or H3K4me2/3 epigenetic marks) and a bromodomain (recognition of acetylated H4K16, or H4K16Ac)³²⁵. In comparison, the AMKL associated NUP98-KDM5A fusion contains only one PHD domain from C-

terminal portion of the histone demethylase KDM5A, with no other chromatin recognition domain, fused to the N-terminal moiety of NUP98 (Figure 3b and Supplemental Figure S2a).

To analyse the full-length cDNA sequence of the *NUP98-BPTF* transcript we performed RT-PCR on BM sample RNA (Supplemental Text 1). Cloning of the amplified PCR products revealed two alternatively spliced isoforms of the fusion, differing by a sequence insertion between exons 24 and 25, leading to a transcript that encodes for a second predicted PHD domains upstream of the bromodomain for one of the splicing variants (Figure 3b, Supplemental Figure S2a, and Supplemental Text 1). Similarly, sequencing of the fusion breakpoint amplified by PCR confirmed the presence of distinct splicing isoforms encoding for either one or two PHD domains (bands size indicated in Figure 3c). The PHD domains of NUP98-BPTF and NUP98-KDM5A harbor a conserved CCCCHCCC motif which anchor two zinc atoms and H3K4me2/3 recognition residues³²⁶ (Supplemental Figure S2b). The *BPTF* sequence segment identified is found in several predicted RefSeq sequences (e.g. accession number XM_005257150.3) and is also detected in normal CD34⁺ cord blood stem/progenitor cells (Figure 3d).

The infant was treated off study according to the high-risk arm of the COG (Children Oncology Group) AAML 1031 study protocol and presented primary refractory disease. Following the first cycle of induction chemotherapy (low dose cytarabine, daunorubicin and etoposide), a partial response was achieved with 7% blasts in the BM by FISH. BM evaluation following a second cycle of treatment intensification with mitoxantrone and high-dose cytarabine showed 2.5% residual blasts. Frank disease progression (~20% by BM cytology) was noted following the third cycle of chemotherapy (etoposide and high-dose cytarabine), with overt relapse (elevation in LDH levels, 80% bone marrow blasts and splenomegaly, Figure 4a-c) following rescue treatment with 5-aza-FLAG-IDA regimen (cycle no. 4). At this point, clinical evolution prompted consideration for available experimental protocols. The disease was resistant to treatment with a BCL2 inhibitor. A significant hematological response was induced with a cycle of TVTC³²⁷ (topotecan, vinorelbine, thiotepa and clofarabine) attempted as a bridge to transplantation, with BM aplasia and few residual blasts at day 16 of cycle, normalisation of LDH levels (from >20x upper normal value at beginning of cycle) and marked reduction in spleen size.

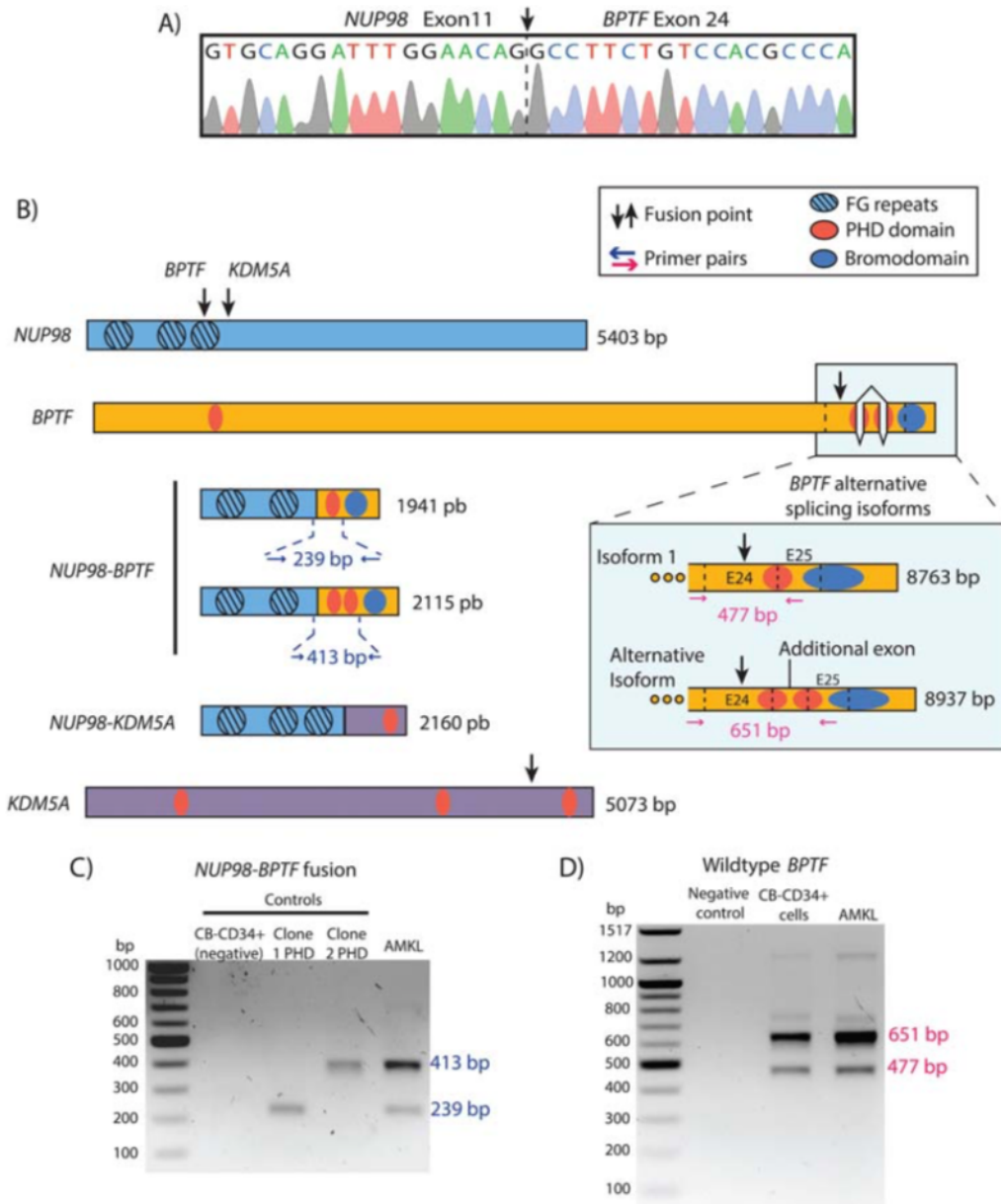


Figure 2-3 - AMKL bone marrow cells express two isoforms of *NUP98-BPTF* fusion.

A) Sanger sequencing confirmation of the *NUP98-BPTF* junctional breakpoint in a chimeric cDNA cloned from the patient bone marrow cells. **B)** Scaled schematic representation of the coding sequences of *NUP98* and *BPTF* and the fusion points leading to the chimeric fusion gene *NUP98-BPTF* identified by RNAseq analysis. Conserved protein domains were determined using NCBI's Conserved Domain Database. Colored circles represent selected functional domains: FG, Nucleoporin FG repeat region (striped); Bromodomain (blue); PHD, Plant homeodomain (red). *BPTF* and *KDM5A* have chromatin-recognition and/or modification functions. Alternative splicing of *BPTF* leads to the generation of two distinct *NUP98-BPTF* fusion isoforms encoding one or two PHD domains, as indicated. A sequence inserted between exons 24 and 25 is found in a transcript variant encoding 2 predicted PHD domains in tandem. **C)** Expression of two *NUP98-BPTF* fusion transcripts shown by RT-PCR using cDNA derived from freshly isolated AMKL bone marrow cells. PCR was also done with full length cDNA corresponding to each of the two alternative isoforms of *NUP98-BPTF* that were cloned and sequenced. Normal CD34⁺ cord blood cells (CB-CD34⁺) are negative for the expression of the chimeric fusion transcripts. PCR primer set and expected products are indicated in Figure 3b (dark blue). **D)** Expression of two alternatively spliced *BPTF* transcripts shown by RT-PCR using RNA derived from AMKL bone marrow or freshly isolated CB-CD34⁺ cells. PCR primer set and product sizes are indicated in Figure 3b (pink).

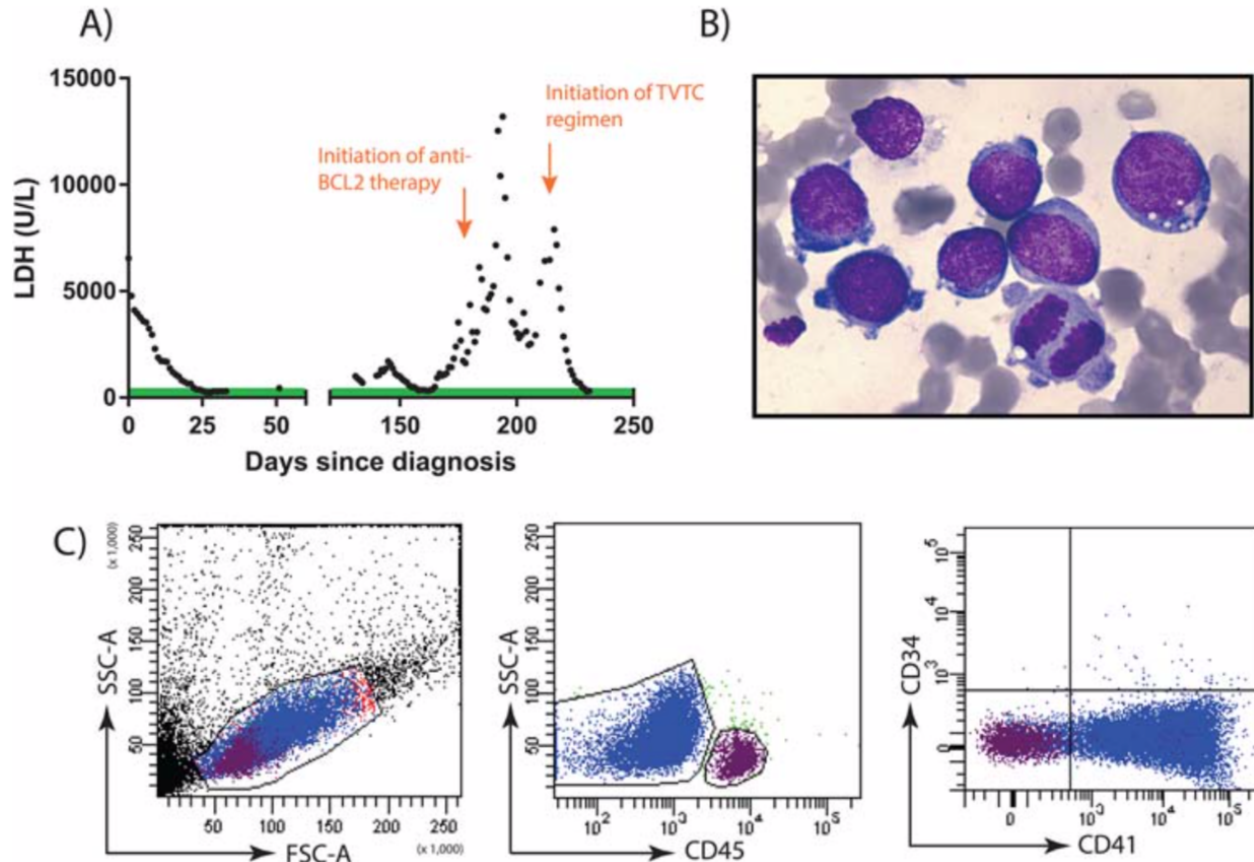


Figure 2-4 - Lactate dehydrogenase (LDH) levels correlate with disease progression.

A) Monitoring of peripheral blood LDH level over time. X axis indicates days following initial diagnosis. LDH levels were not measured between days 52 to 130. The green area represents the normal upper range of LDH level (462 U/L). Rescue chemotherapy regimens are indicated by orange arrows. **B)** Cytology of bone marrow aspiration sample evaluated after the fourth cycle of chemotherapy revealing infiltration by megakaryoblasts (Giemsa stained - 1000X magnification). **C)** Flow cytometry analysis showing a $CD45^{dim} CD34^{-} CD41^{+}$ blast cell population (colored in blue) at the stage of disease progression.

2.2.5 Discussion

We identified a *NUP98-BPTF* fusion transcript in an infant presenting with refractory AMKL, expanding the repertoire of NUP98 fusions associated with the disease. The predicted chromatin interacting modules of the C-terminal moiety of NUP98-BPTF share structural homology with NUP98-KDM5A, which is a recurrent fusion in AMKL. The overlap of chromatin targets between the two fusions remains to be determined. Leukemic blasts expressed alternative splicing variants of the fusion, containing either one or two C-terminal PHD domains upstream of the bromodomain. As observed in AMKL and in normal $CD34^{+}$ cells, we show that the human wildtype BPTF allele can alternatively encode for one or two C-terminal PHD domains.

NUP98 chimeric oncoproteins generally comprise the N-terminal FG repeat motifs of NUP98 and the C-terminal domains of the fusion partner. Multiple (~28) NUP98 fusion partners are reported¹¹⁵, and broadly classified into 3 groups based on the C-terminal protein domains involved: I) homeodomains (e.g. HOXA9), II) chromatin recognition and/or modification domains (e.g., KDM5A); or III) coiled coil domains (e.g. TOP1). NUP98 rearrangements most frequently associated with pediatric AML include NUP98-NSD1 (nuclear receptor binding SET domain protein 1) and NUP98-KDM5A, both part of group II. Overall, ~4% of pediatric AML cases harbor NUP98 rearrangements³²⁸ and they are generally associated with poor patient outcomes, with high rate of induction chemotherapy failure, and low cure rates^{217,328,329}. Overexpression of NUP98-KDM5A in BM cells is sufficient to generate short latency AML in mice¹⁵⁹, and the PHD domain plays a critical role in leukemic transformation by this fusion. Expression of *Hoxa5,7,9,10*, *Gata3*, *Meis1*, *Eya1* and *Pbx1* is upregulated in mice leukemic blasts, with confirmed epigenetic activation of the *Hoxa* gene cluster¹⁵⁹. Modeling of NUP98-BPTF leukemia will be required to dissect the molecular underpinnings of the disease, but expression profiling of this case of infant AMKL suggests activation of *HOXA9* and *HOXA10* genes cluster genes (Figure 2b). Whether the two reported fusion isoforms of NUP98-BPTF target distinct sets of chromatin loci remains an intriguing question for future studies.

BPTF is a core subunit of the NURF (Nucleosome Remodeling Factor) ATP-dependent chromatin-remodeling complex, which includes the ISWI ATPase³²⁵. BPTF contains chromatin interacting modules, but no reported catalytic domains. The NURF complex is reported to regulate homeotic gene expression^{77,325,330} and cell fate decisions³³¹⁻³³³. BPTF is shown to target the *HOXA9* locus via the combinatorial action of its C-terminal PHD-Bromodomain tandem³³⁰, and to sustain c-MYC transcriptional activity in tumors³³⁴. Although the human *BPTF* transcript variants annotated thus far code for a single PHD domain, the fly BPTF protein homolog Nurf301 is reported to harbor two closely spaced C-terminal PDH domains followed by the bromodomain³²⁵ (Supplemental Figure 3). It will be of great interest to investigate in the future if the two *NUP98-BPTF* fusion isoforms bear distinct oncogenic potential, has both are clearly expressed in leukemic blasts.

Although NUP98-BPTF fusion was reported in a T-ALL case^{335,336}, it has never been found in AMKL or other AML subtypes. NUP98-BPTF was not identified in a large collection of AMKL specimens

interrogated by next generation sequencing technologies where several gene fusions were uncovered (89 pediatric and 24 adult AMKL specimens)¹⁴⁸. NUP98-BPTF was not reported among the gene fusions identified in a sampling of 197 pediatric AML interrogated by whole genome sequencing and supported by RNAseq or cytogenetic data¹³⁴. Nonetheless, out of 574 pediatric AML specimens interrogated by targeted approaches (e.g. cytogenetics, FISH and selected RNAseq), 22 harbored a *NUP98* rearrangement (3.8%) and one of them presented a complex karyotype with a t(11;17) (p15;q23) translocation, as detected in this AMKL case, involving an undefined NUP98 partner (CK#14)³²⁸. The NUP98 fusion partner could not be identified by RNAseq since RNA was not available³²⁸. Given the chromosomal localisation of the fusion point, BPTF could be the undefined NUP98 partner associated with this particular AML case (FAB M6 in a 17-month-old infant).

Importantly, our study further pleads for improved access to RNA sequencing for clinical diagnostics in oncology, particularly for infant and pediatric leukemia, often driven by a plethora of potent chimeric fusion oncogenes^{118,337}. Specific fusion transcript identification is critical for AMKL diagnosis, to improve molecular classification and risk stratification, and guide therapeutic decisions. Fusion transcript detection by RT-PCR can accelerate diagnosis of hypocellular BM samples typically collected in AMKL, and can serve as a modality to assess treatment response, or MRD (minimal residual disease). Identification of recurrent mutations is seminal to develop AMKL subtype specific models, to identify functional susceptibilities and novel biomarkers for a disease still plagued with dismal cure rates. The role of clofarabine containing regimens³²⁷ in *NUP98* rearranged AMKL warrants investigation in future multicentre clinical trials.

2.2.6 Acknowledgements

We sincerely thank patients and their families for their outstanding support, as well as members of the pediatric hematology-oncology team and the clinical laboratories of CHU Sainte-Justine. We thank Virginie Saillour, Charles Privé and René Allard of the Integrated Centre for Pediatric Clinical Genomics at CHU Sainte-Justine for their contribution with whole exome sequencing, and Jennifer Huber at IRIC (Institute for Research in Immunology and Cancer) for her valuable assistance with RNA sequencing. We are grateful to members of the hematology-oncology division of CHU Sainte-Justine for their contribution to the BCLQ biobanking initiative. We are also

grateful to the generous support of charity foundations. We acknowledge the seminal contribution of the Cole Foundation as SC is a recipient of the Cole Foundation Transition Award. SC holds a Terry Fox New Investigator Award, as well as Charles-Bruneau Foundation and CHU Sainte-Justine Research Awards

2.3 Cryptic recurrent ACIN1-NUTM1 fusions in non KMT2A-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia

Thomas Pincez^{1,2*}, Josette-Renée Landry,^{1,2,3*} Mathieu Roussy,^{1,2,4*} Loubna Jouan,⁵ Mélanie Bilodeau,¹ Louise Laramée,¹ Françoise Couture,⁶ Daniel Sinnett,^{1,2} Patrick Gendron,⁷ Josée Hébert,^{2,8,9,10} Luc Oligny,^{2,11} Alexandre Rouette,⁵ Thai Hoa Tran,^{1,2} Brian T. Wilhelm,^{2,10,12} Henrique Bittencourt^{1,2} and Sonia Cellot^{1,2,9}

1: Pediatric Hematology-Oncology Division, Charles-Bruneau Cancer Center, CHU Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada

2: Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

3: Streamline Genomics, Montréal, Québec, Canada

4: Department of Biomedical Sciences, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

5: Integrated Centre for Pediatric Clinical Genomics, CHU Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada

6: Molecular diagnostic laboratory, CHU Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada

7: Bioinformatics Core Facility, Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

8: Division of Hematology, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montréal, Québec, Canada

9: Quebec Leukemia Cell Bank, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montréal, Québec, Canada

10: Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC), Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

11: Department of Pathology, CHU Sainte-Justine, Montréal, Québec, Canada

12: Laboratory for high throughput biology, IRIC, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

*T.P., J.R.L. and M.R. contributed equally as first authors

Keywords: NUTM1, Infant leukemia, acute lymphoblastic leukemia, transcriptomics, gene-fusion, minimal residual disease

Reference : Pincez, T. *, J. R. Landry*, M. Roussy*, L. Jouan, M. Bilodeau, L. Laramée, F. Couture, D. Sinnett, P. Gendron, J. Hébert, L. Oligny, A. Rouette, T. H. Tran, B. T. Wilhelm, H. Bittencourt, and S. Cellot. 2020. 'Cryptic recurrent ACIN1-NUTM1 fusions in non- KMT2A-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia', *Genes Chromosomes Cancer*, 59: 125-30.

Status : Published

2.3.1 Abstract

Infant acute lymphoblastic leukemias (ALL) are rare hematological malignancies occurring in children younger than 1 year of age, most frequently associated with *KMT2A* rearrangements (*KMT2A-r*). The smaller subset without *KMT2A-r*, which represents 20% of infant ALL cases, is poorly characterized. Here we report two cases of chemotherapy-sensitive non *KMT2A-r* infant ALL. Transcriptome analyses revealed identical *ACIN1-NUTM1* gene fusions in both cases, derived from cryptic chromosomal rearrangements undetected by standard cytogenetic approaches. Two isoforms of the gene fusion, joining exons 3 or 4 of *ACIN1* to exon 3 of *NUTM1*, were identified. Both fusion transcripts contained the functional DNA-binding SAP (SAF-A/B, Acinus and PIAS) domain of *ACIN1* and most of *NUTM1*. The detection of the *ACIN1-NUTM1* fusion by RT-PCR allowed the molecular monitoring of minimal residual disease in a clinical setting. Based on publicly available genomic datasets and literature review, we predict that *NUTM1* gene fusions are recurrent events in infant ALL. As such, we propose two clinically-relevant assays to screen for *NUTM1* rearrangements in bone marrow cells, independent of the fusion partner: *NUTM1* immunohistochemistry and *NUTM1* RNA expression. In sum, our study identifies *ACIN1-NUTM1* as a recurrent and possibly cryptic fusion in non *KMT2A-r* infant ALL, provides clinical tools to screen for *NUTM1*-rearranged leukemia and contributes to the refinement of this new subgroup.

2.3.2 Introduction

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) in children less than 1 year of age (infant ALL) is a rare subtype of ALL³³⁸. Infant ALL is a specific entity with a distinct biology and treatment response than its pediatric ALL counterpart³³⁹. Around 80% of cases harbor a histone lysine methyltransferase 2A gene (*KMT2A*, formerly known as mixed-lineage leukemia (*MLL*) gene) rearrangement (*KMT2A-r*)³⁴⁰, and are plagued with dismal cure rates³⁴¹. The smaller subgroup of non *KMT2A-r* patients fare better outcomes but remain poorly characterized³⁴⁰. Gene-expression studies have shown a pattern specific to this entity, which differs from *KMT2A-r* and non-infant B-cell precursor (BCP)-ALL³⁴². However, no clear subcategories of non *KMT2A-r* infant ALL are known³⁴³.

NUTM1 (NUT midline carcinoma family member 1, located on chromosome 15q14) gene rearrangements (*NUTM1-r*) have recently been identified as a rare but recurrent event in pediatric BCP-ALL (9 cases out of 1,223)³⁴⁴. Chromosomes bands 15q13-15 abnormalities have been identified through standard karyotyping in 23 out of 1,946 childhood ALL cases, including 3 infant ALL, but the gene(s) involved were not identified³⁴⁵. One patient with an infant ALL has been reported with *ins(15;14)* leading to a *ACIN1* (apoptotic chromatin condensation inducer 1, located on chromosome 14q11.2)-*NUTM1* fusion³⁴⁶. Here, we describe two non *KMT2A-r* infant ALL cases with normal karyotypes and a cryptic *ACIN1-NUTM1* fusion identified by transcriptome analyses. Clinically, we show that *NUTM1* fusions can be easily screened for using immunohistochemistry (IHC) or gene-expression assays, providing a novel marker to monitor minimal residual disease (MRD). Based on these cases and literature review, we show that *NUTM1* fusions are recurrent in non *KMT2A-r* infant.

2.3.3 Methods

2.3.3.1 Collection of samples from patients

MRD was routinely performed using multiparametric flow cytometry (FC) by Hematologics Inc., Seattle, Washington with a sensitivity threshold from 1 to $10 \cdot 10^{-4}$, depending on cell purity. For BM_006, clonal immunoglobulin heavy chain/B-cell receptor (IGH/BCR) was investigated through polymerase chain reaction (PCR) by Hematologics Inc. IHC stains were performed using Dako autostainer (Agilent, Santa Clara, CA) with commercial rabbit monoclonal anti-NUT antibody

(Clone C52B1, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) according to manufacturer's recommendations. Patients' samples were compared to a normal bone marrow (BM, negative control) and testicular (positive control) samples. The Institutional Review Board of CHU Sainte-Justine approved the study and informed consent was obtained from the parents.

2.3.3.2 Isolation of human CD34+ cord blood cells

Isolation, RNA extraction and sequencing of CD34+ cord blood cells (CB-CD34+) were performed as previously described.¹⁰ The protocol was approved by the Research Ethics Board of CHU Sainte-Justine.

2.3.3.3 RNA sequencing and bioinformatics analysis

Total RNA was extracted from diagnosis BM aspiration and sequenced with Illumina Nextseq500 as previously described³⁴⁷. Library preparation and sequencing were performed at the Institute for Research in Immunology and Cancer's Genomics Platform (Université de Montréal, Montréal, Canada). Briefly, sequences were aligned to the reference human genome version GRCh38 (gene annotation from Gencode version 24) using STAR version 2.5.1b. Gene expression were estimated directly from STAR as readcount values. Quality control values are shown in Table S1. Sequences were subsequently analyzed using FusionCatcher 0.99.6a in order to identify potential gene fusions (Table S2).

RPKM values for *NUTM1* expression of *ACIN1-NUTM1* patients were compared to those of ALL patients of the TARGET ALL cohort (n=213, <https://ocg.cancer.gov/programs/target>). Comparisons were also made with engineered human models of *KMT2A-MLLT3* B-ALL (*KMT2A-r* mB-ALL, n=8)³⁴⁸, and normal CB-CD34+ using non-parametric Wilcoxon–Mann–Whitney test (two-sided, statistical significance threshold of p<0.05).

2.3.3.4 Nested RT-PCR and cDNA cloning

ACIN1-NUTM1 fusion transcripts were cloned from bone marrow cell total RNA of BM_012 and were fully sequenced using Sanger sequencing. Nested RT-PCR of the *ACIN1-NUTM1* fusion transcript was performed to follow MRD for both cases using conditions determined in the institutional molecular diagnostic laboratory. Complete primer list is shown in Table S3.

2.3.3.5 *NUTM1* fusions across ALL

To search for other *NUTM1* fusions associated with ALL, several public databases were queried, including Pubmed, Google Scholar, Web of Science and the Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology (<http://www.atlasgeneticsoncology.org/>) (as per January 21, 2019). Keywords used were “*NUTM1*” and/or “*NUT*”.

2.3.4 Cases studied

The first case (BM_006) was diagnosed with non *KMT2A-r* BCP-ALL at 18 days (Table S4). He presented at birth with neonatal hyperleukocytosis of 94 G/L with no cytologically detectable leukemic cells (Figure 2.5A). After a spontaneous normalization of the blood count, white blood cells increase and circulating blasts appeared (Figure S1). The second case (BM_012) was diagnosed with hyperleukocytosis non *KMT2A-r* BCP-ALL at 8 months (Table S4). Both patients were treated as low-risk patients according to the interfant 06 protocol (NCT00550992) and a complete remission was obtained after induction with an undetectable MRD as assessed by FC.

2.3.5 Results

2.3.5.1 *ACIN1-NUTM1* fusion identification

In the absence of an identifiable cytogenetic alteration associated with non *KMT2A-r* BCP-ALL in two infants, RNA-Seq was performed on BM diagnosis samples. An *ACIN1-NUTM1* fusion was identified in both patients with the same in-frame transcripts (Table S2). Two alternatively spliced fusion products were predicted, one fusing the 3 first exons of *ACIN1* to the exon 3 of *NUTM1* and another fusing the 4 first exon of *ACIN1* to the same exon 3 of *NUTM1* (Figure 2.5B), as identified in public databases. The reciprocal fusion transcript was not detected by RNA-Seq, nor other fusion transcripts, mutation, deletion or amplification deemed to be pathogenic. RT-PCR with diagnostic sample RNA and Sanger sequencing of the amplification products confirmed 2 alternatively spliced chimeric transcripts harboring the fusion breakpoint identified by RNAseq (Figure 2.5C). Both fusion transcripts contained the functional DNA-binding SAP (SAF-A/B, Acinus and PIAS) domain of *ACIN1* and most of *NUTM1* sequence³⁴⁹.

To assess if *NUTM1-r* are potentially recurrent alterations in infant ALL, we performed literature/database search using published and/or publicly available RNA-Seq datasets from

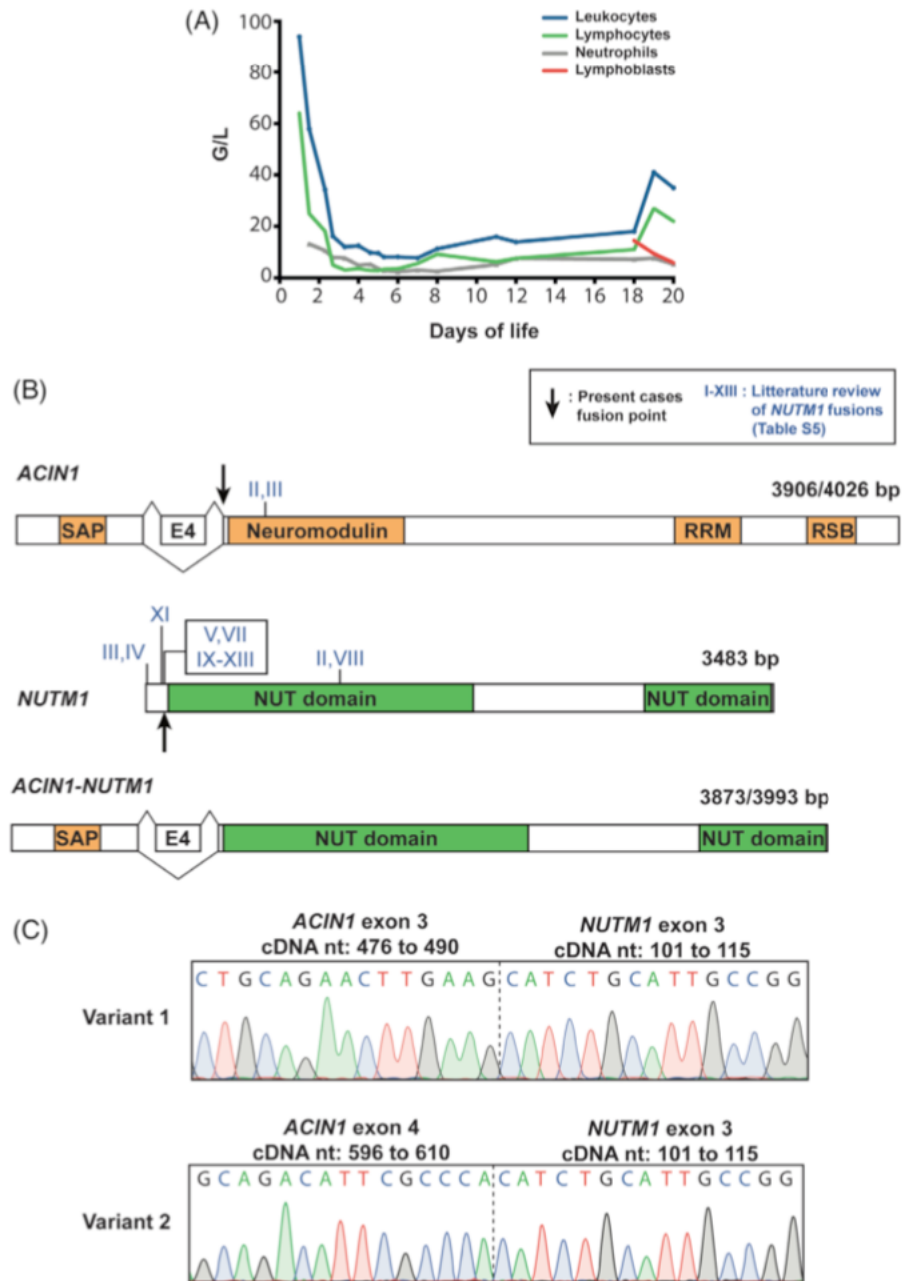


Figure 2-5 - Identification of ACIN1-NUTM1 fusion transcripts in infant ALL.

A) White blood cell counts during the first days of life of case BM_006. Differential cell counts were assessed by visual examination of blood smears. **B)** Schematic representation of coding sequences for ACIN1 (NCBI: NM_014977.3), NUTM1 (NCBI: NM_001284292.1), and the ACIN1- NUTM1 fusion splicing variants. Conserved protein domains were determined using the NCBI's Conserved Domain Database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>). Alternative splicing and fusion points are indicated with lines and arrows, respectively. Roman numbers represent fusion points of NUTM1 with ACIN1 and other genes reported in the literature (Table S5). I: ACIN1, II: ACIN1, III: ACIN1, IV: AF4, V: AF4, VI: BPTF (not shown), VII: BRD9, VIII: CUX1, IX: IKZF1, XI: SLC12A6, XII: ZNF618, XIII: ZNF618. **C)** Sanger sequencing chromatograms showing two ACIN1-NUTM1 splicing variants cloned from patient BM_012 bone marrow mRNA.

pediatric ALL cohorts. Thirteen patients were identified with 8 different fusion partners always located at the 5' portion of the fusion product (Table S5)^{344,346,350-354}. Two infant BCP-ALL were

identified harboring either *ACIN1*- or *BRD9-NUTM1* fusions.⁹ These findings suggest that genetic rearrangements of *NUTM1* with various fusion partners may be recurrent events in infant BCP-ALL, as reported in pediatric BCP-ALL³⁴⁴. However, their frequencies remain challenging to estimate given the low incidence of infant ALL, the small number of reported cases, and sometimes the lack of abnormal karyotypic features.

2.3.5.2 MRD monitoring through RT-PCR

Identification of the *NUTM1* genetic alteration enabled molecular assessment of treatment response through MRD using a nested RT-PCR approach to serially track the presence of the fusion transcript. Nested RT-PCR using serial dilutions of diagnostic sample determined a sensitivity threshold of ≤ 1 in 10^{-4} for this approach (data not shown). A dual modality approach, combining FC and molecular MRD tracking strategies were thus used to follow treatment response. Patient BM_006 had no detectable MRD in FC after the induction and the 2 subsequent chemotherapy courses (Figure 2.6 A). Before the maintenance chemotherapy regiment, FC identified an abnormal population in three successive samples (0.2 to 0.4% of the cell analyzed). Nested RT-PCR on the same samples failed to detect the presence of the *ACIN1-NUTM1* fusion transcript. To confirm this result, clonal IGH/BCR rearrangements were sequenced and identified no MRD. Based on these results, a clinical decision was made to refrain from treatment intensification at this point. Pursuing with the initial treatment protocol, FC MRD became undetectable at the subsequent BM assessment and remained negative. The patient was doing well at last evaluation 30 months after the diagnosis. Patient BM_012 had an undetectable MRD through FC at the fifth timepoint analyzed. RT-PCR detected no *ACIN1-NUTM1* fusion transcript on two samples analyzed at 8 and 13 months after diagnosis. The patient was doing well at the last follow-up 27 months after the diagnosis.

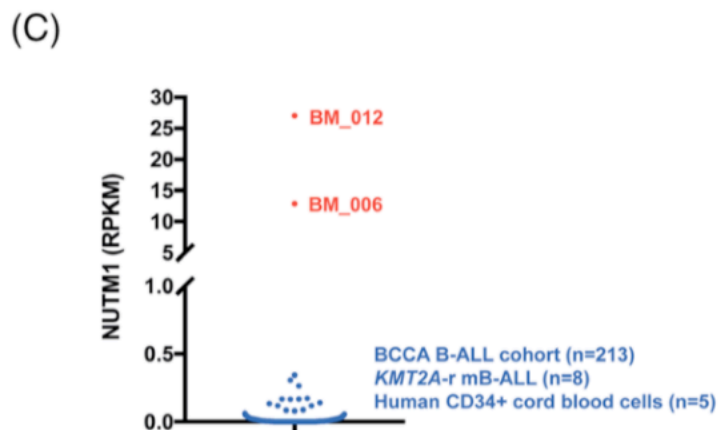
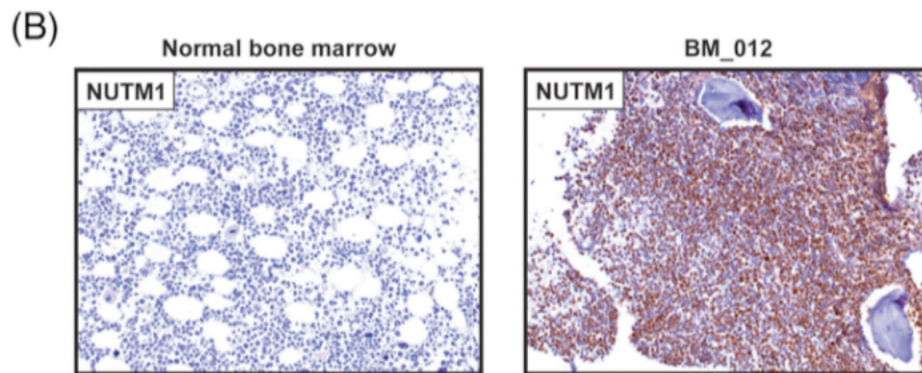
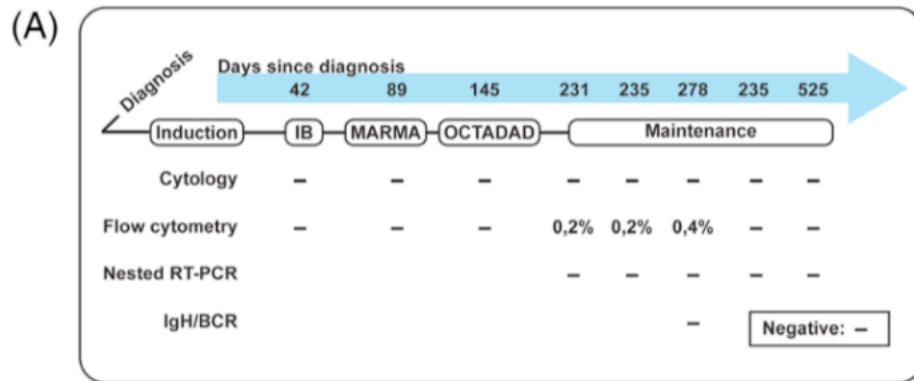


Figure 2-6 - Expression of NUTM1 gene fusion in leukemic bone marrows cells.

A) Cytology, flow cytometry, and molecular MRD tracking using nested RT-PCR for ACIN1-NUTM1 fusion transcript and IgH/BCR were conducted for case BM_006 on serial bone marrow aspiration samples, as indicated. Blue arrow, timeline since diagnosis. The name of chemotherapy courses are indicated under the timeline. **B)** Immunohistochemistry staining for NUTM1 in normal (negative) and NUTM1-r leukemic (positive) bone marrow cells. **C)** Expression of NUTM1 (RPKM) in BM cells derived from ACIN1-NUTM1 infant leukemia cases (red) compared to engineered models of KMT2A-r human B-ALL models (mB-ALL), human CD34+ cord blood cells and pediatric BCP-ALL cases from TARGET cohort (blue). The TARGET cohort includes the following defined subgroups: hyperdiploidy without trisomy of both chromosomes 4 and 10 (n = 26), TCF3-rearrangement (n = 24), ETV6-RUNX1 (n = 20), intrachromosomal amplification of chromosome 21 (n = 8) and KMT2A-r (n = 4). NUTM1-r leukemic bone marrow cells express significantly higher levels of NUTM1 leukemia (median 20 vs 0.0043, P < .0001)

2.3.5.3 Clinical identification of *NUTM1* fusions

In the optic of screening for the presence *NUTM1*-r in the clinical setting, irrespective of fusion partner, we performed IHC studies on BM biopsy specimens to detect the *NUTM1* protein levels in leukemia patient samples. As shown in Table S5, the *NUTM1* fusions contain most of the C-terminal exons of *NUTM1*, a gene whose expression is physiologically restricted to testicular and ovarian tissue ^{355,356}. We hypothesized that an aberrant pattern of *NUTM1* expression in hematopoietic cells can be readily indicative of a pathological state, and evoke the presence of a *NUTM1*-r leukemia. *NUTM1* IHC on BM biopsy of BM_012 (BM biopsy not performed for BM_006) showed an overt expression of *NUTM1* (Figure 2.6 B), with almost all leukemic cells presenting a strong staining.

As an alternative detection strategy for *NUTM1*-r, we assessed *NUTM1* transcript expression levels of the two infant *ACIN1-NUTM1* patient samples as compared to pediatric BCP-ALL patient samples (n=213), *KMT2A*-r mB-ALL (n=8) and normal CB-CD34+ (n=5) ³⁴⁸. *NUTM1* expression was significantly higher in the two infantile cases of BCP-ALL (RPKM of 12.8 and 27.0) when compared to the other cohorts where the gene was essentially silenced (expression ranged from an RPKM of 0 to 0.34, p<0.0001) (Figure 2.6 C), indicating that high *NUTM1* expression may indeed be specific to *NUTM1*-r leukemia.

2.3.6 Discussion

Infant leukemia has long been recognized for its overall poor prognosis. Despite their seemingly better outcome than *KMT2A*-r infant ALL, the event-free survival is somewhat lower than pediatric BCP-ALL ³⁵⁷. The identification of *NUTM1*-r as recurrent in infant ALL brings forward a new subgroup in non *KMT2A*-r infant ALL and will contribute to refine molecular classification and risk stratification for these patients. Interestingly, *NUTM1*-r were recently identified as a specific subgroup in pediatric BCP-ALL ³⁴⁴. This group appears to be shared between infant and pediatric BCP-ALL with a variable age at diagnosis. Including the cases presented herein, a total of five patients with *ACIN1-NUTM1* fusions have been reported, the oldest being 14-month-old at diagnosis. The other *NUTM1* infant ALL reported fusion partner to date is *BRD9* (bromodomain-containing protein 9) ³⁴⁶. As *KMT2A*-r were shown to be an event occurring *in utero* ³⁵⁸, one case

described herein (BM_006) presented a neonatal leukemia, implying that the leukemic transformation event originated in fetal hematopoietic precursors.

Contrary to chromosome bands 15q13-15 abnormalities putatively involving *NUTM1* rearrangements and to the unique *ACIN1-NUTM1* infant ALL previously published^{345,346}, both our cases presented with normal BM karyotypes. This element argues for a systematic screening for *NUTM1-r* in non *KMT2A-r* infant ALL. However, the routine screening for rearrangement in leukemia requires standardized and easy-to-use techniques to be performed in a wide range of clinical settings. We show that *NUTM1-r* identification does not necessary require a specific RT-PCR to be identified. *NUTM1* IHC using a commercial antibody designed for NUT midline carcinoma was able to display a clear identification of *NUTM1* expression. Furthermore, *NUTM1* RNA expression in leukemic BM cells of both cases was significantly higher than pediatric and *KMT2A-r* BCP ALL. Multicenter studies are required to determine the clinical validity of *NUTM1-r* detection for patient care, in terms of risk stratification and tracking of treatment response.

The functional consequences of *NUTM1* fusions and their role in leukemogenesis remain to be elucidated. *NUTM1* (8 exons) encodes for a protein physiologically restricted to the testes and ovary but whose function is unknown^{355,356}. Its rearrangement is the hallmark of NUT midline carcinoma, an aggressive subtype of squamous cell carcinoma^{359,360}. In this pathology, almost all the *NUTM1* sequence (with the exception of the first exon) is conserved in the fusion transcript, which has been shown to result in aberrant chromatin regulation and consistent hyperexpression of *MYC*^{361,362}. In ALL, the *NUTM1* fusion product reported also contained most of *NUTM1* sequence. All *NUTM1* fusion partners identified to date are in the 5' position of the fusion transcript but their implication are not known. The fused 5' partner sequences correspond predominantly to the first exons of the gene, which could fit with a model where the partner-promoter would be key component to allow non-gonadic *NUTM1* expression.

In conclusion, *ACIN1-NUTM1* fusions are a recurrent event in non *KMT2A-r* infant ALL and can be cryptic on standard karyotype analysis. Screening for *NUTM1-r* is clinically relevant as it provides a molecular target for MRD monitoring and can be performed using IHC or *NUTM1* gene expression. Collaborative networks are needed to improve the knowledge of these rare ALL.

2.3.7 Acknowledgments

We sincerely thank patients and their families for their support, as well as members of the pediatric hematology-oncology team of CHU Sainte-Justine. We thank Jennifer Huber at IRIC (Institute for Research in Immunology and Cancer) for her assistance with RNA sequencing. We thank Dr Emmanuelle Lemyre and France Léveillé at CHU Sainte-Justine for revisions of the cytogenetics results.

2.3.8 Funding

This work was supported through a CCSRI impact grant (S.C., B.T.W.). We are also grateful to the generous support of charity foundations. S.C. is recipient of a Cole Foundation Transition Award, a Terry Fox New Investigator grant and a Charles Bruneau Foundation grant. T.P. is a recipient of a Charles Bruneau fellowship award. J.R.L. is the recipient of the Fonds de recherche du Québec (FRQ) Innovator in Residence fellowship. M.R. is a recipient of a Cole Foundation PhD Fellowship.

2.3.9 Authorship Contributions

T.P., J.R.L., M.B. and S.C. wrote the manuscript. J.R.L., M.R., L.J., L.L., F.C., P.G., J.H., A.R., D.S. and B.T.W. contributed to RNA sequencing, analysis and gene fusion identification. L.O. performed immunohistochemistry analyses. T.H.T. and H.B. were in charge of the patients. T.P., M.R. and J.R.L. generated the figures. All authors revised the manuscript.

2.3.10 Disclosure of Conflicts of Interest

J.R.L. is a founder and has ownership stake in Streamline Genomics. B.T.W. is a scientific advisor to Streamline Genomics. T.P., M.R., L.J., M.B., L.L., F.C., D.S., P.G., J.H., L.O., A.R., T.H.T., H.B. and S.C. declare no conflicts of interests.

2.3.11 Data Availability Statement

Data available on request from the author

3 Génération et caractérisation de modèles humains de leucémies de l'enfant induites par l'oncogène de fusion *NUP98::KDM5A*

3.1 Préface

Ce chapitre présente un article traitant de la génération de modèles humains de leucémies AMKL induites par des gènes de fusion impliquant *NUP98*. La génération de modèles humains de leucémie est primordiale afin de pallier à la rareté des spécimens ainsi qu'à la faible biomasse disponible aux fins de la recherche.

Notre laboratoire utilise deux approches afin de générer des modèles humains de leucémie. La première approche consiste à la transduction de cellules souches et progénitrices hématopoïétiques (HSPC) CD34+ isolées de sang de cordon avec un vecteur lentiviral. Cette transduction permet l'introduction et l'expression d'un oncogène de fusion, tel que *NUP98::KDM5A*, chez ces cellules. Ces cellules transduites sont ensuite transplantées chez la souris immunodéficiente (xénogreffe). Ces modèles sont désignés comme « synthétiques ». La deuxième approche nécessite l'accès à des cellules primaires de patient. Ces cellules sont alors directement transplantées chez la souris afin de générer un modèle de type pdx (pdx : Patient Derived Xenograft) (voir figure 3-0). Les cellules leucémiques obtenues des modèles synthétiques et pdx sont caractérisées moléculairement et fonctionnellement en comparaison aux cellules primaires de patient ainsi qu'aux cellules normales, afin d'identifier des vulnérabilités thérapeutiques ainsi que des biomarqueurs.

Dans ce chapitre, nous présentons la génération de modèles synthétiques de leucémie myéloïde par transduction lentivirale de la fusion *NUP98::KDM5A* (N5A) chez des cellules CD34+ isolées de sang de cordon. En parallèle, nous avons aussi généré un modèle de leucémie mégacaryoblastique de type pdx présentant la fusion *NUP98::BPTF* (NTF). La transplantation sériée du modèle pdx nous a permis d'obtenir la biomasse nécessaire afin d'effectuer une première analyse des protéines de surface cellulaire par LC-MS. Cette analyse a permis de confirmer la présence de plusieurs biomarqueurs de la leucémie AMKL initiée par un réarrangement de *NUP98* telle que SELP, NEO1 et MPIG6B.

De plus, nos modèles ont été utilisés afin d'identifier des vulnérabilités thérapeutiques. Nous avons démontré par des courbes doses-réponse que l'inhibition de la voie JAK-STAT impactait de manière plus importante la survie des cellules mégacaryoblastiques comparativement aux cellules CD34+ normales.

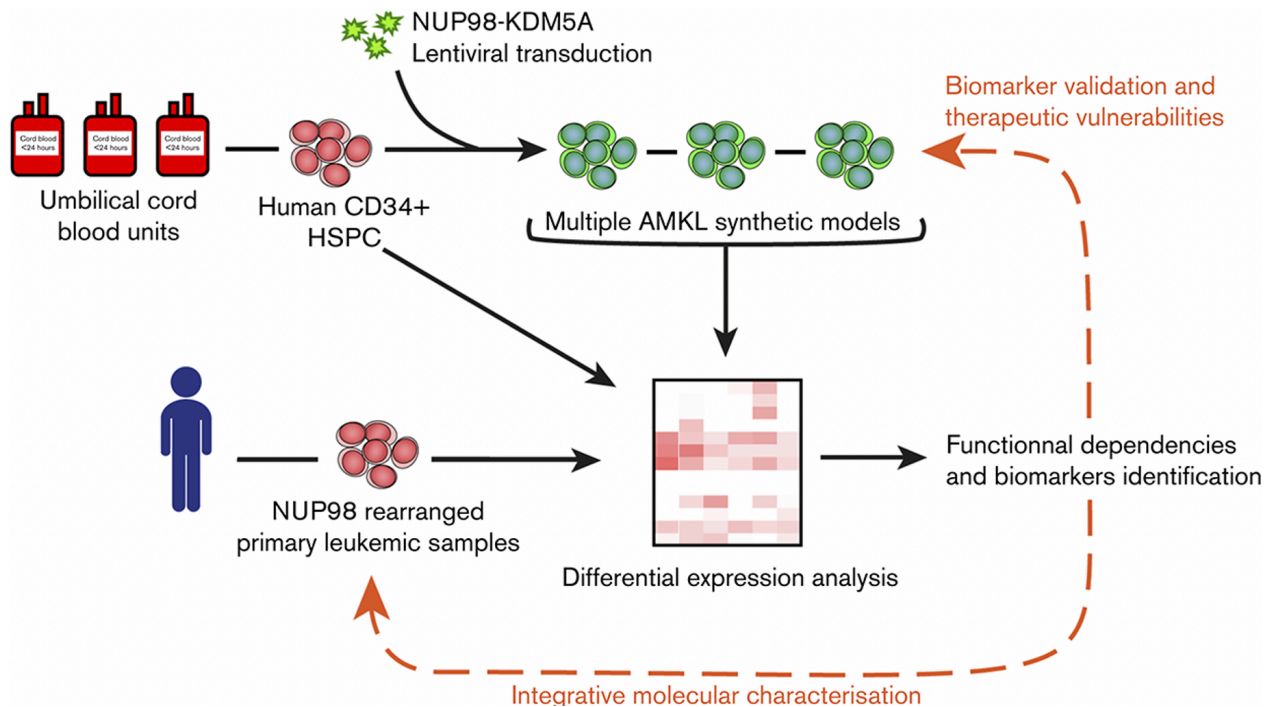


Figure 3-0 – Résumé des approches utilisées par le laboratoire afin de générer des modèles de leucémie.

3.1.1 Contribution

J'ai assisté Sophie Cardin lors des expériences de modélisation de la leucémie impliquant la fusion *NUP98::KMD5A*. Avec Sophie C. et Mélanie B., j'ai euthanasié les souris expérimentales ainsi que caractérisé les cellules humaines récoltées des organes hématopoïétiques.

De plus, j'ai contribué à la caractérisation immunophénotypique, morphologique et transcriptomique des modèles N5A. J'ai été significativement impliqué dans l'analyse des données de transcriptomique, la génération des figures ainsi que la révision du manuscrit.

J'ai pris en charge la génération ainsi que la caractérisation du modèle AMKL pdxNTF. Ce modèle nous a permis de faire l'analyse du protéome de surface (surfaceome) par chromatographie en phase liquide jumelé à la spectrométrie de masse en tandem. En collaboration avec le laboratoire de Philippe Roux à l'IRIC, j'ai conçu l'expérience et analysé les données primaires du surfaceome.

Ces analyses ont permis d'identifier de nouveaux biomarqueurs potentiels des leucémies présentant un réarrangement du gène *NUP98*.

De plus, ces analyses de transcriptomique et du surfaceome ont mis en évidence la voie JAK-STAT comme potentielle cible thérapeutique. J'ai analysé les données des expériences de courbes doses-réponses impliquant le ruxolitinib et le tofacitinib ainsi que généré ces figures avec Mélanie B.

En parallèle aux expériences de modélisation de la leucémie mégacaryoblastique induite par N5A, j'ai tenté de générer des modèles synthétiques d'une leucémie mégacaryoblastique présentant la fusion *NUP98::BPTF* (voir en annexe de ce chapitre). Cependant, ces expériences de modélisation ont majoritairement généré des myéloproliférations ainsi que des proliférations lymphocytaires T. La retransplantation de ces cellules myéloïdes en souris secondaires n'a pas permis de régénérer la maladie (absence d'auto-renouvellement dans ces conditions).

Il est possible que la fusions *NUP98::BPTF* nécessite la présence d'une mutation coopératrice, tel que la mutation JAK2-V617F retrouvée chez le model pdxNTF (voir en annexe de ce chapitre), afin de générer une leucémie. Il est aussi possible que la cellule CD34+ de sang de cordon ne soit pas permissive à la transformation leucémique par la fusion *NUP98::BPTF*.

Cet article n'est présenté dans aucune autre thèse.

3.2 Human models of NUP98-KDM5A megakaryocytic leukemia in mice contribute to uncover new biomarkers and therapeutic vulnerabilities

Sophie Cardin^{1*}, Mélanie Bilodeau^{1*}, **Mathieu Roussy**¹⁻³, Léo Aubert^{4,5}, Thomas Milan⁶, Loubna Jouan⁷, Alexandre Rouette⁷, Louise Laramée¹, Patrick Gendron^{5,8}, Jean Duchaine⁵, Hélène Decaluwe^{1,3}, Jean-François Spinella^{1,3}, Stéphanie Mourad¹, Françoise Couture¹, Daniel Sinnett^{1,3}, Élie Haddad^{1,3,9}, Josette-Renée Landry^{1,3,10}, Jing Ma¹¹, R. Keith Humphries¹², Philippe P. Roux^{4,5,13}, Josée Hébert^{3,5,14,15}, Tanja A. Gruber¹⁶, Brian T. Wilhelm^{3,6}, and Sonia Cellot^{1,3,15}

1. Pediatric Hematology-Oncology Division, Charles-Bruneau Cancer Center, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Sainte-Justine Research Center, Montréal, QC, Canada;

2. Department of Biomedical Sciences,

3. Faculty of Medicine, 4Cell Signaling and Proteomics Research Unit, and 5Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada;

6. Laboratory for High-Throughput Biology, Institute for Research in Immunology and Cancer, Montréal, QC, Canada;

7. Integrated Centre for Pediatric Clinical Genomics, CHU Sainte-Justine Research Center, Montréal, QC, Canada;

8. Bioinformatics Platform, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada;

9. Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, CHU Sainte-Justine, Montréal, QC, Canada;

10. Streamline Genomics, Montréal, QC, Canada;

11. Department of Pathology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN;

12. British Columbia Cancer Agency, Vancouver, BC, Canada;

13. Department of Pathology and Cell Biology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada;

14. Division of Hematology, and 15 Québec Leukemia Cell Bank, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montréal, QC, Canada;

15. Québec Leukemia Cell Bank, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montréal, QC, Canada;

16. Department of Oncology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN

*These authors contributed equally to this work

Reference: Cardin, S. *, M. Bilodeau*, M. Roussy, L. Aubert, T. Milan, L. Jouan, A. Rouette, L. Laramée, P. Gendron, J. Duchaine, H. Decaluwe, J. F. Spinella, S. Mourad, F. Couture, D. Sinnett, E. Haddad, J. R. Landry, J. Ma, R. K. Humphries, P. P. Roux, J. Hébert, T. A. Gruber, B. T. Wilhelm, and S. Cellot. 2019. 'Human models of NUP98-KDM5A megakaryocytic leukemia in mice contribute to uncovering new biomarkers and therapeutic vulnerabilities', *Blood Adv*, 3: 3307-21.

Status: Published

3.2.1 Abstract

Acute megakaryoblastic leukemia (AMKL) represents < 10% of pediatric acute myeloid leukemia cases and typically affects young children (> 3 years of age). It remains plagued with extremely poor treatment outcomes (> 40% cure rates), mostly due to primary chemotherapy refractory disease and/or early relapse. Recurrent and mutually exclusive chimeric fusion oncogenes have been detected in 60% to 70% of cases and include nucleoporin 98 (NUP98) gene rearrangements, most commonly NUP98-KDM5A. Human models of NUP98-KDM5A-driven AMKL capable of faithfully recapitulating the disease have been lacking, and patient samples are rare, further limiting biomarkers and drug discovery. To overcome these impediments, we overexpressed NUP98-KDM5A in human cord blood hematopoietic stem and progenitor cells using a lentiviral-based approach to create physiopathologically relevant disease models. The NUP98-KDM5A fusion oncogene was a potent inducer of maturation arrest, sustaining long-term proliferative and progenitor capacities of engineered cells in optimized culture conditions. Adoptive transfer of NUP98-KDM5A-transformed cells into immunodeficient mice led to multiple subtypes of leukemia, including AMKL, that phenocopy human disease phenotypically and molecularly. The integrative molecular characterization of synthetic and patient NUP98-KDM5A AMKL samples revealed SELP, MPIG6B, and NEO1 as distinctive and novel disease biomarkers. Transcriptomic and proteomic analyses pointed to upregulation of the JAK-STAT signaling pathway in the model AMKL. Both synthetic models and patient-derived xenografts of NUP98-rearranged AMKL showed *in vitro* therapeutic vulnerability to ruxolitinib, a clinically approved JAK2 inhibitor. Overall, synthetic human AMKL models contribute to defining functional dependencies of rare genotypes of high-fatality pediatric leukemia, which lack effective and rationally designed treatments.

3.2.2 Introduction

Acute megakaryoblastic leukemia (AMKL) is a cytological subgroup of acute myeloid leukemia (AML) that harbors megakaryocytic lineage markers (e.g. CD41, CD42, CD61). AMKL occurrence is almost entirely restricted to children (usually < 3 years of age), occurring in only 1% of adult AML³⁶³ cases, often following progression from myelodysplastic syndromes. AMKL represents ~10% of pediatric AML cases and has been long recognized for its poor prognosis¹⁴³. Clinically, AMKL diagnosis remains challenging due to marked myelofibrosis and resulting hypocellular bone marrow (BM) aspirates, lack of disease specific cell surface markers and until recently, limited molecular markers. Interestingly, children with Down syndrome (DS, trisomy 21) are at increased risk of developing AMKL^{364,365}, but they fare better survive than non-DS patients¹⁴⁷, suggesting two distinct types of disease.

Oncogenic gene fusions are recurrent, and mutually exclusive, mutations in more than 70% of non-DS pediatric AMKL¹⁴⁸. These include *CBFA2T3-GLIS2* (~18%), *MLL* rearrangements (*MLLr*, ~17%), *HOX* rearrangements (*HOXr*, ~15%), *NUP98-KDM5A* (*N5A*, ~11%), and *RBM15-MKL1* (~10%)¹⁴⁸. Patients presenting with AMKL assigned to *CBFA2T3-GLIS2*, *MLLr*, or *N5A* molecular subsets typically experience poor outcomes^{148,149}.

Oncoproteins encoded by *NUP98* fusion transcripts comprise the N-terminal glycine-leucine-phenylalanine-glycine repeat motifs of NUP98 and the C-terminal domains of the fusion partner (~31 NUP98 fusion partners reported)^{115,328}. *N5A* fusions typically comprise the C-terminal PHD domain of KDM5A (H3K4 methylation recognition) fused to NUP98, but not the Jumonji catalytic domain of the demethylase. Although *N5A* is most frequently identified in AMKL (FAB M7 AML), it is occasionally associated with other FAB subtypes of childhood AML (all of them except FAB M3 excluded from the analysis)^{209,328}, and now emerging as a recurrent fusion in pediatric acute erythroid leukemia (AEL/FAB M6 AML)^{366,367}. In general, *NUP98* oncogenic rearrangements (*NUP98r*) are associated with a variety of *de novo* and therapy-related acute myeloid and T-cell lymphoblastic leukemia subtypes, in addition to other hematopoietic malignancies^{115,328}. Evidence suggests that NUP98 fusions sustain the activation of key cell fate regulator genes, such

as *HOXA* (similar to *MLLr*) and *HOXB* cluster genes^{154,159}, in part by aberrantly recruiting epigenetic modifier complexes^{216,368}.

N5A is sufficient to transform mouse cells, giving rise to CD34⁺CD117⁺ AML *in vivo*, characterized by transcriptional up-regulation of *Hoxa5,7,9,10*, *Gata3*, *Meis1*, *Eya1* and *Pbx1*, with confirmed epigenetic activation of the *Hoxa* gene cluster¹⁵⁹. However, the CD34⁻CD41⁺CD61⁺ leukemic blasts typically seen in pediatric AMKL are not found in this animal model¹⁵⁹. This may be explained by physiological differences between mouse and human systems^{369,370}, differences in the developmental transcriptional programs of the initiating cells (fetal versus adult HSCs)⁵⁹, and/or the diversity of cells susceptible to N5A-driven transformation. The paucity of N5A pediatric leukemia samples greatly limits molecular and functional studies of AMKL. In addition, human models of *de novo* N5A AMKL are currently lacking, hampering biomarker and potential drug target discovery.

Here we present a validated protocol to generate renewable AMKL models in the physiological context of primitive human hematopoietic cells, driven by the overexpression of N5A in umbilical cord blood (CB) cells. In this model, the N5A fusion oncogene was a potent inducer of maturation arrest sustaining long-term proliferative and progenitor capacities of engineered cells in our optimised culture conditions. Adoptive transfer of N5A transformed cells led to *de novo* AMKL and other leukemia subtypes in xenograft models. N5A-driven human AMKL models faithfully mimicked the pediatric disease phenotypically and molecularly. The integrated transcriptomic and proteomic characterisation of human models and primary samples of NUP98 rearranged (NUP98r) AMKL revealed SELP, MPIG6B and NEO1 as distinctive disease biomarkers and pointed to JAK-STAT signaling pathway upregulation. Using an *in vitro* pharmacological approach, we show that primary xenografts of NUP98r AMKL are sensitive to JAK-STAT pathway inhibition with ruxolitinib and tofacitinib, as opposed to normal CD34⁺ cord blood cells or a *MLL* rearranged (*MLLr*) cell line. Overall, the synthetic human models of NUP98r leukemias reported here will pave the way to define subtype-specific functional dependencies of rare diseases plagued by dismal cure rates.

3.2.3 Methods

3.2.3.1 Patient samples

All pediatric AMKL samples and associated clinical information described in Table S1 (n=6 patients) were collected after informed consent and project approval from the Research Ethics Boards of CHU Sainte-Justine, in agreement with the Declaration of Helsinki. Biobanking was conducted by the Quebec Leukemia Cell Bank (BCLQ, Montreal, Canada).

3.2.3.2 Lentiviral vectors

FLAG-tagged *NUP98-KDM5A* coding sequence (kindly provided by Dr. David Allis, Rockefeller University, New York, USA)¹⁵⁹ was subcloned using standard procedures into a MNDU lentiviral expression vector containing a GFP reporter gene (a gift from Dr Keith Humphries, BC Cancer Agency, Vancouver, Canada and Dr Donald B. Kohn, UCLA, Los Angeles, CA, USA)^{371,372}, as indicated in Fig. 1A. VSV-G pseudotyped lentiviral vectors were produced and titered with HEK293T cells, using standard protocols.

3.2.3.3 Human CD34⁺ hematopoietic stem/progenitor cell isolation, culture and lentiviral transduction

Umbilical cord blood (CB) units were collected with the consent of the mothers and distributed by Héma-Québec's Public Cord Blood Bank (Montreal, Quebec, Canada). The protocol was approved by the Research Ethics Board of CHU Sainte-Justine (approval no. 3453). CD34⁺ human hematopoietic stem/progenitor cells (e.g. CB-CD34⁺ cells) were isolated from fresh CB (≤ 30 hours) using the EasySep™ Human CD34 Positive Selection Kit (StemCell Technologies, Vancouver, Canada). Preparations with $\geq 90\%$ CB-CD34⁺ cells were used, as determined by flow cytometry. CB-CD34⁺ cells were maintained in optimised culture conditions^{13,16} at 37°C with 5% CO₂ in humidified air. Lentiviral transduction and clonogenic progenitor cell assay are described in the Supplemental Methods.

3.2.3.4 Xenotransplantation

NOD-*scid* IL2Rg^{null} (NSG) and NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl} Tg(CMV-IL3,CSF2,KITLG)1Eav/MloySzJ (NSG-SGM3) mice from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) were bred in pathogen-free conditions at the animal care facility of CHU Sainte-Justine. Mice were kept in ventilated

microinsulator cages and provided with sterilized food and acidified water. Mouse husbandry, xenotransplantation and follow-up procedures were approved by the CHU Sainte-Justine Institutional Animal Ethic Committee (Tables S2-S3 and Supplemental Methods).

3.2.3.5 Flow cytometry

Cell surface marker staining was performed with antibodies listed in Table S4, as described in the Supplemental Methods. Details related to automated cell counting and cytometers are summarized in the Supplemental Methods. Data were analysed with FACSDiva (BD Biosciences) and FlowJo (FlowJO LLC, BD Biosciences, USA) softwares.

3.2.3.6 Histopathology and microscopy

Peripheral blood smears, cytopsin preparations of bone marrow and spleen cells, and organ touch preparations were stained with Giemsa according to standard protocols. Sagittal sections of tibial bone marrow were stained with hematoxylin-phloxine-saffron according to standard procedures. Detailed procedures are described in the Supplemental Methods.

3.2.3.7 Molecular studies

3.2.3.8 RNA isolation

Total RNA was extracted from patient bone marrow stored in RNAlater with QIAamp® RNA Blood Mini or RNeasy Micro kit (Qiagen, Germantown, MD, USA). Total RNA from CB-CD34⁺ cells, *NUP98-KDM5A* cell lines, and xenografts was extracted with TRIzol and Direct-zol RNA MiniPrep (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA and Zymo Research, Irvine, CA, USA).

3.2.3.9 RNA sequencing and bioinformatics analysis

Samples used for RNA sequencing are listed in Table S5. Sequencing was performed using an Illumina HiSeq2000 or Nextseq500 with 200bp and 150bp cycles paired-end runs, respectively. Sequences were aligned to the reference human genome version GRCh38 (Gencode version 26) using STAR version 2.5.1b³⁷³. Gene expression was estimated directly from STAR as readcount values as well as computed using RSEM version 1.2.28³⁷⁴. RNA sequencing was performed at the Institute for Research in Immunology and Cancer's Genomics Platform (IRIC, Montreal, Canada). Additional details about library preparation, RNA sequencing, variant calling, GO-term

enrichment, principal component (PCA) and differential expression analyses are presented in the Supplemental Methods and Table S6.

3.2.3.10 RT-PCR

Detection of *N5A*, *NEO1* and *KDM5B* transcripts was performed by RT-PCR using primers and conditions listed in Table S7 and Supplemental Methods.

3.2.3.11 Statistical analysis

Statistical analyses were done with GraphPad Prism v7.03. Bars and error bars represent means and standard error of the mean (SEM), unless indicated otherwise.

Chromatin immunoprecipitation sequencing, cell surface proteomics, and pharmacological inhibition analyses are described in the supplemental Methods.

3.2.4 Results

3.2.4.1 NUP98-KDM5A is a potent inducer of proliferation and maturation block *ex vivo*

An experimental protocol was established to overexpress NUP98-KDM5A (N5A) in cord blood (CB) stem/progenitor cells (HSPC), a physiologically relevant context in terms of cell of origin and ontogeny with respect to pediatric AMKL (Fig.1A, Supplemental Methods). Following initial gene transfer (GT) assessment, based on GFP fluorescence determined by flow cytometry, independent cultures were evaluated for total cell counts, cytology, immunophenotype and progenitor cell frequencies at regular intervals. There was a progressive enrichment of CD34⁺GFP⁺ N5A-cells over time, completely overriding the culture by day 80, even when initial GT rates were below 10% (> 80% GFP⁺ cells by day 80) (Fig. 1B, C). Control cells were terminally differentiated into C-KIT^{hi} CD34⁻ mastocytes and largely exhausted by day 40-60 of culture (Fig.1B, D-F). The N5A-transduced cells displayed maturation arrest on cytological examination (Fig1.E) and were CD34⁺ and C-KIT^{low} (Fig.1F). This was observed in 57-79% of wells at day 42 of culture in all experiments (Fig.1G), pointing to a strong impact on cell fate from overexpression of the N5A fusion in HSPC. While clonogenic progenitors were not detected at day 28 of culture in the control condition (frequency below 1 in 200 seeded cells), these were maintained *in vitro* at high frequency for the N5A-transduced cells for at least 3 months (Suppl. Fig. S1 and Fig.1H-I). Overall,

these results suggest that the N5A fusion oncogene is a potent inducer of maturation arrest sustaining long-term proliferative and progenitor capacities *in vitro*.

3.2.4.1 Generation of NUP98-KDM5A acute megakaryoblastic leukemia (AMKL) xenografts

A fraction of the fusion oncogene carrying cells (N5A-cells) was used to induce *de novo* leukemias in mouse xenograft models (70% of each independent transduction, Fig.2A). Leukemia development show a latency of 27-71 weeks at a frequency of 2/9 to 2/3 animals (n=6 experiments, 3 to 28 mice/experiments) (Suppl. Tables S2-S3). Mice presented clinically overt signs of disease (tachypnea, hunchback, weight loss, fatigue, pallor). Grafts engineered to overexpress N5A gave rise to multiple leukemia subtypes in recipient mice, including AMKL, AML-O (other acute myeloid leukemia subtypes/non-AMKL myeloid leukemia), B- and T- cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL and T-ALL; Fig.2B and Suppl. Table S2-S3). Expression of the N5A fusion transcript was confirmed in leukemic cells by RT-PCR (Fig.2C).

AMKL xenograft recipients were generated in 5 independent experiments (n=6 cases; Suppl. Table S2). Mice with AMKL had white bones and mild splenomegaly at necropsy (Fig. 2D and Suppl. Table S3). Infiltration by leukemic blasts was observed on blood smear and bone marrow histocytological preparations and consisted of CD45^{lo}CD34⁻CD41⁺CD61⁺ cells with characteristic megakaryoblast features, including cytoplasmic blebs (Fig.2.E, G, H and Suppl. Fig. S2.A-B), faithfully phenocopying human AMKL. The extent of BM and spleen infiltration by GFP⁺ CD41⁺ CD61⁺ megakaryocytic leukemic blasts ranged between 11-55% and 0.1-4%, respectively (Fig.2F and Suppl. Fig.S2B, D and Table S3). A population of CD45^{hi}CD3⁺ cells was observed in the blood, BM and spleen of 3/6 AMKL bearing mice (Fig.2H and Suppl. Fig. S2B-F), and in the absence of clinical graft-versus-host-disease (GVHD). The CD3⁺ cells co-expressed HLA-DR and either CD4 or CD8, and on cytology appeared as activated lymphocytes (Suppl. Fig.S2C-D, n=1 analysed xenograft). Tumor-reactive T-lymphoid cell populations have been detected in association with human AML transplanted in NSG mice³⁷⁵. We detected a T-cell population in 3/6 AMKL xenograft models, with or without expression of GFP (marker expressed from the vector bearing the fusion oncogene, see Fig.2H and Fig. S2.B). Transcriptomic and GO-terms enrichment analyses of two

independent CD3⁺ cell populations isolated along AMKL xenografts support a signature of activated T-cells (Suppl. Fig.S2G and Table S5).

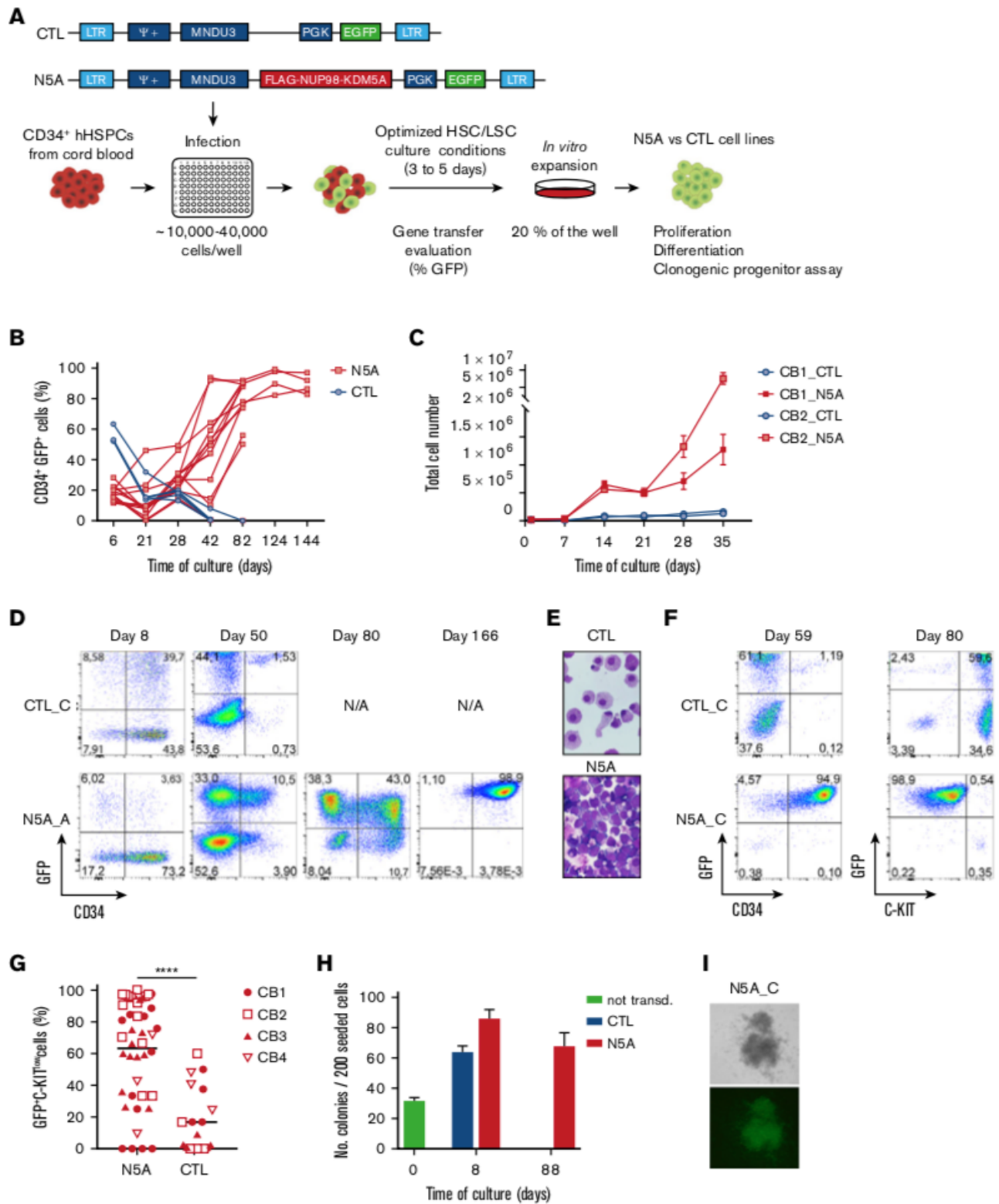


Figure 3-1 Overexpression of NUP98-KDM5A efficiently induces maturation block and sustains the proliferative and progenitor capacities of CB-CD34+ cells.

(A) Experimental procedures used to establish *in vitro* models of N5A-driven leukemia. CD34⁺ cells isolated from single-donor CB were seeded in 96-well plates and infected with lentiviral particles carrying the chimeric NUP98-KDM5A oncogene. The lentiviral vector encodes FLAG-tagged NUP98-KDM5A and a GFP reporter gene, driven by MNDU3 and PGK promoters, respectively. Independent cell lines derived from each well were grown for 3 to 5 days in optimized culture conditions before GT evaluation and further *in vitro* expansion (20% of the cells from each well). **(B)** CD34⁺GFP⁺ enrichment in long-term cultures of CB-CD34⁺ cells transduced with a control (CTL, n = 4) or NUP98-KDM5A (N5A, n = 12) vector. **(C)** Short-term proliferation kinetic of transduced cells in independent cultures of CB-CD34⁺ cells transduced with N5A or control lentiviral vector. Cultures were initiated from 2 independent CBs (eg, CB1 and CB2) transduced with control (n = 6 per CB) or N5A (n = 14 per CB) lentiviral vector, as indicated. **(D)** Fluorescence-activated cell sorting profiles showing the time course of GFP and CD34 expression in 2 independent samples transduced with control (eg, CTL_C) or N5A lentiviral vector (eg, N5A_A). Transduced CB-CD34⁺ cells were derived from a single donor. **(E)** Giemsa-stained cytopspins showing immature cellular morphology of an N5A-expressing cell line (N5A_C, bottom) at day 80 and differentiation of matched-CTL cells at day 59. Original magnification 31000. **(F)** Acquisition by flow cytometry showing differentiation of control cells (GFP⁺CD34⁺ C-KIT^{hi}) and a maturation arrest of N5A-transduced cells (GFP⁺CD34⁺ C-KIT^{low}). **(G)** Graph showing the percentage of GFP⁺KIT^{low} immature cells in each indicated culture, defined as median fluorescence intensity <1.5 X 10⁴ for KIT^{low} cells; n = 3 independent experiments, n = 4 CB units, n = 43 cultures of N5A cells, and n = 19 cultures of CTL-cells. **(H)** Clonogenic progenitor frequency for freshly isolated (day 0, n = 2) and CTL or N5A- transduced CB-CD34⁺ cells, plated at days 8 and 88 of culture (n = 2 for CTL; n = 4 for N5A; mean 6 standard error of the mean [SEM]). Phenotypic classification of clonogenic progenitors is presented in supplemental Figure 1. **(I)** Representative image of a typical long-term colony generated from the N5A_C cell line at day 60 of culture. Top: bright field microscopy; bottom: epifluorescence microscopy. Original magnification X 10. **** P < .0001.

To assess the self-renewal capacity of leukemic cells derived from one representative AMKL xenograft, freshly collected BM cells were transplanted into 2 secondary recipient mice. Both secondary mouse recipients developed AML with shorter latency than the disease in the primary host (33.3 and 32.9 vs 48 weeks). Compared to the primary host, secondary recipients presented similar clinical signs apart from severe splenomegaly. Only the leukemic cells from the myeloid compartment were detected in both secondary recipients, either leading to AMKL (CD41⁺CD71⁺) (Fig.2I-J) or AML-O (CD41⁻CD71⁺, not shown). These results suggest the presence of self-renewing primary megakaryoblast cells that can be serially transplanted in addition to other leukemic clones, and/or primitive leukemia initiating cells poised toward alternative lineage decisions.

3.2.4.1 Overexpression of N5A in CB-CD34⁺ cells generates multiple subtypes of leukemia

In addition to AMKL, overexpression of N5A in CB-CD34⁺ cells led to the development of other AML (AML-O; CD34⁻CD41⁻CD33[±]-CD36⁺), with histological features of myeloid blasts (Suppl.Fig.S3B-C and Suppl. Table S3). Furthermore, in 8/25 synthetic primary leukemia

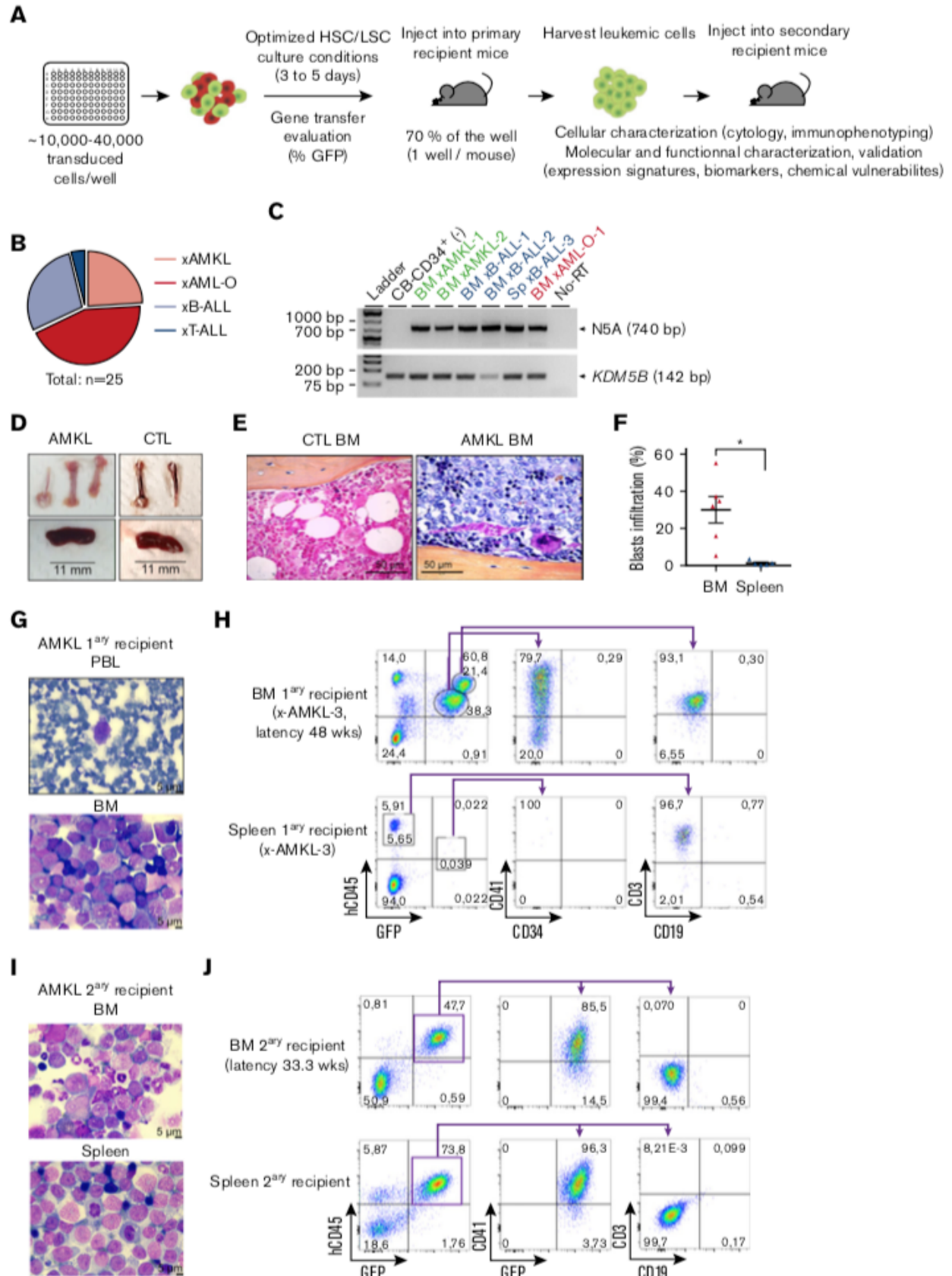


Figure 3-2 : Overexpression of N5A fusion in CB-CD34⁺ cells induces acute megakaryoblastic leukemia and multilineage leukemia subtypes in xenograft models.

(A) Representation of the experimental procedures used to establish *in vivo* models of N5A-driven leukemia. Human CD34⁺ cells were isolated from CB and transduced as described in Figure 1A. After GT evaluation, 70% of the cells from each well were injected into a primary recipient mouse. Leukemia xenograft cells were collected and characterized phenotypically, molecularly, and functionally. (B) Distribution of generated xenograft models classified by leukemia subtypes based on molecular markers and cytology analyses (supplemental Table 3). Models originated from 6 experimental groups initiated from 7 independent CB samples (supplemental Table 2). (C) Detection of N5A fusion transcript expression by RT-PCR with RNA isolated from BM or spleen (Sp) cells of leukemic mice, as indicated. Normal nontransduced CB-CD34⁺ sample was used as negative control (CTL). (D-J) AMKL xenograft models. (D) Brittle white bones and mild splenomegaly were observed in AMKL xenograft models (xAMKL-3, N5A vector) compared with control xenograft-recipient mice (CTL, empty vector). (E) Representative hematoxylin-phloxine-saffron–stained longitudinal sections of tibia BM harvested from xCTL and xAMKL-3 recipient mice. (F) Blasts infiltration percentage (hCD45^{low}CD41⁺/CD61⁺ cells) in BM and spleen of primary AMKL (n = 6). (G) Giemsa-stained peripheral blood (PBL) smear and BM cytopsin from an AMKL primary (1ary) recipient mouse (xAMKL-3) highlighting the presence of leukemic blasts (48 weeks after transplantation). (H) Fluorescence-activated cell sorting (FACS) profiles revealing typical hCD45^{low}CD34⁺CD41⁺ megakaryoblasts in the BM of a primary recipient mouse (xAMKL-3), along with CD45^{hi}CD3⁺-activated T cells. The spleen is infiltrated by CD45^{hi}CD3⁺ activated T cells with hCD45^{low}CD34⁺CD41⁺ barely detectable. Characterization of an additional mouse xenograft model (xAMKL-1) with detailed T-cell immunophenotype is shown in supplemental Figure 2. (I) Giemsa-stained BM cytopsin and spleen touch preparations showing leukemic blasts derived from a secondary (2ary) recipient mouse with a 2.2 X 10⁶ xAMKL-3 BM–cell transplant (33 weeks after transplantation). (J) FACS profiles revealing hCD45^{low}CD34⁺CD41⁺GFP⁺ megakaryoblasts in the BM and spleen of the secondary recipient mouse. *P < .05. HSC, hemopoietic stem cell; LSC, leukemic stem cell.

generated, the blasts harbored molecular markers and cytological characteristics of either B-ALL (n=7; CD34⁺CD38[±]/CD19⁺CD10⁺) or T-ALL (n=1; CD3⁺CD4⁺CD8[±]CD7[±]/HLA-DR⁺) (Fig. S3 D-G and Suppl. Table S3). Splenomegaly and splenic infiltration by leukemic blasts in primary recipients were generally more profound for B- and T-ALL, and AML-O, compared to AMKL (Fig.2F, Suppl. Fig. S3A and Suppl. Table S3).

Individual leukemia presented subtype-specific expression signature and clustered according to immunophenotypic subgroups (Fig.3A-B). Principal component analysis (PCA) of transcriptomic datasets from N5A synthetic models, local pediatric AMKL cohort, and the TARGET AML cohort reveal that N5A AMKL or AML-O xenografts cluster with patient AMKL and acute monocytic leukemia (e.g FAB M5), respectively (Fig.3B and Supp. FigS4A). The multilineage leukemogenic potential of N5A probably reflects distinct cells of origin for each disease entity, or can be attributed to other parameters, such as fusion expression levels or cooperating mutations. Nonetheless, the generation of specific leukemia subtypes was highly constant and reproducible (Fig.3A and Fig.S4B, Suppl. Tables S2-S3). Overall, the heterogeneity observed in the engineered N5A leukemia subtypes mirrors that of human disease driven by NUP98 fusions.

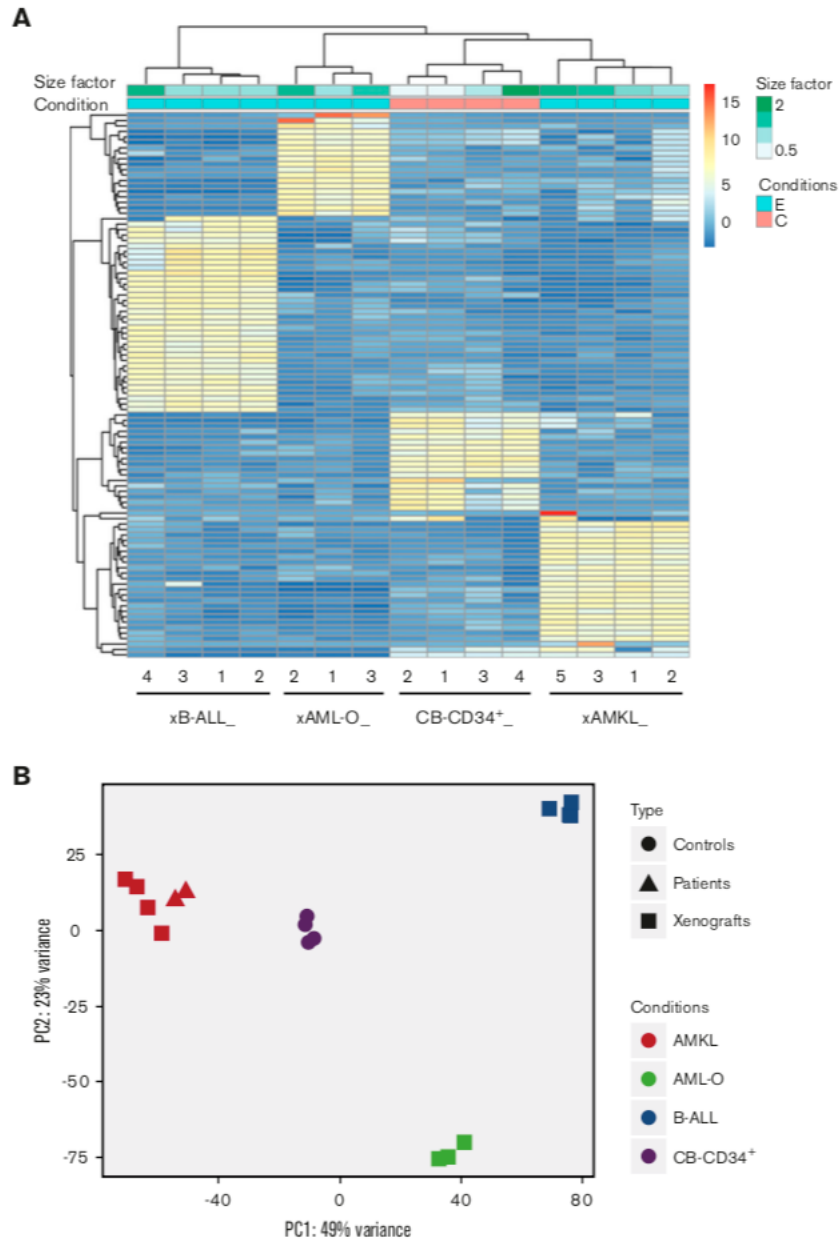


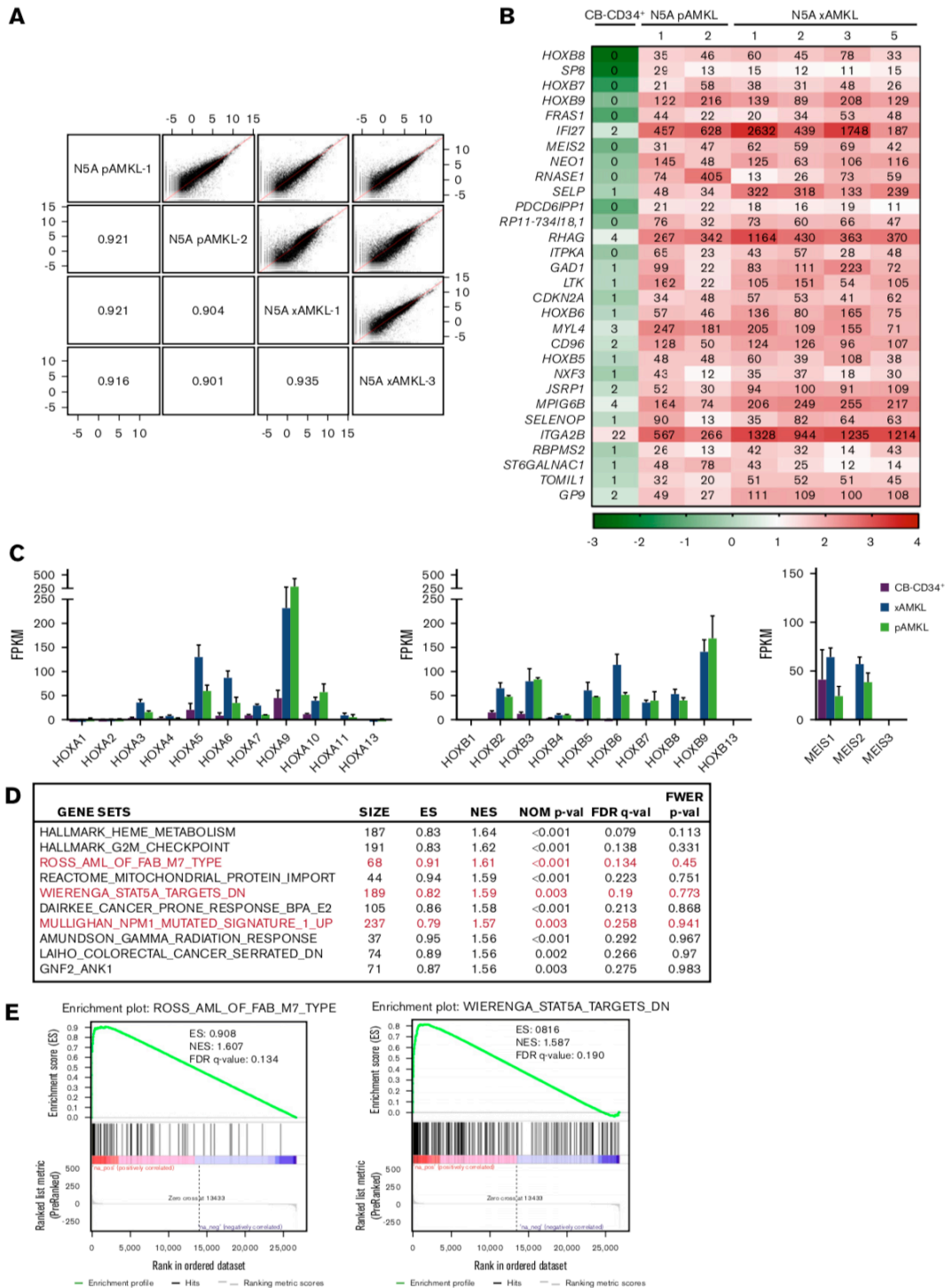
Figure 3-3 : Distinct expression profiles of NUP98-KDM5A leukemia subtypes compared with normal CB CD341 cells.

(A) Hierarchical clustering heat map of the top 100 genes differentially expressed between the 3 leukemia subtypes observed in N5A xenograft models (AMKL xenograft [xAMKL], n = 4; B-ALL xenograft [xB-ALL], n = 4; AML-O xenograft [xAML-O], n = 3) and normal CB CD34+ cells (CB-CD34+ cells, n = 4). Read count data were converted into log2 values and represented according to a blue-yellow-red-colored gradient scale. The size factor values, reflecting the correction factor for normalization of the relative depth of sample libraries, are represented by a gradient of green tones according to the size factor scale bar. Sample conditions are described by a binary (pink, C/control; blue, E/experimental leukemia) color code. (B) Principal component analysis plots of the first and second principal components of NUP98-KDM5A models, patients, and controls, calculated using the 500 most variable genes between all conditions.

3.2.4.2 Expression profiles of engineered AMKL xenografts correlate with human disease

Transcriptomic analyses of the generated N5A-AMKL xenografts closely matched those of N5A-patient AMKL samples overall, with correlation coefficients > 0.90 (Fig.4A and Suppl. Table S1, S3, and S5 for sample descriptions). A list of the most differentially expressed genes between N5A-AMKL patient samples and xenografts as compared to CB-CD34⁺ cells is presented in Fig.4B (≥ 10 -fold difference and ≥ 10 FPKM in AMKL, complete list presented in Suppl. Fig. S7). There is a marked upregulation of the 5'*HOXB* cluster genes and *MEIS2* in N5A-AMKL, with *HOXB7*, *8* and *9* ranking among the top ten most differentially expressed genes (Fig.4B). As reported for most *NUP98* and *MLL* rearranged AML^{115,137,376}, there is concomitant upregulation of the 5'*HOXA* cluster genes (in particular *HOXA9*) and expression of *MEIS1* in N5A-AMKL (Fig.4C). Epigenetic activation of *HOXB8* was further confirmed by CHIP-seq analyses (increased H3K4me3 active marks, decreased H3K27me3 repressive marks on promoters of N5A-transduced cell lines vs controls, see Suppl. Fig.S5). Gene Set Enrichment Analyses (GSEA) of transcriptomic datasets of N5A-AMKL identified several significant matches to signatures that correlate with pediatric AMKL samples³⁷⁶, STAT5A signalling²⁵⁸ and NPM1 mutated AML³⁷⁷ (*HOXA* and *B* cluster genes upregulation) (Fig.4.D-E). A list of consistently upregulated genes matching each signature is provided in Suppl. Fig.S6.

Recurrent cooperating mutations were not identified with RNA sequencing of the model leukemia, including variants in gene candidates associated with AMKL (*RB1*, *GATA1*, *MPL*, etc. see Suppl. Table S6 for the list of evaluated genes)^{148,318}. Specifically, *RB1* deletions that are associated with N5A AMKL¹⁴⁸ were not detected, however the number of samples remains too limited to draw definitive conclusions about their absence. In summary, using an optimised strategy, it is possible to generate synthetic human models of N5A-AMKL that closely match human disease in terms of expression profiles.



by a logarithmic color scale (log10). (C) Expression of HOXA/HOXB cluster and MEIS genes in N5A AMKL samples derived from patients (n = 2) and xenograft models (n = 4) compared with control CB-CD34⁺ cells (n = 4). Values are presented as the mean ± SEM. (D) Top 10 ranked gene sets in the GSEA of genes upregulated in N5A AMKL patients and xenograft models compared with CB-CD34⁺ samples. Enrichment plots for selected gene sets (in red) are depicted in panel E and in supplemental Figure 6.

3.2.4.3 Synthetic human N5A-AMKL models unravel disease specific biomarkers

To identify cell membrane markers that are specifically upregulated in N5A-AMKL, transcriptomic datasets of synthetic and patient N5A-AMKL samples were mined. Using a manually curated list of cell membrane associated proteins, a set of gene candidates encoding potential cell surface markers was generated. Among these candidates that were expressed on N5-AMKL (FPKM > 5 in all samples) at levels at least 10 fold more highly compared to CB-CD34⁺ cells (upper limit of CB-CD34⁺ expression of FPKM < 5) (leukemia specific expression) are listed in Fig.5A and (Suppl. Table S8). Most putative AMKL biomarkers are essentially not expressed in N5A B-ALL nor in AML-O xenografts (Suppl. Table S8). External validation using data from the largest cohort of rare pediatric AMKL (n=73 RNAseq datasets)¹⁴⁸ and the TARGET pediatric AML project¹³⁴ (RNA-seq from 284 pediatric AML cases sequenced at the BCCRC-GSC; Fig.5B) showed that expression of *MPIG6B* (Megakaryocyte and platelet inhibitory receptor G6b) and *NEO1* (neogenin-1) was highly specific to AMKL (FAB M7) cases irrespective of genetic subtype (p≤0.05 for all pairwise comparisons between FAB M7 and other FAB) (Fig.5A-B). SELP (p-selectin) is expressed only in a subset of AMKL genetic subgroups and notably, not expressed in CBFA2T3-GLIS2 (INV16) AMKL characterized by high NCAM1 (CD56) expression¹⁶⁰ (Fig.5A). High expression of *RHAG* (Rh associated glycoprotein) was associated with M6 and M7 subtypes (Fig.5B). In sharp contrast, markers such as *CD96* or *LTK* were expressed in most AML cases, irrespective of cytological subgroups. High expression level of *RHAG* or *NEO1* or *GP9/CD42a* combined to *ITGA2B/CD41* was highly predictive of an AML subtype M7 (Fig.5C-D). Expression of SELP was confirmed at the protein level by flow cytometry on hCD45⁺CD41⁺GFP⁺ blasts derived from the bone marrow of an N5A AMKL primary xenograft recipient (Fig.5E). The expression of *NEO1* was validated by RT-PCR in 2 AMKL xenograft samples and in primary specimens of NUP98-BPTF AMKL³⁴⁷ (diagnosis and minimal residual disease/MRD monitoring), given the absence of commercially available antibodies robustly validated for flow cytometry (Fig.5F-G). Using proteomic analysis, we validated the expression of 411 proteins at the surface of NUP98-BPTF AMKL patient-derived-

xenograft (PDX) cells, including NEO1, MPIG6B, and SELP (Fig.6A and Table S9 in red). Overall, our human models of N5A driven leukemia revealed SELP, MPIG6B and NEO1 as specific biomarkers defining AMKL.

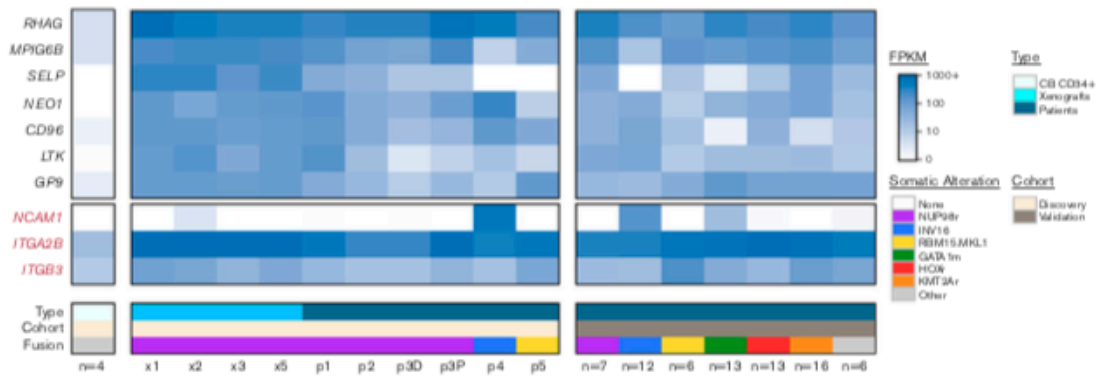
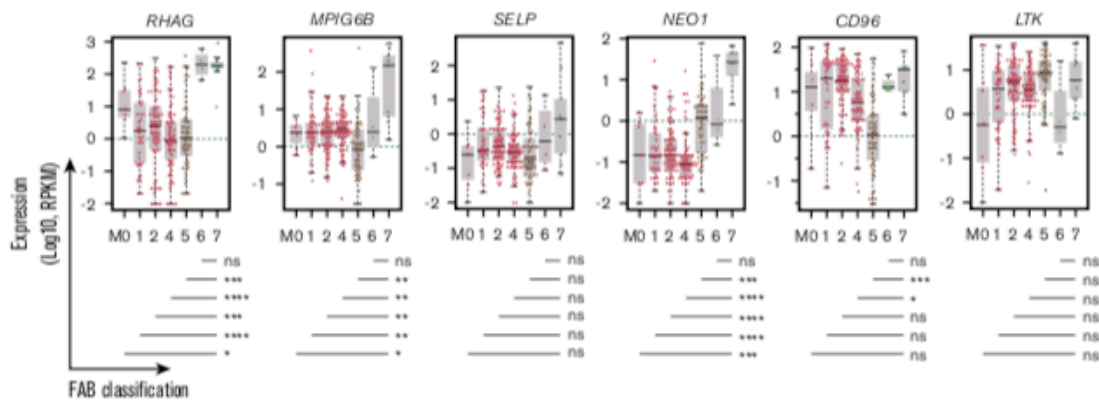
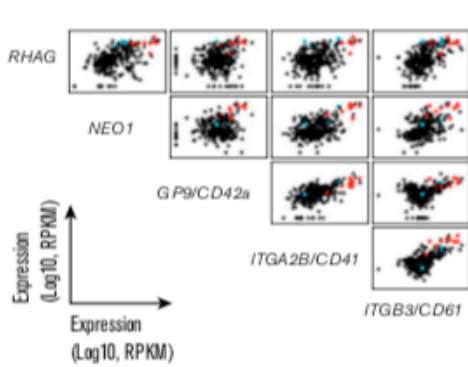
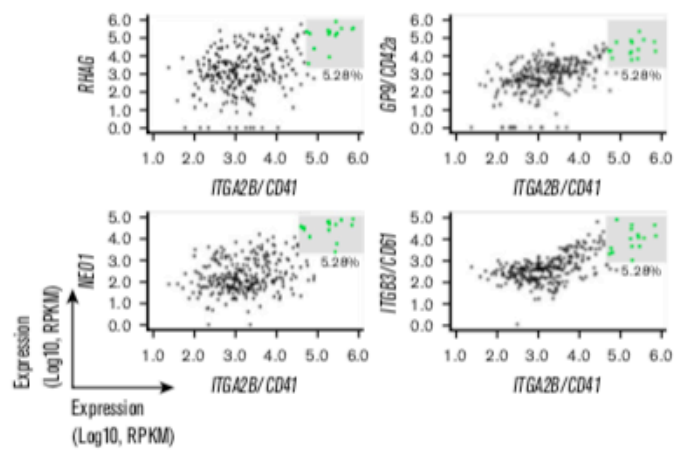
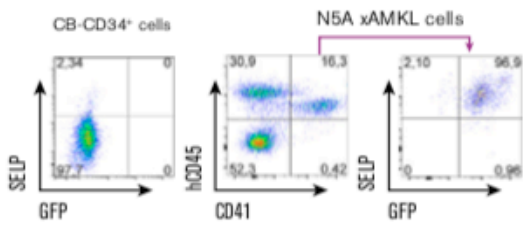
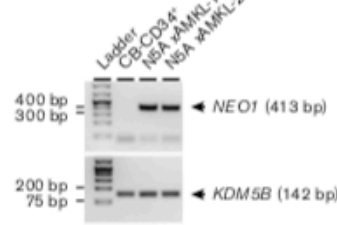
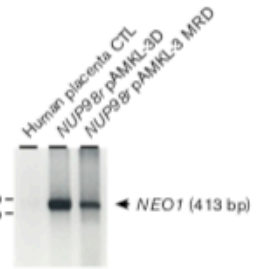
3.2.4.1 NUP98r xenograft models are vulnerable to *in vitro* pharmacologic inhibition

JAK-STAT pathway activation, initially suggested by GSEA analyses of model and NUP98 rearranged patient sample expression profiles (Fig.4D-E), is further supported by hallmark signatures of cell membrane proteomic studies using a patient-derived xenograft model (Fig.6A-B). These results corroborated recent studies in the field of pediatric AMKL suggesting the importance of the JAK-STAT signaling pathway^{162,166}.

(Figure on the next page)

Figure 3-5 : Specific biomarkers of AMKL.

(A) Heat map of expression values in FPKM (RNAseq) of 7 top-ranked genes encoding cell surface proteins that are differentially expressed by a least 10-fold in leukemic BM cells derived from patients (pAMKL) or mouse xenograft models (xAMKL) in the middle panel, as compared with normal CB- CD34⁺ cells in the left panel, and expressed at low levels (≤ 5 FPKM) in CB-CD34⁺ cells. Genes with expression values of ≥ 5 FPKM in all N5A AMKL samples, fold change ≥ 10 compared with CB-CD34⁺ samples, and low expression levels (≤ 5 FPKM) in CB-CD34⁺ cells are listed in supplemental Table 8. Expression of the selected genes in leukemic BM cells derived from patients presenting other genetic subtypes of AMKL (non-N5A pAMKL) or non-AMKL leukemia subtype involving NUP98 rearrangement (NUPr pAML) are also indicated. Expression of ITGA2B/CD41, ITGB3/CD61, and NCAM1 is indicated in red for comparison. Expression of the selected genes in the validation cohort¹⁴⁸ are shown in the right panel, represented as mean expression per indicated genetic group. **(B)** Distribution of selected gene expression values (FPKM) in BM-derived pediatric AML cells classified according to the FAB nomenclature (M0-M7); n = 284 pediatric AML cases from the National Cancer Institute (NCI) TARGET database. Horizontal lines represent median values. Pairwise gene expression comparisons between M7 and other FAB categories were performed with a Mann-Whitney rank sum test with the Benjamini-Hochberg correction (shown below graphs). M7 leukemia (n = 11) involved the following exclusive genetic lesions: NUP98-KDM5A (n = 1), CBFA2T3-GLIS2 (n = 4), KMT2A-MLLT10 (n = 1), and RBM15-MKL1 (n = 1). **(C)** Pairwise scatterplot representations showing correlative expression of the indicated genes in a pediatric AML (NCI, TARGET database). Representations were created with the bioinformatic tool MiSTIC³⁷⁸. AML classified as FAB M7 or M6 are indicated in red and blue, respectively. **(D)** Selection of specimens expressing the highest levels of RHAG, NEO1, GP9, or ITGB3/CD61 combined with ITGA2B/CD41 significantly enriches for FAB M7 AML (eg, AMKL). M7: 8 of 9 selected P = 6.1e-11. See data set and bioinformatic tool in panel C. **(E)** SELP expression, as assessed by flow cytometry in freshly isolated CB-CD34⁺ cells and in AMKL BM cells from an N5A mouse xenograft model. **(F)** Expression of NEO1 detected by RT-PCR using RNA derived from the BM of leukemic xenograft models or from CB-CD34⁺ cells. KDM5B expression was used as the endogenous control. **(G)** Expression of NEO1 detected by RT-PCR using RNA derived from the BM of an infant with NUP98-BPTF AMKL. RNA was isolated at diagnosis (NUP98r pAMKL-3D) and after 2 cycles of chemotherapy when disease burden was ~2% by cytology (NUP98r pAMKL-3 MRD). Human placental RNA was used as the nontumor control. ns/not significant P > 05; *P < .05; **P < .01; ***P < .001; ****P < .0001.

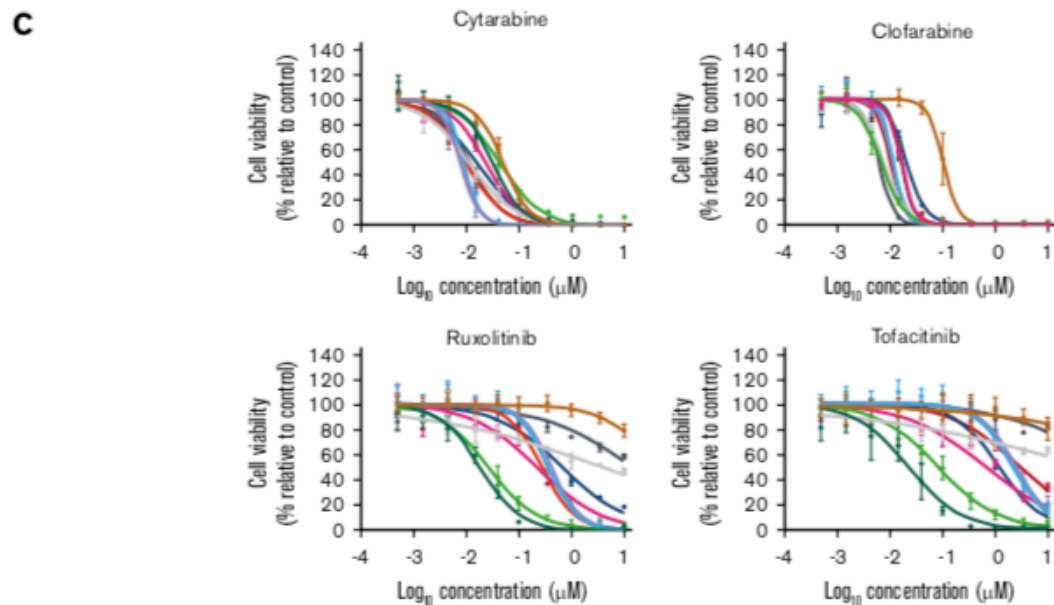
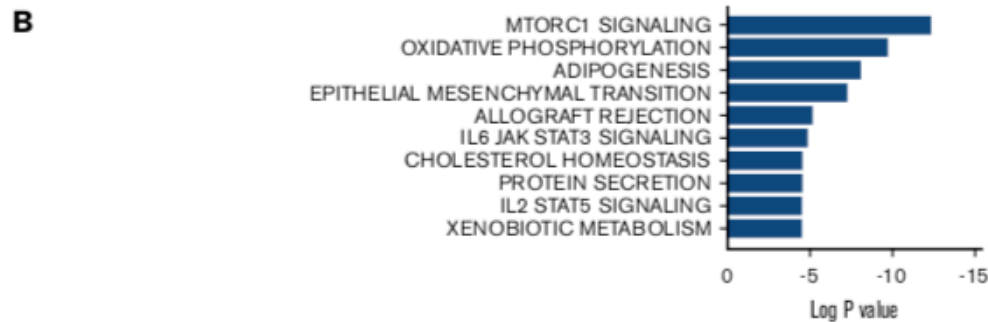
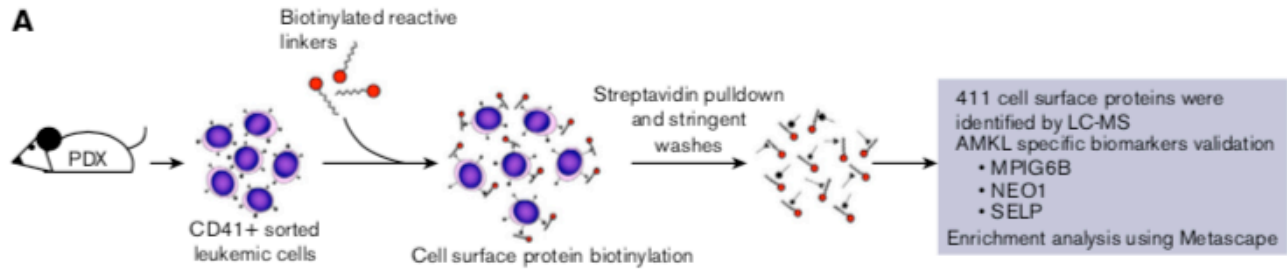
A**B****C****D****E****F****G**

As a proof of principle, we have thus tested *in vitro* sensitivity of AMKL cells to clinically approved JAK inhibitors (ruxolitinib, JAK2/1 inhibitor; and tofacitinib, JAK3/1 inhibitor) using our model NUP98-KDM5A AMKL along with a NUP98r AMKL PDX³⁴⁷, and gauged cross toxicity on normal cord blood cells. We chose JAK inhibitors ruxolitinib and tofacitinib as they are currently used in pediatrics in the context of cancer, graft-versus-host disease and rheumatoid arthritis. NUP98r AMKL show greater sensitivity to ruxolitinib (IC₅₀: 0.217-0.662 μM) and tofacitinib (IC₅₀: 0.663-3.008 μM) compared to normal cord blood cells and KMT2A rearranged cell line (IC₅₀ >10μM for both), showing that synthetic AMKL models can be exploited to test therapeutic vulnerabilities (Fig.6C). This selective therapeutic window was not observed with highly potent chemotherapeutic agents cytarabine and clofarabine inhibiting both normal and leukemic hematopoietic cell types *in vitro* (Fig.6C). Overall, our work highlights the JAK-STAT pathway along with other candidate mechanisms putatively sustaining NUP98r AMKL (Fig.4D and 6B) and provide the biological substrate to conduct further validation and discovery studies (Fig. 6C).

(Figure on the next page)

Figure 3-6 : Primary NUP98r xenograft cells are vulnerable to JAK-STAT signaling inhibitors.

(A) Schematic overview of the procedures used to perform the cell surface proteomic analysis of CD411 AMKL cells isolated from the spleen of NUP98r (NUP98-BPTF) PDX mice. Cell surface proteins were biotinylated and isolated using streptavidin pulldown and stringent washes. Analysis by liquid chromatography-mass spectrometry allowed for identification of 41+ cell surface proteins, including AMKL-specific biomarkers (supplemental Table 9). (B) Top 10 hallmark gene sets enriched in the analysis of the cell surface proteins detected on NUP98r AMKL primary xenograft using Metascape (see supplemental Methods for details). The complete analysis is provided in supplemental Table 10. (C) Dose-response curves and half maximal inhibitory concentrations (IC₅₀) determined for each indicated cell type submitted to a viability assay in presence of an inhibitor or DMSO vehicle (Cell-Titer Glo, 6-day incubation). Experiments were conducted with 4 replicates. CMK, N5A xAMKL (E771, G662), and CB-CD341 (no. 5/6 and 7); n = 1 experiment. M07e, ML-2, 2ary NTF AMKL PDX (I603, I604); n=5 2 experiments.



	Cell type	IC50 (μM)			
		Cytarabine	Clofarabine	Ruxolitinib	Tofacitinib
■	M07e C-GLIS2 AMKL cell line	0.043	0.007	0.027	0.081
■	CMK D-S AMKL cell line	0.031	0.017	0.018	0.023
■	1ary N5A xAMKL-4 (E771)	0.009	0.011	0.274	1.186
■	2ary N5A xAMKL-3 (G662)	0.023	0.016	0.217	0.663
■	2ary NTF AMKL PDX (I603)	0.007	0.011	0.425	2.601
■	2ary NTF AMKL PDX (I604)	0.009	0.011	0.359	2.175
■	2ary NTF AMKL PDX (I941)	0.016	0.020	0.662	3.008
■	CB-CD34 ⁺ -5/6	0.011	0.008	>10	>10
■	CB-CD34 ⁺ -7	0.012	0.006	>10	>10
■	ML-2 <i>KMT2A</i> r AML cell line	0.049	0.103	>10	>10

3.2.5 Discussion

Diagnosis and treatment development of rare subtypes of highly lethal pediatric AML have been hampered, at least in part, by restricted numbers of patient samples, hypocellularity of bone marrow specimens (due to fibrosis and dry taps in AMKL) and the lack of molecularly relevant cell lines or animal models reflecting the human disease. We propose a newly optimised pipeline to generate *de novo* NUP98-KDM5A cell lines and AMKL xenografts from diverse donor genetic backgrounds that phenocopy the human disease. This renewable resource opens the door to *in vitro* and *in vivo* studies to define AMKL-specific biomarkers and functional dependencies, something which has been unachievable with rare primary samples.

In vitro, overexpression of NUP98-KDM5A in CB-CD34⁺ cells induces maturation arrest and sustained proliferation with short latency and high frequency. *In vivo*, the engineered N5A xenografts give rise to multiple subtypes of leukemia, as seen in humans with hematological malignancies involving NUP98 fusions¹¹⁵, and as reported in NUP98-PHF23 mouse leukemia models yielding *de novo* AEL, T-ALL, B-ALL, and bi-clonal leukemia in transgenic mice with latencies of 5-18 months^{208,379}. Importantly, this system enabled the generation of synthetic human AMKL models that closely matched expression profiling of AMKL patient samples³⁷⁶, providing valuable models to study the disease. The engineered models also demonstrated a strong propensity for N5A to promote the development of non-AMKL AML. This corroborate the fact that N5A is associated with various AML FAB subtypes²⁰⁹. Thus for rare pediatric leukemia subtypes, synthetic human leukemia models can contribute to elucidate the full spectrum of disease associated with a given oncogene. To date, N5A or NUP98 fusions are not recurrently associated with B-ALL in humans¹¹⁵. Whether cytogenetically cryptic NUP98 fusions will be detected at low frequency in larger patient B-ALL cohorts remains a question to be addressed in future clinical studies. The N5A B-ALL generated can also reflect a potential bias in the model system, in particular the use of cord blood stem-progenitor cells which are equally poised towards myeloid or lymphoid lineage commitment^{380,381}.

Overall, expression profiling of the synthetic AMKL xenografts shows significant similarity to patterns reported for AMKL patients³⁷⁶, with minimal genetic noise. As reported for AML with MLL and NUP98 rearrangements³⁷⁶, the generated AMKL xenografts are *HOXA9* and *MEIS1*

expressing leukemia, but they also markedly upregulate *HOXB9* and *MEIS2*. A leukemogenic role for *MEIS2* in the context of MN1 and AML1-ETO AML is emerging^{382,383}. However the contribution of *MEIS2* in the development of AMKL remains to be determined. *HOXB9* was the gene most correlated with the expression signature of NPM1 mutated AML³⁷⁷ (Suppl. Fig. S5). GSEA analysis of transcriptomic data and cartography of proteins expressed at the cell surface of NUP98r leukemia point to activation of JAK-STAT signaling, as observed by other groups^{162,166}. As a proof of principle, we demonstrated selective vulnerability of NUP98r AMKL xenograft cells to clinically approved JAK inhibitors (ruxolitinib and tofacitinib), and lack of cross-toxicity on normal cord blood cells *in vitro*.

AMKL xenograft models contribute to identify and validate disease-specific biomarkers, such as *NEO1*, *MPIG6B* and *SELP*, which are minimally expressed in parental CB-CD34⁺ cells. *NEO1* gene expression is the most highly correlated with AMKL patient samples signature (Suppl. Fig. S6A). *NEO1* encodes a cell membrane receptor of the immunoglobulin superfamily involved in multiple cellular processes including axonal guidance³⁸⁴. It may potentially be a regulator of HSC function in mice³⁸⁵. *MPIG6B* encodes a platelet- and megakaryocyte-specific immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) receptor. *MPIG6B* loss-of-function mutations in humans and mice lead to thrombocytopenia, anemia and bone marrow myelofibrosis³⁸⁶⁻³⁸⁸. *NEO1* and *MPIG6B* are expressed across all AMKL genotypes comprised in the largest pediatric AMKL cohort¹⁴⁸ and are highly distinctive of a FAB M7 subtype (Fig.5A-B). *SELP*, expressed in a subset of AMKL genetic subtypes, encodes the receptor P-selectin translocated at the cell surface of stimulated platelets and endothelial cells, and also expressed on megakaryocytes and aged murine HSCs^{389,390}. Overall, the surface biomarkers upregulated in AMKL as compared to parental stem/progenitor cells can be clinically validated for MRD tracking as observed in this study for *NEO1* transcript expression in serial BM aspiration in a case of NUP98-BPTF AMKL³⁴⁷ (Fig.5G), which seemed to correlate with disease burden. At diagnosis, flow cytometry and/or RT-PCR based AMKL subtype-specific cell marker panels can accelerate and tailor treatment decisions for high risk leukemia in the challenging context of hypocellular BM specimen.

N5A synthetic leukemia models constitute valuable tools to identify novel and disease specific biomarkers, and will serve to dissect the role of potent oncogenes in leukemogenesis. As the

heterogeneous genomic landscape of high fatality leukemia is being unraveled, synthetic human models will be seminal to identify physiologically relevant and disease subtype specific biomarkers and functional dependencies to tailor therapies, such as the identification of RET in the context of MLL-AF9 AML³⁴⁸.

3.2.6 Acknowledgments

We sincerely thank patients and their families for their outstanding support, as well as members of the pediatric hematology-oncology team of CHU Sainte-Justine. We are grateful to all members of the BCLQ and the hematology-oncology division of CHU Sainte-Justine for their contribution to the biobanking initiative. We thank Virginie Saillour, Charles Privé and René Allard of the Integrated Centre for Pediatric Clinical Genomics at CHU Sainte-Justine, as well as Jennifer Huber at IRIC (Institute for Research in Immunology and Cancer, Montreal) for their assistance with RNA sequencing and data analysis. We thank Benoit Fiset, Julie Cardin (CHU Sainte-Justine) for their contribution to bioinformatics analyses. We acknowledge colleagues of the CHU Sainte-Justine flow cytometry (Ines Boufaied), and microscopy (Dr Elke Küster-Schöck) facilities and all the personnel of the humanized mouse core facility. We are grateful to Isabel Boivin (IRIC) and Jean-Francois Delisle (CHU Sainte-Justine) for their help with pharmacological inhibition experiments. We thank members of IRIC flow cytometry (Danièle Gagné and Gaël Dulude), histology (Julie Hinsinger) and microscopy (Christian Charbonneau) facilities. We thank Dr David Allis for generously providing the NUP98-KDM5A retroviral construct. We thank Dr Victor Kokta (CHU Sainte-Justine) for his help with interpretation of immunohistology slides. We acknowledge the seminal contribution of the Cole Foundation as S.Ce. and B.T.W. are recipients of the Cole Foundation Transition Awards. S.Ce. & B.T.W. also hold Terry Fox Research Institute (TFRI) New Investigator grants and a Canadian Cancer Society Research Institute (CCSRI)/Cole Foundation Impact grant. S.Ce. also received funding from the Leukemia & Lymphoma Society of Canada (LLSC, operating grant), from the CHU Sainte-Justine Foundation (Fonds d'innovation thérapeutique), from Charles Bruneau Foundation (operating grants) and from the Canada Foundation for Innovation (CFI, John R. Evans Leaders Fund). S.Ca. and M.R. are recipients of a Cole Foundation postdoctoral and doctoral fellowship, respectively. The Quebec Leukemia Cell Bank is supported by the Cancer Research Network of the Fonds de Recherche du Québec - Santé.

3.2.7 Authorship:

Contribution: S.Ca. and M.B. conceived and performed the experiments, analysed the data, generated the figures and wrote the manuscript; M.R., L.L., J.D. and F.C. performed the experiments and reviewed the manuscript; T.M. performed CHIP-Seq experiments, analysed the data, generated a figure and reviewed the manuscript; A.R., L.J., J.-R. L., P.G., J.-F. S., J. M., D.S. and B.T.W. performed bioinformatics analyses and reviewed the manuscript; L.A and P.P.R. performed the cell surface proteomic analysis and reviewed the manuscript; S.M. generated a table with clinical annotations and reviewed the manuscript. E.H. shared humanized mouse recipients and reviewed the manuscript; K. H. provided a lentiviral construct, guidance for designing experiments, and reviewed the manuscript; H.D. provided guidance for designing experiments, and reviewed the manuscript; J.H. supervised the biobanking of patient specimens at the BCLQ and reviewed the manuscript; T.A.G. shared essential pediatric AMKL RNAseq dataset; S.Ce. conceived the experiments, analyses the data, supervised the biobanking of patient specimens at the BCLQ and wrote the manuscript.

3.2.7.1 Conflict-of-interest disclosure

Conflict-of-interest disclosure: J.-R.L is a founder of and has an ownership stake in Streamline Genomics. The remaining authors declare no competing financial interests.

3.3 Annexe : Essais de modélisation d'une leucémie exprimant la fusion *NUP98::BPTF*

3.3.1 Introduction

Les fusions *CBFA2T3::GLIS2* et *NUP98::KDM5A* représentent respectivement environ 18% et 11% des cas de leucémies mégakaryoblastiques aiguës (AMKL)¹⁴⁸. Près de 4% des cas sont associés à un réarrangement du gène *NUP98* avec un partenaire inconnu¹³⁷. Nous avons démontré au chapitre 2 que *BPTF* fut retrouvé comme un partenaire de fusion de *NUP98* dans un cas d'AMKL du nourrisson³⁴⁷. Cette fusion présente deux variants d'épissage distincts abarrant 1 ou 2 domaines PHD (plant homeodomain) en C-terminale (*NUP98::BPTF-1* et *NUP98::BPTF-2*, maintenant : *NTF1* et *NTF2* respectivement). De plus, au chapitre 3, nous avons présenté un modèle d'AMKL humain généré par transduction lentivirale de la fusion *NUP98::KDM5A* chez des cellules CD34+ isolées de sang de cordon (CB-CD34+).

Afin de générer de nouveaux modèles d'AMKL, nous avons tenté de générer des leucémies mégakaryoblastiques exprimant la fusion *NUP98::BPTF* et *CBFA2T3::GLIS2* par la transduction lentivirale de ces fusions à des cellules CB-CD34+. Les résultats de la modélisation émanant des essais impliquant les deux variants de la fusion *NUP98::BPTF*, *NTF1* et *NTF2*, sont présentés dans cette annexe. Il est à noter que les essais de modélisation impliquant la fusion *NUP98::BPTF* ont été faits en parallèle de ceux impliquant la fusion *CBFA2T3::GLIS2* présentés au chapitre quatre.

3.3.2 Méthodes

Le protocole de modélisation utilisé pour les fusions *NTF1* et *NTF2* repose sur le protocole décrit au chapitre 3. Cependant, il y a quelques divergences entre le protocole ayant été utilisé lors des essais de modélisation présentés dans l'article et celui-ci.

3.3.2.1 Composition de la suspension cellulaire utilisée lors de la transduction lentivirale

Le premier changement concerne la suspension cellulaire CD34+ utilisée lors de la transduction. Les expériences de modélisation des leucémies N5A reposaient sur un seul donneur de sang de cordon pour chacune des expériences et démontraient de la variabilité au niveau de la fréquence et des sous-types de leucémies obtenues. Les essais présentés dans cette section impliquent

l'utilisation de cellules CD34+ isolées de plusieurs donneurs de sang de cordon différents et combinées en une seule suspension cellulaire. Plusieurs facteurs tels que les techniques de prélèvement et de préservation du sang de cordon, tout comme la cellularité ainsi que de facteurs génétiques que nous ne pouvons pas contrôler, peuvent potentiellement influencer notre capacité à transformer les cellules CD34+ en leucémie. L'utilisation d'une suspension cellulaire CD34+ provenant de plusieurs donneurs avait pour but de réduire la variabilité associée à l'utilisation d'unités de sang de cordon individuelles.

3.3.2.2 Diminution du temps de entre la transduction et la xénotransplantation des cellules CD34+ transduites

Le temps écoulé entre la transduction lentivirale des cellules CD34+ isolées de sang de cordon et la xénotransplantation a été réduite, passant de 8 jours à 18 heures. Ce changement avait pour but de préserver au maximum la capacité des cellules CD34+ transduites à reconstituer les souris receveuses.

3.3.2.3 Xénotransplantation chez la souris NSG et SGM3

En plus de tenter la modélisation chez la souris NSG, nous avons tenté la génération de modèles chez la souris SGM3. L'utilisation de la souris SGM3 avait pour but de favoriser une meilleure reconstitution en cellules myéloïdes suivant la transplantation de cellules CD34+ humaines ainsi qu'une meilleure prise de greffe lors de la xénotransplantation d'AML^{391,392}. De plus, puisque la souris NSG-SGM3 produit les cytokines SCF, GM-CSF et IL3 pouvant activer JAK2³⁹³⁻³⁹⁵ et que les leucémies mégacaryoblastiques NUP98r dépendent de la voie de signalisation JAK-STAT (sensibles à l'inhibition des protéines JAK par le ruxolitinib et le tofacitinib, voir figure 3-6 : C)¹⁶⁶, nous avons généré l'hypothèse que cet environnement serait permissif pour maintenir les leucémies AMKL initiées par NTF.

3.3.3 Résultats et discussion

3.3.3.1 Modélisation de leucémie arborant la fusion NTF

Premièrement, une grande proportion des souris utilisées lors de deux des trois expériences de modélisations ont développé une reconstitution normale de leur système hématopoïétique suivant la xénotransplantation (figure 3-7 : A). Pour ces souris, cette reconstitution normale est

décrite comme la présence de cellules des lignées lymphoïdes et myéloïdes normales au sein de la moelle osseuse lors de l'euthanasie. La plupart de ces souris normalement reconstituées ont été euthanasiées à la fin de l'expérience, soit 52 semaines après la transplantation. La présence de cellules humaines normales dans une grande proportion de souris, 52 semaines post-transplantation, démontre notre maîtrise des techniques d'isolation, de cryopréservation, de culture et de transplantation des cellules CSH humaines capables de reconstitution à long terme (>20 semaines) dans des hôtes irradiés.

Les leucémies lymphocytaires B et les myéloproliférations générées par la fusion N5A lors de ces essais sont comparables aux résultats présentés dans l'article. Cependant, malgré une forte prise de greffe, aucune des souris de la condition NTF ou N5A n'a généré de leucémies myéloïdes. Les cellules CD34+ transduites avec les variants d'épissage de la fusion *NUP98::BPTF* (NTF1/2) et transplantées chez la souris NSG ou SGM3 ont généré dans certains cas une myéloprolifération (n= 3/43).

Parmi les myéloproliférations générées, une seule souris NSG ayant reçu des cellules CD34+ transduite par la fusion NTF arborant un seul domaine PHD (maintenant : NSG-NTF1) a démontré une prolifération anormale de cellules GFP+ et CD41/CD61 doubles positives lors de l'euthanasie à 47 semaines suivant la transplantation (Figure annexe 3-7 : B). Cette souris NSG-NTF1 présentait aussi une population humaine GFP négative et CD71+/Glycophorine A+ au sein de la moelle osseuse. L'examen cytologique de la moelle osseuse démontrait la présence de quelques larges cellules arborant plusieurs nucléoles (Figure annexe 3-7 : C). Malgré une forte infiltration de la moelle osseuse, les os et la rate (29 mg) présentaient une apparence macroscopique normale (Figure annexe 3-7 : D et E). Les cellules myéloprolifératives de la souris NSG-NTF1 montraient un profil transcriptomique similaire aux cellules prélevées lors de la biopsie de moelle lors du diagnostic du patient atteint d'une AMKL présentant la fusions NTF (Figure annexe 3-7 : F).

La retransplantation d'un million de cellules provenant de la souris NSG-NTF1 à quatre souris NSG n'a pas réussi à générer une leucémie chez les animaux receveurs secondaires. De fait, aucune cellule humaine ne fut retrouvée lors de l'euthanasie plus d'un an suivant la transplantation. Bien que la viabilité des cellules cryopréservées provenant de la souris NSG-NTF1 fut confirmée avant

la transplantation, ces cellules myéloprolifératives restent très fragiles et ne supportent pas facilement l'environnement *ex vivo* ainsi que la décongélation. La quantité limitante de cellules de xénogreffe recueillies lors du sacrifice de la souris primaire n'a pas permis de confirmer le caractère leucémique de cette population.

Les difficultés rencontrées lors des tentatives de génération d'un modèle synthétique de leucémie NTF AMKL peut avoir plusieurs explications. Premièrement, il est possible que la fusion *NUP98::BPTF* nécessite la présence des deux variants d'épissage (NTF1 et NTF2) ou la présence d'une mutation secondaire afin de générer une leucémie.

D'autre part, certaines souris NSG et SGM3 des conditions NTF1 et NTF2 ont développés une prolifération de cellules lymphocytaires T (CD3+) plutôt que des populations myéloïdes, en moyenne 32 semaines post-transplantation (n= 10/36). Ces souris présentaient une rapide inflammation de la peau accompagnée d'une alopecie importante (résultats non présentés) s'apparentant à une GvHD (maladie du greffon contre l'hôte) ^{396,397}. La présence de cellules lymphocytaires T, négatives pour la GFP (Green fluorescent protein), peut être expliquée par la reconstitution hématopoïétique normale suivant la xénotransplantation de cellules HSPC chez la souris NSG et NSG-SGM3 ^{375,392}. Des cellules CD3+ activées furent aussi retrouvées accompagnant la moitié des cas d'AMKL lors de la modélisation de la leucémie mégacaryoblastique N5A (voir figure 3-7 : A) ainsi que lors de la xenotransplantation de cellules d'AML provenant de patients ³⁷⁵. L'administration d'OKT3, un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine membranaire CD3 humaine, pourrait permettre de réduire la présence des symptômes éprouvés par ces souris ^{398,399}

3.3.3.2 Caractérisation moléculaire des modèles AMKL NUP98r

Tel que démontré au chapitre 3, nous avons généré un modèle dérivé du patient ayant une AMKL positive à la fusion NTF. Ce modèle pdx de leucémie mégakaryoblastique semble présenter un programme transcriptionnel comparable aux modèles d'AMKL initiées par N5A (Figure 3-8 : A). De plus, il est intéressant de noter que l'analyse du profil transcriptomique de l'échantillons de la souris NSG-NTF1 montre une similarité avec l'échantillon du patient ayant développé une AMKL positive à la fusion NTF au diagnostic. D'autre part, nos analyses cytogénétiques ont pu démontrer

une certaine stabilité chromosomique entre les échantillons patient NTF au diagnostic, à la progression de la maladie ainsi que chez le modèle pdxNTF dérivé de ce dernier (Figure 3-8 : B).

Il est intéressant de noter que nos modèles leucémiques présentent des anomalies chromosomiques s'apparentant aux leucémies des patients atteints d'AMKL non associées au syndrome de Down. Chez ces patients, des gains de chromosomes sont rapportés dans près de la moitié des cas⁴⁰⁰. Ces gains surviennent plus fréquemment pour les chromosomes 6, 7, 8, 19 et 21^{148,400}. Notre modèle d'AMKL pdxNTF présente la plupart des anomalies génétiques retrouvées chez le patient, notamment des gains de matériel touchant les chromosomes 6, 7 et 19 (Figure annexe 3-8 : B). Pour sa part, le modèle synthétique d'AMKL exprimant la fusion N5A présente des gains des chromosomes 8 et 19 (Figure annexe 3-8 : C). Il est intéressant de noter qu'il existe une association significative entre les gains des chromosomes 6, 8, 19 et 21⁴⁰⁰.

Lors du séquençage de l'exome du modèle pdxNTF, nous avons identifié la mutation JAK2-V617F, au sein d'un échantillon de xéno greffe prélevé d'une souris tertiaire (Table 3-1). Cette mutation est associée à une activation constitutive de JAK2 et est fréquemment retrouvée chez les AMKL¹⁴⁸. Cette mutation fut détectée dans l'échantillon pdxNTF à une fréquence allélique de 0.5 et ne fut pas détectée lors de l'analyse des échantillons du patient. Cette mutation semble avoir été acquise lors de la transplantation sériée de notre modèle pdx. Nous n'avons pas effectué la recherche de cette mutation dans d'autres xéno greffes prélevées de souris primaires ou secondaires. Les mutations de *NOTCH2*, *ETV6* et *BCOR* ne sont pas pathogéniques selon l'agrégateur d'informations ClinVar^{401,402}.

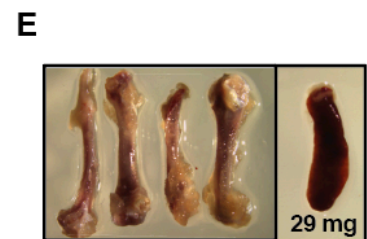
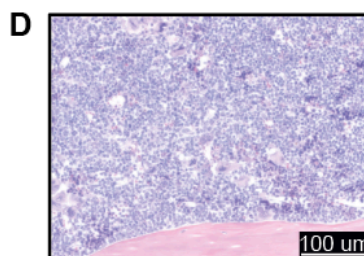
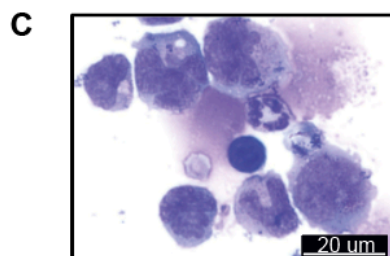
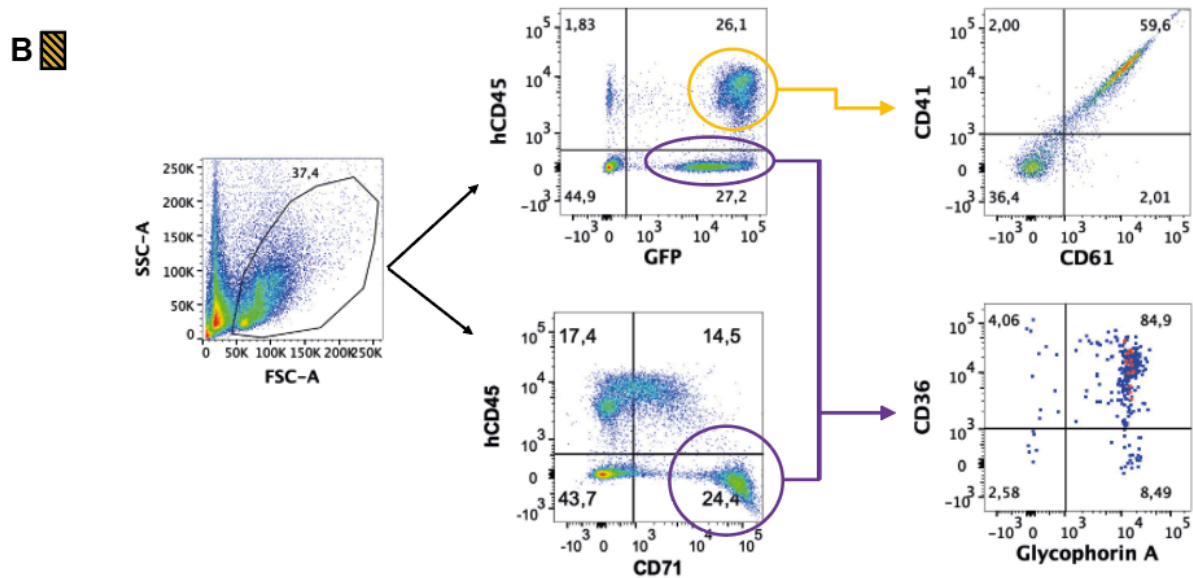
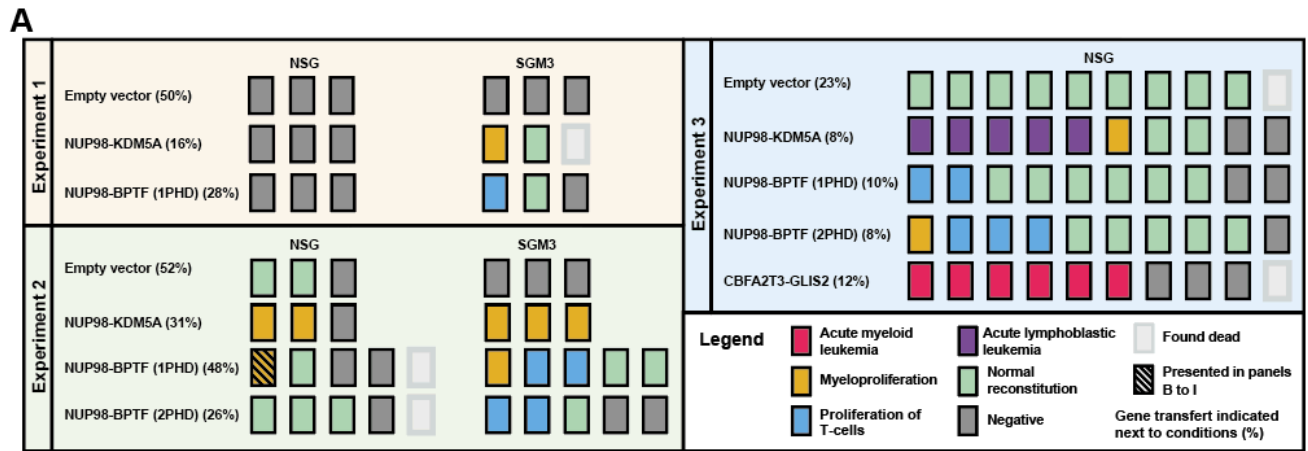


Figure 3-7 - Évaluation du potentiel de transformation leucémique de la fusion *NUPT98-BPTF*.

A) Représentation globale des expériences de modélisation leucémique impliquant les fusions NUP98::KDM5A (N5A), NUP98::BPTF (1 ou 2 PHD domaine : NTF1/2) et CBFA2T3::GLIS2 (CG2). Chaque carré de couleur représente une souris ainsi que son phénotype basé sur l'interprétation des données de cytométrie en flux lors de l'euthanasie. NSG : Nod-Scid-gamma null, SGM3 : Souris NSG sécrétant du Stemcell factor (SCF), du GM-CSF et de l'IL3. **B à E)** Souris NSG arborant la fusion NTF1 ayant développé une myéloprolifération identifiée en **A**. **B)** Immunophénotype des populations cellulaires retrouvées au niveau de la moelle osseuse lors de l'euthanasie. **C)** Coloration Giemsa d'une préparation cytologique de cellules de la moelle osseuse. **D)** Coloration HPS d'une coupe histologique de la moelle osseuse. **E)** Photographies des os et de la rate (29 mg).

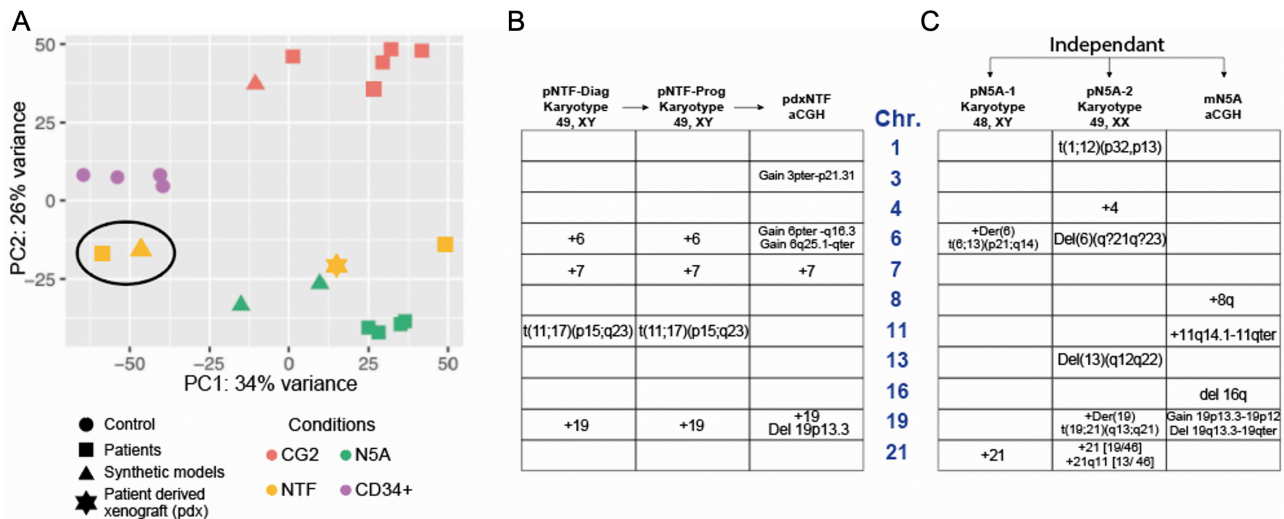


Figure 3-8 – Caractérisation moléculaire des modèles AMKL NUP98r

A) Analyses de composantes principales (PCA) du profil transcriptomique des échantillons d'AMKL et myéloprolifératifs émanant des expériences de modélisation combinées aux leucémies AMKL provenant de la figure 3-7 panel B. L'échantillon NSG-NTF1 ainsi que l'échantillon au diagnostic du patient présentant la fusion NTF sont encadrés en noir. **B)** Comparaison de l'analyse cytogénétique du patient atteint d'une AMKL arborant la fusion NTF au diagnostic (pNTF-Diag) et à la progression de la maladie (pNTF-Prog) avec l'analyse du CGH provenant d'un modèle de leucémie dérivé patient (pdxNTF). Seules les anomalies présentes dans plus de 50% des cellules sont représentées à moins que spécifié autrement. **C)** Comparaison de l'analyse cytogénétique de deux patients indépendants AMKL N5A positifs avec une analyse de CGH d'un modèle synthétique d'AMKL N5A positif. Seules les anomalies présentes dans plus de 50% des cellules sont représentées à moins que spécifié autrement.

Tableau 3-1 : Liste des variants d'intérêt détectés par séquençage de l'exome du modèle AMKL pdxNTF.

CHROM	POS	REF	ALT	SYMBOL	Consequence	Codons	Protein position	Amino acids	Allele freq. (1)	Depth (2)	gnomAD _AF (3)	CLINVAR_CLN SIG (4)
chr1	120005472	C	A	NOTCH2	missense_variant	cGa/cTa	91	R/L	0.507	588	0.008372	Likely_benign
chr9	5073770	G	T	JAK2	missense_variant	Gtc/Ttc	617	V/F	0.501	192	0.000351	Pathogenic
chr12	11869562	T	C	ETV6	missense_variant	cTc/cCc	201	L/P	0.438	109	0.004944	Benign
chrX	40063892	T	C	BCOR	missense_variant	tAt/tGt	1188	Y/C	0.101	90	0.000011	

- (1) Sample allele frequency
- (2) Supporting read depth
- (3) Allele frequency in the genome aggregation database
- (4) ClinVar : Clinical significance on ClinVar submitted records

4 Génération et caractérisation de modèles humains de leucémies de l'enfant induites par l'oncogène de fusion *CBFA2T3::GLIS2*.

4.1 Préface

La fusion *CBFA2T3::GLIS2* (CG2) est la fusion la plus répandue chez les leucémies mégacaryoblastiques (AMKL) pédiatriques. La recherche sur cette leucémie est grandement affectée par la rareté des patients ainsi que le manque de biomasse.

Basé sur nos expériences de modélisation d'AMKL exprimant la fusion *NUP98::KDM5A*, nous avons émis l'hypothèse que la surexpression de CG2 chez les cellules CD34+ isolées de sang de cordon, suivi de leur xénotransplantation en souris, génèrera des leucémies représentatives de la maladie retrouvée chez ces patients.

Nos expériences ont permis de générer plusieurs modèles d'AMKL synthétiques ayant été utilisés afin d'identifier des protéines de surfaces spécifiques à la leucémie AMKL initiée par CG2 ainsi que de nouvelles approches thérapeutiques pour ce sous-type de leucémie de haut risque.

4.1.1 Contribution

Lors des tentatives de modélisation de leucémies myéloïdes initiées par la fusion *NUP98::BPTF* présentée au chapitre 3, j'ai intégré la fusion CG2 à une de ces expériences (voir l'annexe du chapitre 3). Bien que plusieurs équipes de recherche aient échoué à générer ce modèle de leucémie (voir tableau 1-1), j'ai tout de même voulu tenter cette expérience par moi-même.

J'ai premièrement cloné la fusion de la lignée cellulaire M07e ainsi qu'isolé les cellules CD34+ des sangs de cordon servant de base à ce modèle. J'ai modifié le protocole de la génération de modèles présenté au chapitre 3 en faisant passer le temps de culture des CD34+ transduits avant la transplantation de 6 jours à 16 heures. Cette réduction de temps passé en culture avait pour but de préserver l'intégrité des cellules CD34+ transduites. J'ai mené à bien cette expérience de modélisation et fait le suivi des souris primaires avec l'aide de Sophie Cardin. La caractérisation morphologique et immunophénotypique tout comme la transplantation sériée du modèle CG2 a été effectuée par Luc Boulianne avec l'aide de Sophie Cardin. Mélanie Bilodeau, Sophie Cardin,

Louise Laramée ont contribué à la caractérisation moléculaire des modèles CG2 (RNAseq, WES, CGH, scRNAseq) en collaboration avec le laboratoire de Vincent-Philippe Lavallée (Nehme El-Hachem, Véronique Lisi, Azer Farah). Verena Gress a effectué les essais pharmacologiques et génétiques *in vitro* ainsi que les études pharmacologiques *in vivo* démontrant la vulnérabilité des AMKL CG2 et NUP98r à l'inhibition de BCL-X_L, supportée par Sophie Cardin.

En collaboration avec le laboratoire de Philippe Roux (Louis Théret, Léo Aubert), j'ai isolé et identifié les protéines de surface de nos modèles mégacaryoblastique mCG2, mN5A et pdxNTF ainsi que des cellules normales CD34+ isolées d'unités de sang de cordon. J'ai effectué l'analyse des données primaires du surfaceome et du transcriptome. Avec l'aide de Nehme El-Hachem, nous avons mis en évidence les protéines qui sont caractéristiques de la leucémie mégacaryoblastique arborant une fusion CG2 en intégrant les résultats de protéomique avec celles de transcriptomique. J'ai ensuite validé la présence des protéines de surface caractéristiques à la leucémie CG2 positive par cytométrie en flux chez nos modèles.

J'ai confirmé le site d'intégration de la fusion *CBFA2T3::GLIS2* ainsi que la clonalité de quatre de nos modèles leucémiques par séquençage nanopore en collaboration avec le laboratoire de Martin Smith (Bastien Paré, Shawn M. Simpson). J'ai aussi quantifié les niveaux d'expression du gène *CBFA2T3* non réarrangé et de la fusion *CBFA2T3::GLIS2* par une approche de PCR digitale en gouttelettes (ddPCR) avec de l'ARN extrait d'AMKL dérivées de modèles/patient.

Les modèles CG2 positifs générés par notre laboratoire sont la pierre angulaire sur laquelle reposent plusieurs initiatives de caractérisation et de recherche de thérapies innovantes pour ce sous-type de leucémie à haut risque.

4.2 CBFA2T3::GLIS2 Pediatric Acute Megakaryoblastic Leukemia is Sensitive to BCL-X_L Inhibition by Navitoclax and DT2216

Verena Gress^{1,2*}, Mathieu Roussy^{1,2*}, Luc Boulianne^{1,3}, Mélanie Bilodeau¹, Sophie Cardin¹, Nehme El-Hachem¹, Véronique Lisi¹, Banafsheh Khakipoor¹, Alexandre Rouette⁴, Azer Farah¹, Louis Théret⁵, Léo Aubert⁵, Furat Fatima^{1,3}, Éric Audemard⁵, Pierre Thibault⁵, Éric Bonneil⁵, Jalila Chagraoui⁶, Louise Laramée¹, Patrick Gendron⁵, Loubna Jouan⁴, Safa Jammali⁴, Bastien Paré¹, Shawn M. Simpson¹, Thai Hoa Tran^{1,2}, Michel Duval^{1,2}, Pierre Teira^{1,2}, Henrique Bittencourt^{1,2}, Raoul Santiago⁷, Frédéric Barabé^{8,9}, Guy Sauvageau^{2,6,10}, Martin A. Smith^{1,11}, Josée Hébert^{2,12}, Philippe P. Roux^{2,5,13}, Tanja A. Gruber^{14,15}, Vincent-Philippe Lavallée^{1,2#}, Brian T. Wilhelm^{5#} and Sonia Cellot^{1,2#}

1. Pediatric Hematology-Oncology division, Charles-Bruneau Cancer Center, CHU Sainte-Justine Research Center, Montréal, Québec, Canada;
2. Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada;
3. Department of Pathology, McGill University, Montréal, Québec, Canada;
4. Integrated Centre for Pediatric Clinical Genomics, CHU Sainte-Justine Research Center, Montréal, Québec, Canada;
5. Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada;
6. Molecular Genetics of Stem Cells Laboratory, Institute for Research in Immunology and Cancer;
7. Division of Hematology-Oncology, Centre Hospitalier Universitaire de Québec-Université Laval (CHUL), Québec City, QC, Canada.
8. Centre de recherche du CHU de Québec-Université Laval, Québec, Canada;
9. Department of Medicine, Faculty of Medicine of Université Laval, Québec, Canada;
10. Division of Hematology, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montréal, Québec, Canada;
11. Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Québec, H3T 1J4, Canada.
12. Division of Hematology-Oncology and Québec Leukemia cell bank, Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Québec, Canada;
13. Department of Pathology and Cell Biology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.
14. Department of Pediatrics, Stanford University School of Medicine, Stanford, California, USA;
15. Stanford Cancer Institute, Stanford University School of Medicine, Stanford, California, USA.

*These authors contributed equally to this work

These authors shared senior authorship

Reference: Gress V.*, M. Roussy*, L. Boulianne, M. Bilodeau, S. Cardin, N. El-Hachem, V. Lisi, B. Khakipoor, A. Rouette, A. Farah, L. Théret, L. Aubert, F. Fatima, É. Audemard, P. Thibault, É. Bonneil, J. Chagraoui, L. Laramée, P. Gendron, L. Jouan, S. Jammali, B. Paré, S.M. Simpson, T.H. Tran, M. Duval, P. Teira, H. Bittencourt, R. Santiago, F. Barabé, G. Sauvageau, M.A. Smith, J. Hébert, P.P. Roux, T.A. Gruber, V-P. Lavallée, B.T. Wilhelm and S. Cellot. CBFA2T3-GLIS2 pediatric acute megakaryoblastic leukemia is sensitive to BCL-XL inhibition by Navitoclax and DT2216. *Blood Adv.* Sep 20 2023;doi:10.1182/bloodadvances.2022008899

Statut : Published

4.2.1 Abstract

Acute megakaryoblastic leukemia (AMKL) is a rare, developmentally restricted and highly lethal cancer of early childhood. The paucity and hypocellularity (due to myelofibrosis) of primary patient samples hamper the discovery of cell- and genotype-specific treatments. AMKL is driven by mutually exclusive chimeric fusion oncogenes in two thirds of cases, with CBFA2T3::GLIS2 (CG2) and NUP98 fusions (NUP98r) representing the highest fatality subgroups. We established CD34+ cord blood-derived CG2 models (n=6) that sustain serial transplantation and recapitulate human leukemia regarding immunophenotype, leukemia initiating cell frequencies, co-mutational landscape and gene expression signature with distinct upregulation of the pro-survival factor BCL2. Cell membrane proteomic analyses highlighted CG2 surface markers preferentially expressed on leukemic cells compared to CD34+ cells (e.g. NCAM1, CD151). AMKL differentiation block in the mega-erythroid progenitor space was confirmed by single cell profiling. While CG2 cells were rather resistant to BCL2 genetic knockdown or selective pharmacological inhibition with Venetoclax, they were vulnerable to strategies that target the megakaryocytic pro-survival factor BCL-X_L (*BCL2L1*), including *in vitro* and *in vivo* treatment with BCL2/BCL-X_L/BCL-W inhibitor Navitoclax and DT2216, a selective BCL-X_L PROTAC (proteolysis-targeting chimera) degrader developed to limit thrombocytopenia in patients. NUP98r AMKL were also sensitive to BCL-X_L inhibition, but not the NUP98r monocytic leukemia, pointing to a lineage-specific dependency. Navitoclax or DT2216 treatment in combination with low dose cytarabine further reduced leukemic burden in mice. This work extends the cellular and molecular diversity set of human AMKL models and uncovers BCL-X_L as a therapeutic vulnerability in CG2 and NUP98r AMKL.

4.2.2 Introduction

Acute megakaryoblastic leukemia (AMKL) is a developmentally restricted and early-onset cancer affecting children 0-4 years of age, including neonates^{143,318,403,404}, pointing to a stem or progenitor cell of origin that is only transiently present in time⁴⁰⁵. It represents ~10% of pediatric acute myeloid leukemia (AML) cases and is a molecularly heterogeneous and highly lethal leukemia, with dismal cure rates (<50%)⁴⁰⁶. Two-thirds of AMKL cases are driven by mutually exclusive chimeric fusion oncogenes including *RBM15::MKL1*^{407,408}, *KMT2A* translocations¹⁴⁸, and cytogenetically cryptic rearrangements involving either *NUP98*^{137,409} (*NUP98r*, specifically *NUP98::KDM5A* (N5A)¹⁶¹ and *NUP98::BPTF* (NTF)³⁴⁷), *HOX* genes^{143,148,318} or the *CBFA2T3::GLIS2* (CG2) fusion^{160,162,227,410,411}. The mapping of functional dependencies of *de novo* pediatric AMKL is emerging^{157,412}, and a repertoire of relevant preclinical models is needed to develop cell- and genotype-specific treatments for pediatric leukemia patients.

CG2 and *NUP98r* AMKL are recognised as the highest relapse risk subgroups^{227,406,413}. The CG2 fusion results from a cryptic inversion on chromosome 16, joining the N-terminal neryv homology regions (NHR2, protein-interacting domains) of co-repressor *CBFA2T3* (*ETO2*) to the C-terminal zinc finger domains of transcription factor *GLIS2*, which allows binding to *GLI* DNA consensus sequences^{160,162}. *CBFA2T3* is involved in hematopoietic stem cell (HSC) maintenance and differentiation, as well as in the regulation of erythro-megakaryocytic progenitors^{220,222,414}. *GLIS2* was primarily identified in adult kidneys, maintaining normal tissue architecture and function²²⁴. CG2-targeting treatments are actively explored, including Aurora A kinase inhibitors^{160,415}, interference with CG2 fusion oligomerization¹⁶³, targeting of cell adhesion molecule NCAM1⁴¹⁰, the FOLR1 receptor^{411,416}, or the JAK-STAT pathway with Ruxolitinib^{161,166}.

Resisting cell death is a long-recognised hallmark of cancer⁴¹⁷, and agents that promote apoptosis entered the therapeutic arena for AML⁴¹⁸. The subsequent development of pharmacological inhibitors (BH3 mimetics) that target single or multiple pro-survival proteins^{419,420} has sparked significant interest in oncology as these agents can induce mitochondrial apoptosis in multiple hematological malignancies^{421,422} with significant clinical responses⁴²³, including in children^{424,425}. Evidence suggests that pro-survival factor dependency is both lineage-⁴²⁶⁻⁴²⁹ and mutation-

specific^{430,431} in leukemia, and the integration of BH3 mimetics into current treatment protocols is under active investigation.

To define AMKL functional dependencies and overcome the paucity of pediatric patient samples, we have engineered CG2 AMKL models derived from cord blood (CB) hematopoietic stem and progenitor cells (HSPC) that phenocopy the human disease. Across AMKL genotypes, CG2 leukemia distinctively upregulate the pro-survival factor BCL2 yet are resistant to BCL2-specific inhibition with Venetoclax or genetic knockdown. In contrast, targeting the megakaryocytic lineage pro-survival factor BCL-X_L^{432,433} with Navitoclax⁴³⁴ (binding to BCL2, BCL-X_L and BCL-W) or BCL-X_L proteasomal degrader DT2216⁴³⁵ induced apoptosis of CG2 and NUP98r AMKL cells, with minimal cross toxicity on normal CB-CD34+ HSPC. Our work highlights pro-survival protein BCL-X_L as a therapeutic vulnerability in pediatric AMKL and is timely aligned with a recent study suggesting that BCL-X_L is also a potential target of adult mega-erythroid leukemia⁴³⁶. Addition of anti-BCL-X_L agents to cytarabine-based chemotherapy regimens in pediatric AMKL clinical trials is within reach and not exploited.

4.2.3 Methods

Extended methods are provided in the Supplemental Methods (see section 4.11.1).

4.2.3.1 Patient samples

Pediatric AMKL samples (Table S1 and ¹⁶¹) were collected with approval from the Research Ethics Boards (REB) of Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Sainte-Justine and informed patient consent in agreement with the Declaration of Helsinki. Biobanking was overseen by the Quebec Leukemia Cell Bank (Montréal, Canada).

4.2.3.2 Generation of CG2 models

CBFA2T3::GLIS2 cDNA was amplified from M07e cell line and cloned into the MNDU lentiviral expression vector (Table S2). Umbilical cord blood units, collected with maternal consent, were distributed by Héma-Québec (Montréal, Canada) and manipulated as described¹⁶¹

4.2.3.3 Xenotransplantation

Mouse experimental procedures were performed in accordance with the Canadian Council of Animal Care and with approval from the CHU Sainte-Justine REB and Animal Institutional Ethic

Committee (approval number: MP-21-2017-1566). Xenotransplantation and characterization protocols are provided in the suppl. methods.

4.2.3.4 Flow cytometry

Immunophenotyping antibodies are listed in Table S3. Apoptotic assays and intracellular staining are detailed in suppl. methods.

4.2.3.5 Molecular studies

Detailed protocols and sample descriptions are presented in suppl. methods and Table S4.

4.2.3.6 RNA sequencing.

RNA sequencing (RNAseq) and data processing were performed at the Institute for Research in Immunology and Cancer's Genomics Platform (Montréal, Canada) using the Illumina Nextseq500 with 150 cycles paired-end runs. Sequences were aligned to the reference human genome version GRCh38.

4.2.3.7 Single cell RNA sequencing

Single cell suspensions were processed on the Chromium Controller according to the manufacturer's protocol and sequenced at the CHU Sainte-Justine Integrated Centre for pediatric clinical genomics (Montréal, Canada).

4.2.3.8 *In vitro* pharmacological inhibition assays

Synthetic models were maintained in optimised serum-free media. Navitoclax (ABT-263), Venetoclax (ABT-199), DT2216, cytarabine (AraC) and Staurosporine were purchased from MedChemExpress (NJ, USA). Media composition, dose response curves and functional assays are described in suppl. methods.

4.2.3.9 *In vivo* drug studies

AMKL- xenotransplanted mice were treated either daily by oral gavage with Navitoclax (100mg/kg, ABT-263⁴³⁴), DT2216 i.p. every 4 days (15mg/kg)⁴³⁵ or vehicle only. For drug combinations, mice were additionally treated with cytarabine (AraC, 20mg/kg, i.p.) for the first 5 days. Detailed protocols are described in suppl. methods.

4.2.3.10 Data Sharing Statement

The RNAseq dataset was deposited in the Gene Expression Omnibus database (accession number GSE209628).

4.2.4 Results

4.2.4.1 CG2 gene fusion transforms CD34+ cord blood cells

To generate human leukemia models, we overexpressed CG2 in pooled CB-CD34+ purified cells by transduction with a lentiviral construct carrying the fusion oncogene and a GFP reporter (Fig.1A). Gene transfer rates averaged 12.5% (Fig.1B) and 80% of each well was separately transplanted into one NSG recipient mouse. Leukemia penetrance was of 60% with latencies between 9.9 to 36.1 weeks (Fig.1B). Expression of the CG2 fusion transcript was confirmed by RT-PCR analysis (Fig.1C) and RNA sequencing of leukemic cells. Expression levels of the CG2 fusion transcript and wild type *CBFA2T3* were comparable between models and patient samples (Suppl.Fig.S8). At necropsy of leukemic mice, infiltration of hematopoietic organs by leukemic blasts was confirmed in bone marrow (BM) and spleen (hCD45+GFP+ cells, Fig.1D-F, Suppl.Fig.S1, Table S5). No adverse outcomes were documented in the empty-vector control group (n=10, Fig.1F-G). All six engineered leukemic models were able to robustly sustain serial transplantation with consistent disease phenotype and latencies (~8-12 weeks), tested for up to 4 passages *in vivo* (Fig.1G, Suppl.Fig.S1, Table S5). As seen in CG2 patients, some mice exhibited neurological deficits of variable intensities indicative of leukemic paraspinal infiltration, which was confirmed by bioluminescent imaging of luciferase-transduced grafts (Suppl.Fig.S2).

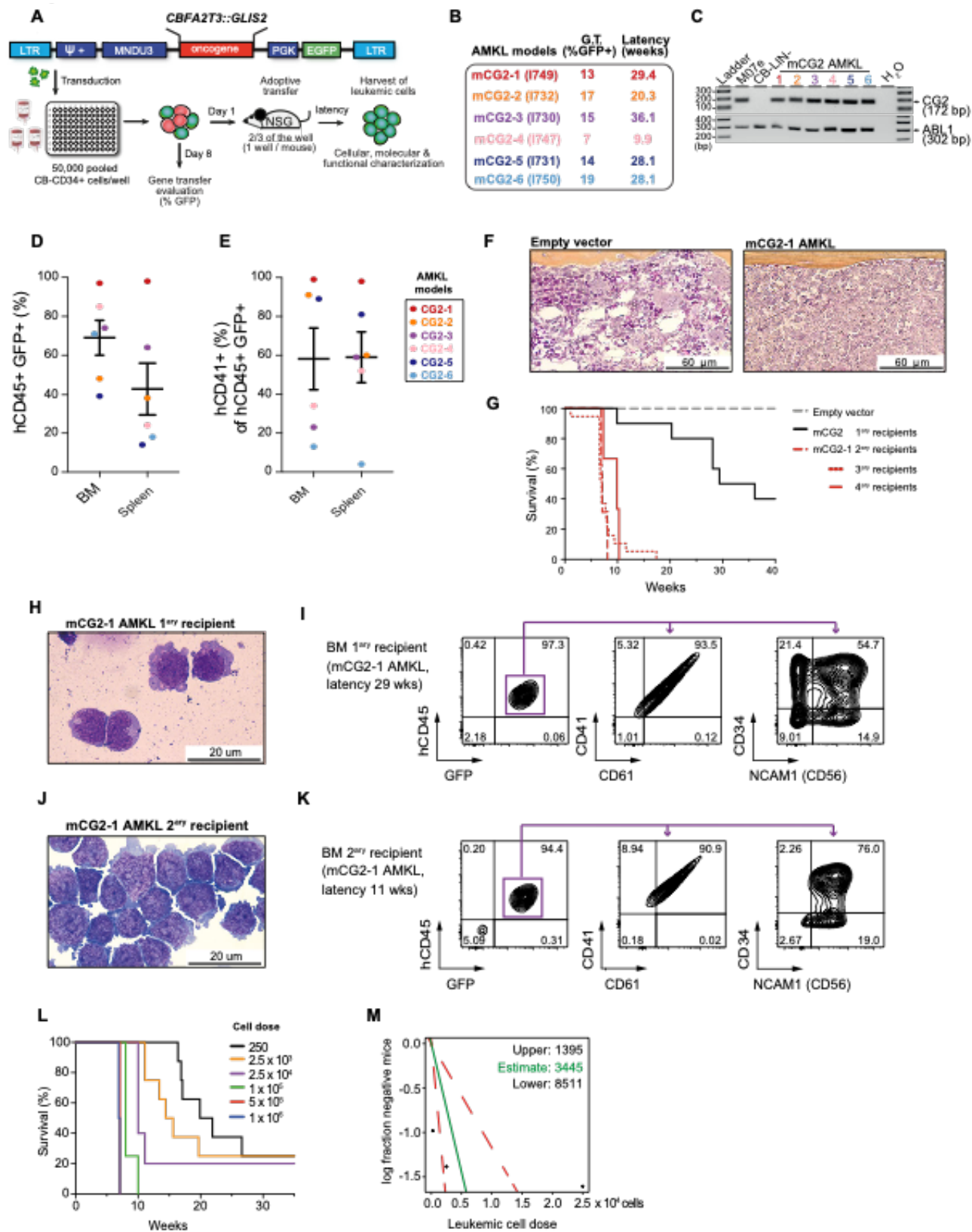
The generated leukemia showed megakaryocytic morphology and lineage markers (hCD45+CD34+/-CD41+CD61+) with significant CD56 (NCAM1) expression, a hallmark of CG2 AMKL^{160,162,228} (Fig.1H-K, Suppl.Fig.S4, Table S5). The CG2-6 model was hCD45+CD71+CD117+ by immunophenotyping, with lower surface expression of CD41 (Fig.1E), CD34, CD33, CD56 and absence of myelo-monocytic markers (MPO, CD68, LYZ, FUT4/CD15 and ITGAM/CD11b) by transcriptomic and flow cytometry (Table S5, Suppl.Fig.S3-4), pointing to an early mega-erythroid progenitor state. AMKL development *in vivo* was retained after *in vitro* culture for 6 days, providing physiologically relevant cellular substrate for biochemical analyses (Suppl.Fig.S5)

AMKL leukemia initiating cell (LIC) frequency was assessed by limiting dilution assay (LDA) using cells isolated from mCG2-1, mCG2-2 and mCG2-6 recipients and approximated 1 in 3,400 cells, 1 in 14,938 cells, and 1 in 15,286 cells, respectively, close to the 1 in 10,300 LIC frequency assessed in a NUP98r patient sample (Fig.1L-M, Table S6). Time to overt leukemia was proportional to cell dose, with 4 of 8 mice of mCG2-1 succumbing to AMKL 20-30 weeks after injection of 250 cells (Fig.1L, Table S6). Overall, the engineered CG2 AMKL faithfully recapitulate human disease, reside in the mega-erythroid differentiation space and harbor high LIC frequencies, as reported for patient samples¹⁶⁰.

(Figure on the next page)

Figure 4-1 – Generation of human models of CBFA2T3::GLIS2 leukemia.

A) Experimental procedure used to establish xenograft models of CBFA2T3::GLIS2 (CG2) acute megakaryoblastic leukemia (mCG2 AMKL) using independent lentiviral transduction in cord blood CD34+ cells (CB-CD34+, pool of 6 CB units) and transplantation in NSG recipient mice. B) Schematic representation of 6 CG2 leukemia models (mCG2) describing initial gene transfer (G.T., %GFP) at the time of transplantation and leukemia latency in primary recipient mice. Mouse identification in brackets. One of 10 mice was not available for analysis. C) Detection of CG2 fusion transcript expression by RT-PCR with RNA isolated from leukemic blasts, as indicated. M07e and normal lineage-depleted cord blood (CB-LIN-) cells were used as positive and negative control, respectively. ABL1 was used as housekeeping gene. D) Percentage of infiltrating human blasts (hCD45+ GFP+) and E) CD41+ cells (of hCD45+ GFP+ population) in bone marrow (BM) and spleen of CG2 primary recipient mice (color code indicates distinct primary mice). F) Hematoxylin-phloxine-saffron-stained longitudinal sections of tibia bones harvested from primary recipient mice transplanted with control CB-CD34+ cells transduced with empty vector (left panel, 47 weeks after transplantation) and from a CG2-1 AMKL model (secondary recipient transplanted with 1 x 10⁶ CG2-1 AMKL xenograft cells and sacrificed 11.1 weeks after transplantation, right panel). G) Survival curves of primary recipient mice transplanted with CB-CD34+ cells transduced with CG2 (black line) or empty vector (gray dashes), and mice serially transplanted up to 3 times with CG2-1 AMKL (red lines). Giemsa-stained cytopins and flow cytometry profiles of leukemic BM cells from representative (H-I) primary (1ary) and (J-K) secondary (2ary) CG2-1 AMKL recipient mice (2ary recipient transplanted with 1.4 x 10⁶ CG2-1 AMKL xenograft cells and sacrificed 6.9 weeks after transplantation). Detailed characteristics of other CG2 leukemia xenografts in serially transplanted recipient mice are described in Table S5 and Suppl. Fig. S1 L) Survival curves of NSG recipient mice transplanted with CG2-1 AMKL xenograft cells in a limiting dilution cell transplantation assay and M) estimation of leukemia initiating cell (LIC) frequency and 95% confidence interval (red dashes) using the extreme limiting dilution analysis software (<http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda/>).



4.2.4.2 AMKL CG2 models phenocopy human disease at the molecular level

Transcriptomic profiling of the CG2 models closely correlate with genotype-matched patient samples ($r=0.64$; $n=2$, institutional cohort; $n=12$, validation cohort¹⁴⁸, Fig.2A), with high expression of *NCAM1*, *BMP2*, *ERG* and low *GATA1* levels^{160,162,163,405}. A CG2-specific gene signature of up- and downregulated markers was derived by comparing the expression profiles of CG2 models and patients ($n=10$) against institutional NUP98r AMKL ($n=7$) and CB-CD34+ cells ($n=4$), cross-validated in a patient cohort comprising different AMKL genotypes¹⁴⁸ ($n=73$ total, with $n=12$ CG2) (Fig.2A, Table S7). CG2 AMKL is a non-HOXA/B, non-MEIS1/2 leukemia, which distinctively expresses *GLIS2*, whereas *CBFA2T3* is expressed across AMKL genotypes (Suppl.Fig.S6B). Remarkably, CG2 AMKL upregulated pro-survival factor *BCL2* (Fig.2A), pointing to a potential subtype-specific vulnerability. Furthermore, the engineered CG2 AMKL models cluster with CG2 patients ($n=14$) by expression profiling (Fig.2B) and apart from other AMKL genotypes and CB-CD34+ cells. Principal component analysis revealed clustering of primary and tertiary xenografts based on expression profile (Suppl.Fig.S6A).

Akin to patient samples^{148,162,318}, the genomic landscape of the engineered CG2 models was rather silent as assessed by whole exome sequencing (WES) and comparative genomic hybridization (CGH) (Suppl.Fig.7), with no recurrent co-operating mutations, pathogenic single nucleotide variants (SNV) or indels. Comparable to the reported genomic landscape of human disease¹⁶², copy number variations (CNV) were identified in 4 of the 6 models, and chromosomal alterations remained stable over serial transplantation for two models analysed (Suppl.Fig.S7). We excluded insertional mutagenesis events by long-read DNA sequencing ($n=4$) and confirmed the (oligo)-clonal character of the engineered AMKL models (Suppl.Fig.S9). The CG2 AMKL models thus transcriptionally phenocopy human disease and appear genetically stable through serial transplantation.

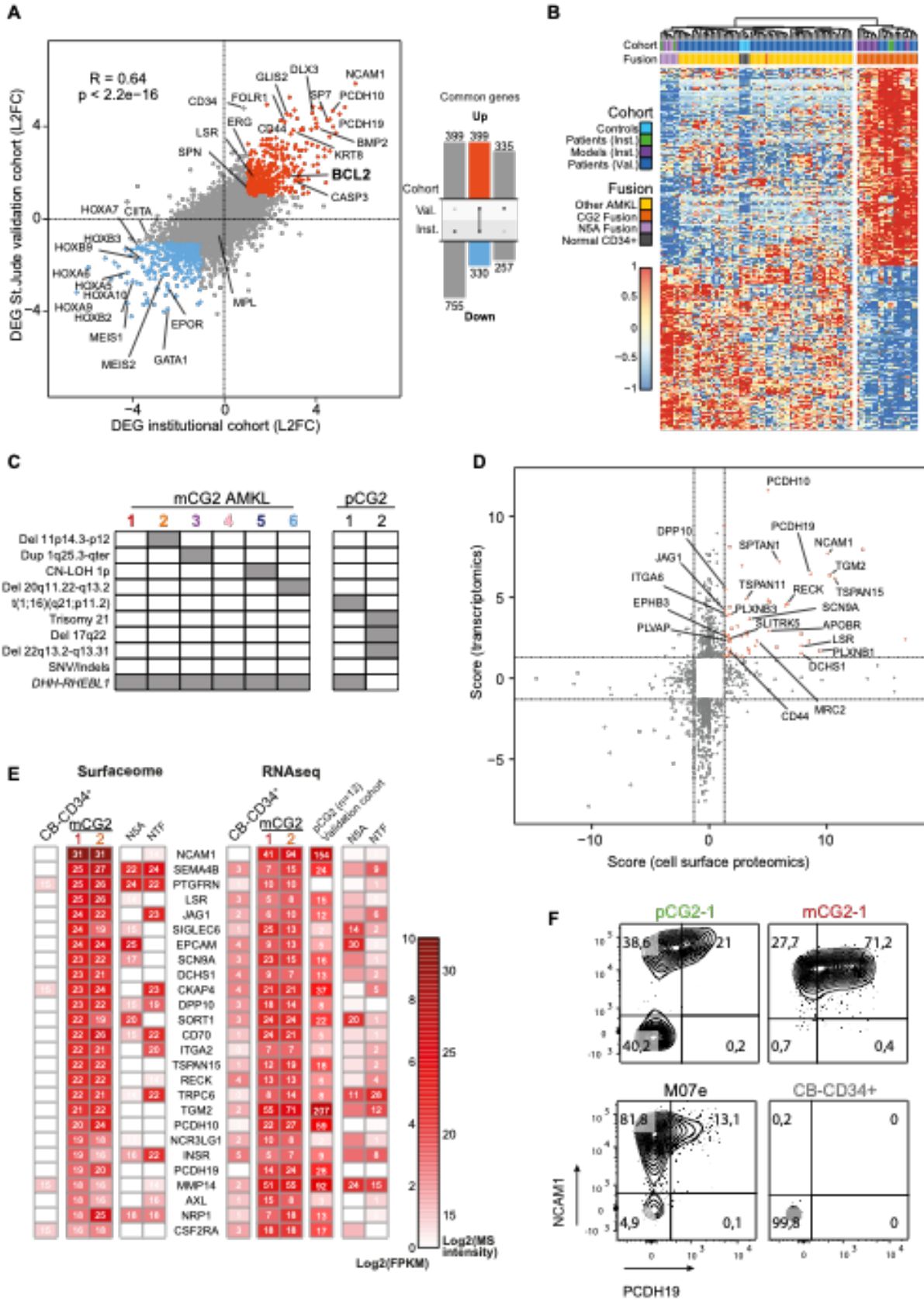


Figure 4-2 – Gene expression in CBFA2T3::GLIS2 leukemia models correlate with pediatric disease.

A) Left panel, correlation of differential gene expression (log 2-fold change, L2FC) in CBFA2T3::GLIS2 (CG2) acute megakaryoblastic leukemia (AMKL) models and patients from our institutional dataset (CHUSJ) compared to a validation dataset of pediatric CG2 AMKL (St. Jude). Differentially expressed genes, defined as $|L2FC| > 1$ and FDR q -value < 0.05 , common to both datasets are indicated in blue or orange and define the CG2 signature (Table S7). Institutional (Inst.) dataset: CG2 AMKL models (n=10) and CG2 patient samples (n=2) compared with NUP98::KDM5A (N5A) AMKL models (n=5), N5A patient samples (n=2) and normal CB-CD34+ cells (n=4). Validation (Val.) dataset: CG2 AMKL (n=12) vs other genetic subtypes of AMKL (n=61) from pediatric patients at diagnosis¹⁴⁸. Right panel, upset plots showing differentially expressed genes that are jointly over- (n=399) or under-expressed (n=330) in CG2 leukemias, corresponding to blue and orange dots in A. B) Hierarchical clustering using the 729 differentially expressed genes of the CG2 gene expression signature. C) Heatmap showing protein (Log₂ (MS intensity), left panels) and mRNA (RNAseq, FPKM values, right panels) expression of cell surface markers associated to CG2 leukemia (high expression in mCG2-1 and mCG2-2 leukemia models Log₂(LC-MS values) ≥ 16 & RNAseq FPKM ≥ 5) and weak/no expression in normal CB-CD34+ cells (Log₂(LC-MS values) < 16 & RNAseq FPKM < 5). Samples were analyzed in triplicates and represented as mean expression (biological triplicates for RNAseq and technical triplicates for proteomic data). For comparison, values for mN5A and pdxNTF are shown alongside mCG2 samples. The St. Jude validation cohort RNAseq expression is presented as a separate column. D) Star plot presenting the p-adjusted values of differentially expressed genes and differentially expressed proteins (FDR < 0.05) (Transcriptome: CHUSJ CG2 vs N5A AMKL & normal CB-CD34+; Surfaceome: CG2 vs NUP98r & CB-CD34+). The scores are calculated by multiplying the algebraic sign (+ or -) of the Log₂ fold change, surfaceome or transcriptome, by the corresponding Log₁₀(adjusted p-value). Significantly up-regulated CG2 AMKL-specific surface markers intersecting both datasets are labelled. E) Validation by flow cytometry of PCDH19 surface expression on CG2 AMKL cells from patient (pCG2-1), model mCG2-1, and M07e cell line. PCDH19 is not expressed on lineage-depleted human cord blood cells (CB-CD34+). Samples were co-stained with NCAM1. F) Left panels: scatter plot representations showing the best pairwise correlations of cell surface marker genes that select for CG2 genotype in a validation dataset of pediatric AMKL (out of 8 cell surface marker combinations, see Suppl. Fig. S13). Right panels: values, from top to bottom, represent the global and subtype-specific Kendall rank correlation coefficients. P-values: * < 0.05 , ** < 0.005 .

4.2.4.3 Proteomic analyses of human CG2 models identify genotype specific surface markers

We used a surface proteome (surfaceome) approach, as previously described^{161,437-439}, to identify CG2-specific membrane proteins vs normal HSPC (n=11 CB-CD34+, n=2 CG2 AMKL and n=2 NUP98r AMKL^{161,347}) (Fig.2C, Suppl.Fig.S10, Table S9). Comparing proteomic datasets of CG2 and CB-CD34+ cells confirmed that CG2 models express AMKL-associated markers CD151⁴⁴⁰, ITGA2B, PECAM1 (CD31⁴⁴¹ and NCAM1 (CD56)^{160,162,410} (Suppl.Fig.S10E). The 25 most abundant and differentially expressed proteins in CG2 vs CB-CD34+ were cross-validated against an external AMKL patient transcriptomic dataset¹⁴⁸ (Fig.2C, Suppl.Fig.S11B). Eight of these markers (CSF2RA, DPP10, NCAM1, NRP1, PCDH10, PCDH19, RECK, SCN9A) were significantly associated with the CG2 genotype (highlighted in S11B and Fig.2D). Five of the 25 surfaceome proteins could be validated using available flow cytometry antibodies, showing that PCDH19 and JAG1 were detected on a subset of cells across all patients and models, while CSF2RA, NRP1 and INSR were

only detected in a subset of samples (Fig.2E, Suppl.Fig.S12). Similarly, the FOLR1 receptor, recently reported to be associated with CG2 AMKL⁴¹¹, was found to be expressed on a significant proportion of cells across models, except for mCG2-6. Of note, the CD41^{low} CG2-6 cells express CD31/CD151 but upregulate CD41/CD61 in culture (Suppl.Fig.S4), pointing to immature leukemic cells that are primed towards the megakaryocytic lineage. Pairwise correlation analyses of cell surface markers most associated with CG2, uncovered that the combination of *NCAM1* with either *PCDH10* or *PCDH19* was most predictive of the CG2 genotype (Fig.2F, Suppl.Fig.S13, Table S10, p-val. <0.05). These markers can contribute to refine the panel of markers used for CG2 AMKL diagnosis and tracking of minimal residual disease (MRD) in patients⁴⁴².

4.2.4.4 CG2 leukemia lie in the mega-erythroid stem and progenitor differentiation space

Engineered CG2 models (n=4) and patients (n=2) were profiled by single-cell RNA sequencing (scRNAseq) to determine their cellular composition (Fig.3, Suppl.Fig.S14-S17). Key upregulated genes of normal megakaryocyte-erythroid progenitors (MEP), megakaryocyte progenitors (MKP) and platelets were inferred from normal BM cell populations (Human Cell Atlas, HCA⁴⁴³, Fig.3A-B, Table S11). MEP/MKP/platelet-specific genes, e.g. *ITGA2B* (CD41), are universally expressed in CG2 AMKL cells but not in adult AML cells⁴⁴⁴ (Fig.3C, Suppl.Fig.S15-S16). The MKP-specific genes *GP1BA* (Glycoprotein 1B Platelet subunit alpha, CD42b) and *GP9* (Glycoprotein IX) are more expressed in CG2 than normal MEP cells, indicating that CG2 leukemic cells lie towards the primitive megakaryocytic differentiation space. Transferring the cell type assignment from the HCA to AMKL and AML datasets, confirmed the dominant MKP bias of CG2 models and patients compared to other AML samples (grey shaded samples in Fig.3D, upper panel, Suppl.Fig.S14B-C). CG2 AMKL samples contain varying MEP proportions (Fig.3D lower panel), with the CG2-6 model partially projecting into the erythroid space (Fig.3D, blue shading in radar plot, CD34+ ERP fractions in lower panel). While MKP genes are homogeneously expressed in CG2 samples, only small subsets express genes suggesting terminal differentiation such as *CLEC1B* (Fig.3E, Suppl.Fig.S15-S16). This data indicates that CG2 models reside predominantly in the MKP differentiation space and recapitulate the lineage commitment of CG2 AMKL patients.

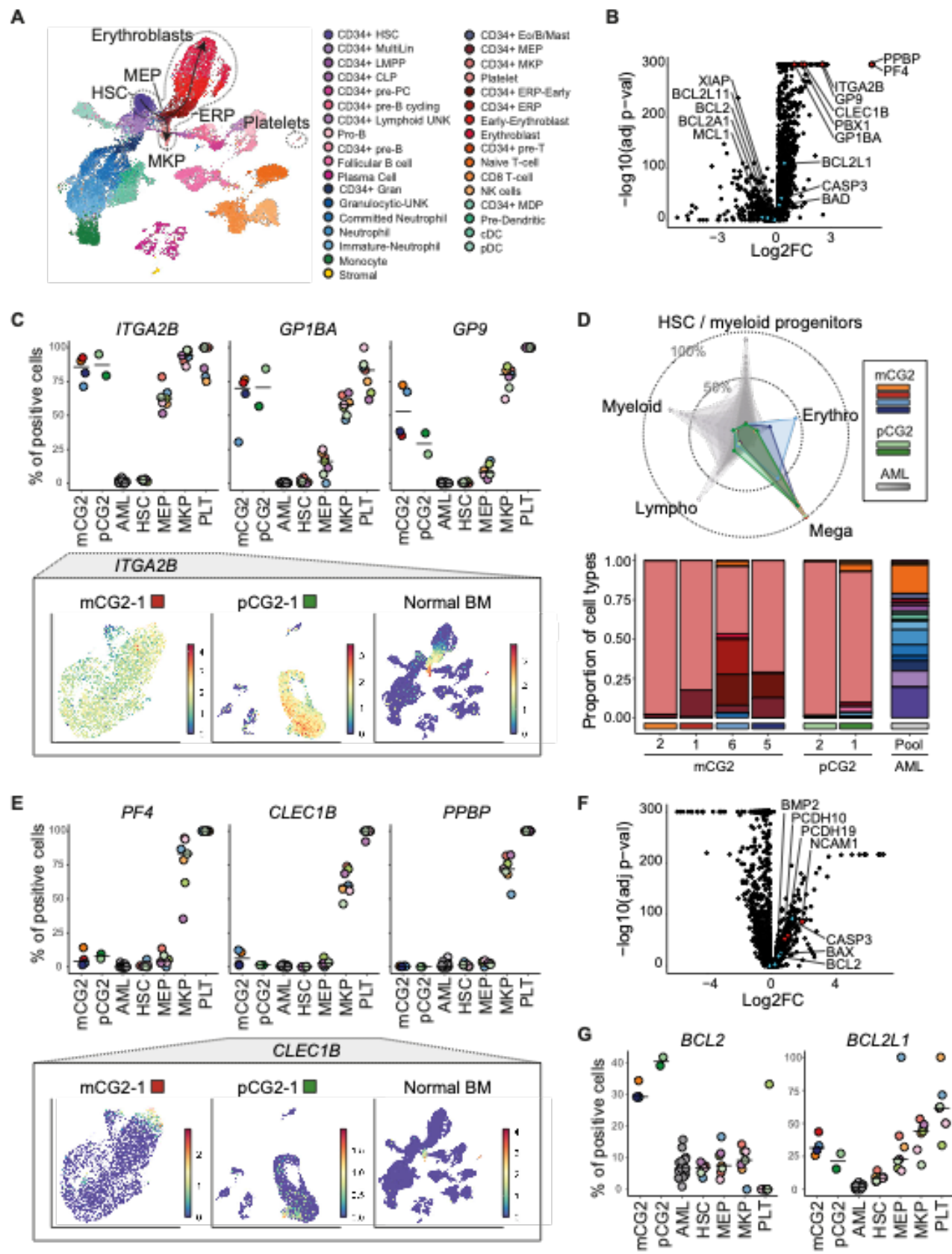
Co-embedding the datasets in the same UMAP revealed that CG2 models and patients lie in an area of the UMAP representation also populated by normal BM cells (HCA) of the megakaryocytic lineage (Suppl.Fig.S17A), highlighting the low inter-sample heterogeneity, in contrast to the large cell heterogeneity of normal BM, as seen by the distribution overlap of the CG2 models and patients (Suppl.Fig.S17B).

Furthermore, gene expression of leukemic CG2 MKP was compared to normal MKP to identify aberrantly expressed genes, such as *NCAM1* and *BCL2* (Fig.3F-G, Table S12), mirroring the CG2 bulk transcriptomic signature (Fig.2A). While no other *BCL2* family member was aberrantly expressed in CG2 MKP, *BCL2L1* (*BCL-X_L*) is specifically expressed in normal MEP/MKP/platelet subsets as compared to other cell types (adj. p-val= 7.5×10^{-111} , Fig.3B, Suppl.Fig.S14E), and *BCL2L1* expression is maintained across CG2 models and patients (Fig.3G, Suppl.Fig.S15-S16). This provides a rationale to assess the functional dependency of CG2 cells to *BCL-X_L*, based on lineage ontogeny, and to *BCL2*, given its aberrant expression in CG2 AMKL.

(Figure on the next page)

Figure 4-3 – CBFA2T3::GLIS2 leukemia consist of immature mega-erythroid stem and progenitor lineages.

A) UMAP of normal bone marrow lineages. The stem-mega-erythroid compartment is circled, relevant populations are labelled, and differentiation trajectories are highlighted with arrows. B) Differentially expressed genes between cells of the megakaryocytic lineage (CD34+ MEP, CD34+ MKP, platelets) and all other cell types in normal bone marrow (Table S11). Genes relevant to the megakaryocytic differentiation are highlighted in red, genes of the mitochondrial apoptotic pathway are highlighted in blue. C) Percentage positive cells for each gene in synthetic models of CG2 (mCG2), patient (pCG2), other subtypes of AML and in specific populations of the normal bone marrow (HSC, MEP, MKP, PLT). The horizontal line represents the median of the group, the patient and models are color coded as in (D) and the normal samples are color coded based on donor as in (Suppl Fig. S14D). The bottom panel shows the *ITGA2B* (CD41) expression per cell on a UMAP representation of model mCG2-1, patient pCG2-1 and normal BM (extended samples in Suppl Fig. S15-S16). D) Radar plot (top) of lineage composition assessed by scRNAseq in CG2 AMKL models and pediatric patients, as compared to diverse phenotypic and genetic subtypes of adult AML. The detailed proportion of each cell type is presented as stacked bar plots (bottom). Color coding of populations is as depicted in (A). E) Representation as in (C) of terminal differentiation gene expression (extended samples in Suppl Fig. S15-S16). F) Differentially expressed genes in the CD34+ MKP from the CG2 models and patients compared to normal CD34+ MKP (Table S12). Selected markers are highlighted in red and genes of the mitochondrial apoptotic pathway are highlighted in blue. G) Representation as in (C) of *BCL2* and *BCL2L1* (*BCL-X_L*) expression. HSC, hematopoietic stem cells; MEP, megakaryocyte-erythroid progenitors; MKP, megakaryocyte progenitors; PLT, platelets; Log2FC, Log2 fold change.



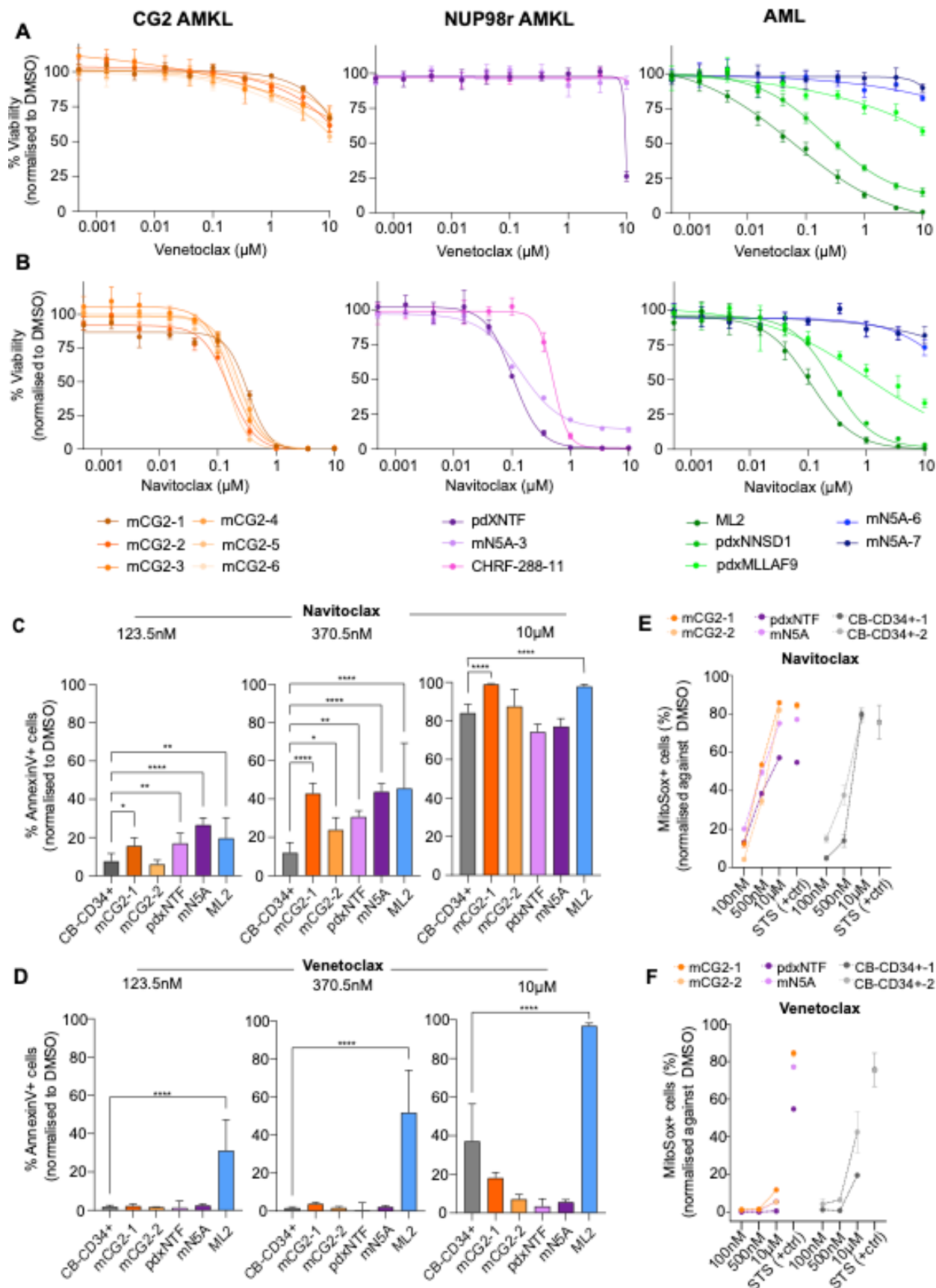
4.2.4.5 AMKL cells are resistant to Venetoclax but sensitive to Navitoclax

We tested sensitivity of AMKL cells to BCL2 inhibitor Venetoclax (CG2 n=6, N5A n=2¹⁶¹, pdxNTF n=1³⁴⁷,) as well as in AML samples (MLLr n=2, NNSD1 n=1 and N5A monocytic (CD68+LYZ+) AML models n=2¹⁶¹). All AMKL samples tested were resistant to Venetoclax with IC50s (half maximal inhibitory concentration) >10 μ M whereas AML samples were sensitive to Venetoclax (Fig.4A, Table S13). In contrast, both CG2 and NUP98r AMKL were sensitive to Navitoclax, which has a broader affinity to BCL2, BCL-X_L, and BCL-W, as well as AML samples (Fig.4B, Table S13), while genotype-matched monocytic N5A AML cells were resistant, suggesting a lineage-specific vulnerability. AMKL cells exposed to Navitoclax for 72hrs at concentrations spanning the leukemia-specific IC50 values exhibited higher levels of apoptosis than control CB-CD34+ cells (Fig.4C). In contrast, exposure to Venetoclax did not induce apoptosis in AMKL cells at doses up to 10 μ M (Fig.4D). Levels of mitochondrial superoxide radicals and loss of mitochondrial potential were higher in AMKL cells treated with Navitoclax than cells treated with Venetoclax (Fig.4E-F, Suppl.Fig.S18A), suggesting mitochondrial dysfunction. These results imply that AMKL cells are sensitive to BCL2/BCLX_L/BCL-W inhibitor Navitoclax with subsequent induction of mitochondrial apoptosis, yet resistant to Venetoclax that uniquely targets BCL2.

(Figure on the next page)

Figure 4-4 – CBFA2T3::GLIS2 and NUP98r AMKL xenografts are sensitive to induction of the intrinsic apoptotic pathway.

A-B) Dose-response curves and half maximal inhibitory concentrations (IC50, Table S13) determined for each indicated sample of AMKL or AML, submitted to a viability assay in presence of Venetoclax or Navitoclax. (Cell-Titer Glo, 6-day incubation, 4 replicates). Viability readout was normalised to DMSO controls for each sample. C-D) Apoptosis assessed by Annexin V staining and flow cytometry of AMKL xenografts (mCG2, pdxNTF, mN5A, n=2 biological replicates for each cell type), ML2 (AML cell line, n=2), or normal CB-CD34+ cells (n=3) treated 72h in culture as triplicates with the indicated BH3 mimetics (123.5 nM, 370 nM and 10 μ M) or DMSO. p-values: ** <0.005, *** <0.001, **** <0.0001. E-F) Mitochondrial superoxide production was assessed by MitoSox staining and flow cytometry of AMKL xenografts or normal CB-CD34+ cells, treated with the indicated BH3 mimetics or DMSO for 72h in culture in duplicates. Staurosporine (STS) was used as positive control at 1 μ M. CG2, CBFA2T3::GLIS2; N5A, NUP98::KDM5A; NTF, NUP98::BPTF; mAMKL, synthetic xenograft AMKL; mAML, synthetic xenograft AML; pdx, patient-derived xenograft, CB-CD34+, cord blood CD34+ cells.



4.2.4.6 Inhibition of BCL-X_L induces mitochondrial apoptosis of CG2 and NUP98r AMKL

To dissect whether the induction of apoptosis in AMKL cells by Navitoclax is mediated via BCL2, BCL-X_L or BCL-W inhibition, expression levels of each gene were assessed using transcriptomic datasets. In accordance with the CG2 signature (Fig.2A), *BCL2* was most abundant in CG2 compared to NUP98r AMKL cells (institutional cohort, Fig.5A) and all other AML genotypes (n=7 CG2, n=73 patients total, validation cohort¹⁴⁸) (Fig.5B). In contrast, *BCL2L1* (BCL-X_L) is homogeneously expressed across AMKL genotypes and at much lower levels in the N5A monocytic AML (n=3). Intracellular protein levels of BCL-X_L were correspondingly increased in CG2 and NUP98r AMKL as compared to normal CB-CD34⁺ cells, while the BCL2 protein was only detected in the CG2 genotype, matching mRNA expression (Fig.5C). Sh-mediated knock-down (KD) against *BCL2*, *BCL2L1* or *BCLW* was used to assess the functional impact of reduced pro-survival factors in two distinct CG2 models (gene transfer >95% GFP+mCherry⁺ cells, Fig.5D-E, Suppl.Fig.S18B-C), with confirmation of efficient protein reduction of BCL2 and BCL-X_L (Fig.5F, Suppl.Fig.S15D). Increased apoptosis of AMKL cells (AnnexinV⁺ cells, Fig.5D, Suppl.Fig.S15E) was observed only with KD of BCL-X_L, but not BCL2 or BCL-W. Additionally, AMKL and monocytic N5A AML models were treated with DT2216⁴³⁵, a selective BCL-X_L proteolysis-targeting chimera (PROTAC) that targets BCL-X_L to the Von Hippel-Lindau E3 ligase (VHL) for degradation. VHL is abundantly expressed in our models of AMKL (Fig.5A) but not expressed in platelets, which are most vulnerable to BCL-X_L inhibition⁴³⁵. In a dose-response experiment, AMKL models were sensitive to DT2216 with IC50 concentrations below 200nM (Fig.5G, Table S13). In contrast, monocytic N5A AML models demonstrated resistance to DT2216 treatment with IC50 values above 10μM (Fig.5G, Table S13). AMKL cells exposed to 100nM and 1μM of DT2216 showed significantly higher levels of apoptosis compared to normal CB-CD34⁺ cells (Fig.5H) and higher mitochondrial stress, shown by increased superoxide levels and loss of mitochondrial membrane potential (Suppl.Fig.S18F-G). Furthermore, testing Navitoclax, Venetoclax and DT2216 on several independent CB-CD34⁺ pools revealed sample-dependent variability in drug response but overall lower toxicity with DT2216 in comparison to Navitoclax (Suppl.Fig.S18H, Table S13). These results suggest that the sensitivity of AMKL cells towards Navitoclax is due to the inhibition of BCL-X_L, demonstrated by genetic and pharmacological inhibition.

4.2.4.7 Monotherapy with Navitoclax or DT2216 reduces leukemic burden in high-fatality AMKL *in vivo*

To investigate the *in vivo* impact of BCL-X_L inhibition of Navitoclax or DT2216 as single agent, three independent models of AMKL were tested (Fig.6A, Suppl.Fig.S19-20), as well as chemo-refractory PDX of NTF³⁴⁷ (Suppl.Fig.S19-20). After a 3-week treatment cycle with Navitoclax, a significant reduction of leukemic infiltration was noted in mCG2-1, as assessed by spleen weight (Fig.6B) and abundance of GFP+hCD45+ AMKL cells in blood, BM and spleen (Fig.6C-D). Normal hematopoietic cell distribution and tissue architecture was restored in BM and spleen of Navitoclax-treated mice vs control (Fig.6E). Furthermore, Navitoclax-treated mice showed reduced circulating blasts during treatment (wk5) as well as one week after treatment (wk7, Fig.6F), conferring a survival benefit over vehicle-treated mice (Fig.6G). For mCG2-2, treatment was stopped early due to rapid onset of hindleg paralysis. Nevertheless, a significant reduction of overall leukemic burden was detected after 2 weeks of treatment, measured by luciferase intensity (Suppl.Fig.S19A-B), as well as reduction of GFP+Ametrine+ cells in the spleen in comparison to vehicle controls (Suppl.Fig.S19C). Reduced leukemic progression was seen in pdxNTF-xenografted mice treated with Navitoclax by *in vivo* imaging which was significantly lower compared to vehicle control mice post treatment (wk8, Suppl.Fig.S19D-E).

We furthermore tested DT2216 in two distinct models of CG2 (mCG2-1 and mCG2-6), presenting either as megakaryopoietic or mega-erythroid leukemia, and in pdxNTF. Xenografted mice were treated with DT2216 every 4 days for a total of 4-6 weeks. Treatment with DT2216 demonstrated reduced leukemic blasts in the blood (GFP+hCD45+ cells, Fig.6H) and significantly prolonged survival of mCG2-1 transplanted mice in comparison to vehicle controls (Fig.6I). Mice transplanted with CG2-6 were investigated after 6 weeks of treatment by BM aspiration and showed significant reduction of hCD45+GFP+CD31+CD151+ leukemic cells in the BM in comparison to vehicle controls (Suppl.Fig.S20A-B). Additionally, a 4-week treatment cycle of DT2216 significantly reduced leukemic burden in pdxNTF-xenografted mice (Suppl.Fig.S20C). This work demonstrates that BCL-X_L degradation either with Navitoclax or DT2216 could be exploited as a strategy in the treatment of high-fatality CG2 and NUP98r AMKL

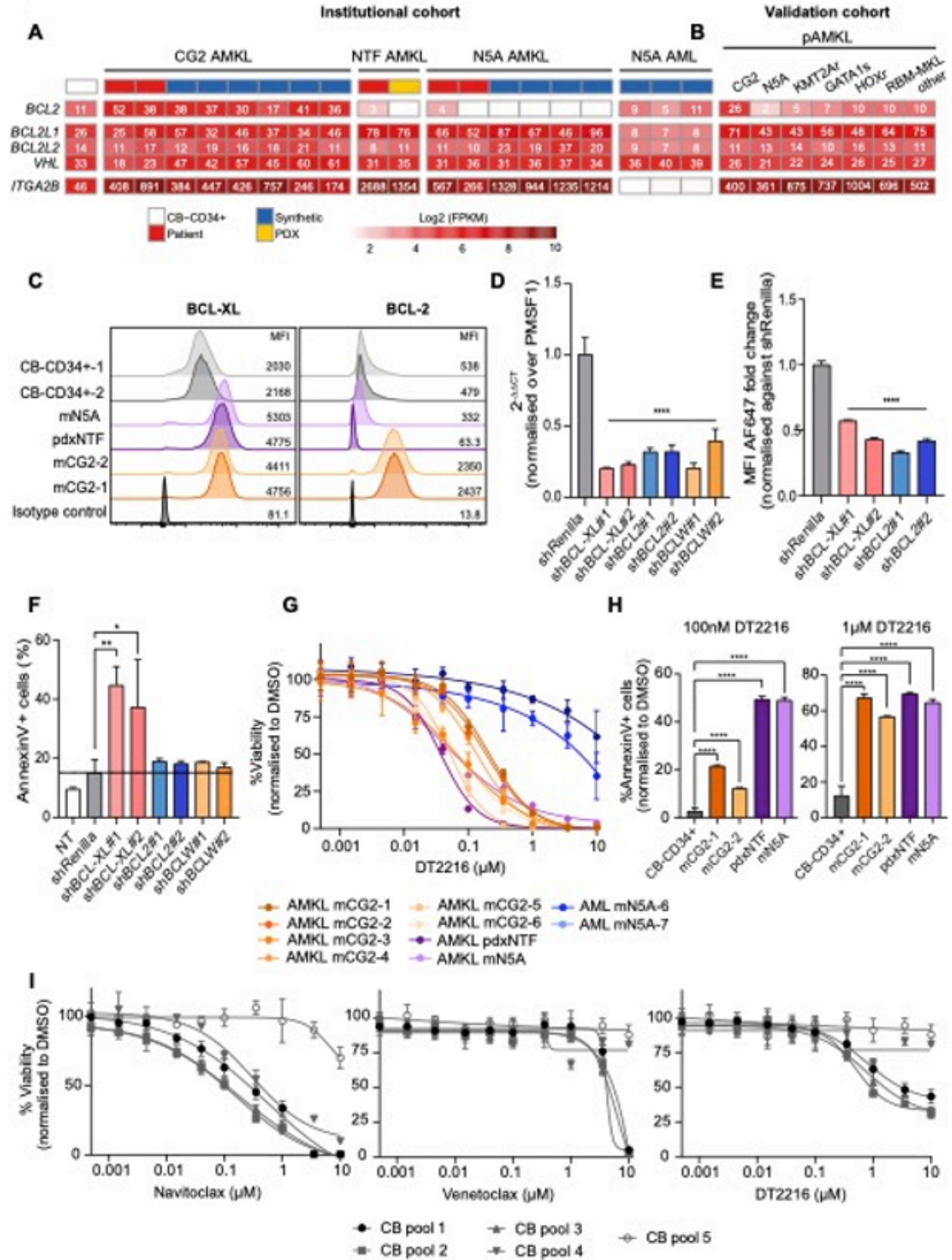
4.2.4.1 Combinatorial use of Navitoclax or DT2216 with cytarabine has potent anti-AMKL activity in vivo.

Cytarabine is a standard of care (SOC) component of chemotherapy induction and intensification cycles for AML patients. In this context, combinatorial treatment with BCL-X_L inhibitors and cytarabine was tested in CG2 AMKL. First, all CG2 models showed sensitivity towards cytarabine *in vitro* with IC50s ranging from 1 to 7nM (Fig.7A, Table S13). To assess the *in vivo* anti-leukemia activity of either Navitoclax or DT2216 combined with cytarabine, NSG mice were xenografted with mCG2-1 and treated with low-dose cytarabine (20mg/kg) for 5 consecutive days alongside Navitoclax or DT2216 (Fig.7B, Suppl.Fig.S21A). Engraftment was verified for all groups before treatment by bleeding 3 weeks post-transplant (Suppl.Fig.21B-C). At endpoint, mice treated with the combination of cytarabine and Navitoclax showed significantly lower leukemic infiltration in blood, BM and spleen as compared to single agent alone or vehicle control mice (Fig.7C). In monotherapy, Navitoclax or cytarabine performed equivalently in terms of leukemic burden reduction (Fig7C). The same *in vivo* response was observed following combinatorial treatment with DT2216 and cytarabine (Suppl.Fig.21D). Of note, although Navitoclax shows a steeper reduction of leukemic burden as a single agent in comparison to DT2216, treatment of either Navitoclax or DT2216 combined with cytarabine was equally effective against CG2 AMKL (Fig.7E, Suppl.Fig.21F). These results highlight the translational potential of combining SOC cytarabine with BCL-X_L inhibitors in the treatment of high-fatality pediatric AMKL.

(Figure on the next page)

Figure 4-5 – AMKL xenografts depend on pro-survival protein BCL-XL for survival.

A) RNAseq expression values (log₂(FPKM)) of selected genes implicated in intrinsic apoptosis pathway in model and patient leukemias from our institutional dataset. **B)** Cross-validation of gene expression in a large and published dataset of pediatric acute megakaryoblastic leukemia¹⁴⁸. **C)** Protein levels of BCL-X_L (left panel) and BCL2 (right panel) in AMKL xenograft cells or normal CB-CD34⁺ cells assessed by intracellular flow cytometry. **D)** Apoptosis, assessed by Annexin V staining and flow cytometry, **E)** relative gene expression detected by qRT-PCR, and **F)** pro-survival protein levels quantified by flow cytometry, following shRNA-mediated knockdown (KD) of pro-survival BCL2-proteins (BCL-X_L, BCL2 and BCL-W) in CG2 xenografts (72h post-infection, 2 selected shRNA per gene). Samples were compared to non-transduced (NT) or cells infected with control shRNA against Renilla (shRenilla). See Suppl. Fig. S18 for KD studies in mCG2-2 cells. **G)** Dose response curves and IC50 values were determined after incubation of AMKL or AML xenografts with DT2216 (BCL-X_L PROTAC) or DMSO for 6d, followed by viability readout with Cell-Titer Glo. Viability readout was normalised against DMSO for each sample. **H)** Amount of apoptosis assessed by Annexin V staining and flow cytometry in AMKL xenografts or normal CB-CD34⁺ cells after 72h of incubation with DT2216 at 100nM or 1µM in comparison to cells treated with DMSO. CB-CD34⁺, cord blood CD34⁺ cells; CG2, CBFA2T3::GLIS2; PDX, patient-derived xenograft; NTF, NUP98::BPTF; N5A, NUP98::KDM5A; KMT2Ar, KMT2A rearranged; HOXr, HOX rearrangGATA1s, GATA1 truncation; RBM-MKL, RBM15::MKL1. P-values: * <0.05, ** <0.005, *** <0.0001. MFI, mean fluorescence intensity.



4.2.1 Discussion

We bring forward six human models of CG2 AMKL that can sustain serial transplantation and phenocopy the clinical features, expression signature, genomic landscape, cellular ontogeny and high LIC frequencies of the disease. Progress in the field is hampered by limited patient samples currently available for preclinical testing, a restricted pool of representative cell lines and human models. Synthetic CG2 models contribute to map functional dependencies, capture the cellular and molecular heterogeneity of the leukemia, maturation block, concomitant genetic alterations and surface marker expression. They represent faithful and scalable biomasses for biochemical studies, such as proteomics, to uncover new CG2 biomarkers that are either mega-erythroid lineage specific (CD151, PECAM1), distinct from normal CB progenitors (JAG1) or most predictive of the CG2 AMKL genotype (NCAM1, PCDH10, PCDH19), which can contribute to optimise flow cytometry antibody panels for CG2 AMKL diagnosis or MRD tracking.

Cell- and genotype-specific therapies are needed for pediatric AMKL to improve patient survival. Our models of CG2 highlight pro-survival factor BCL-X_L as a novel therapeutic target of high-fatality AMKL. *In vitro* pharmacological inhibition of BCL-X_L with Navitoclax or DT2216 induces apoptosis in all CG2 AMKL models, accompanied by mitochondrial dysfunction. This was recapitulated by genetic knockdown of BCL-X_L but not BCL2 or BCL-W, suggesting that CG2 AMKL depend preferentially on BCL-X_L to resist apoptosis. Similarly, NUP98r AMKL cells (n=3) were also sensitive to Navitoclax or DT2216 treatment, while genotype-matched monocytic AML were resistant, pointing to a lineage-specific dependency. Indeed, pro-survival factor dependencies are cell context-specific, with the megakaryocytic lineage relying predominantly on BCL-X_L^{432,445,446} for proper maturation.

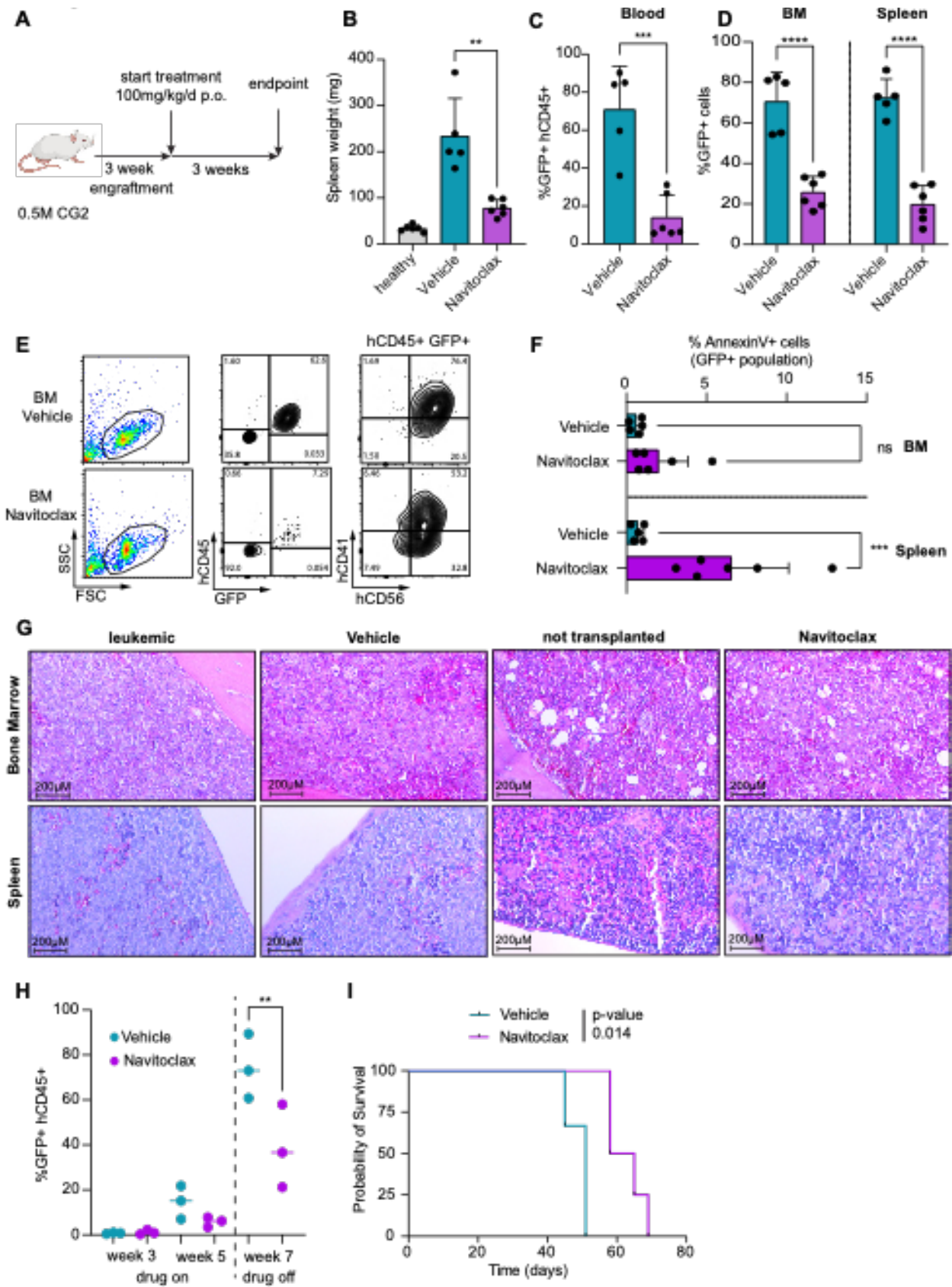


Figure 4-6 – CBFA2T3::GLIS2 AMKL is impaired by Navitoclax and DT2216 treatment *in vivo*.

A) Workflow of experimental procedures to assess the *in vivo* activity of Navitoclax or DT2216 in CBFA2T3::GLS2 (mCG2-1) AMKL xenografts. At day of sacrifice B) spleen weights C) percentage of leukemic blasts in peripheral blood (%GFP+hCD45+) and D) infiltration of the bone marrow (BM) and spleen (%GFP+ cells) was assessed in transplanted mice after treatment with either vehicle only (n=5) or Navitoclax (n=6) for 3 weeks. For comparison, spleen weights of non-transplanted mice (n=6) were recorded for B). E) Hematoxylin-eosin stained (HE) longitudinal sections of tibia and spleen collected from mice at day of sacrifice. Conditions were either transplanted with CG2 but not treated (leukemic), transplanted and treated with vehicle only (Vehicle), not transplanted and not treated age-matched littermates of treatment groups (not transplanted) or transplanted and Navitoclax treated mice (Navitoclax). F) Leukemic burden (%GFP hCD45+) was monitored during treatment in the blood of vehicle and Navitoclax-treated mice. G) Kaplan-Meier survival curves of mCG2-1 transplanted mice treated either with vehicle or Navitoclax. Log-rank Mantel-Cox test was used to determine survival benefit. H) Leukemic burden (GFP+hCD45+) was monitored by bleeding in mCG2-1 vehicle-treated mice versus DT2216-treated ones. I) Kaplan-Meier survival curves of mCG2-1 AMKL model treated either with vehicle or DT2216. Survival benefit was determined with Log-rank Mantel-Cox test. P-values: * <0.05, ** < 0.005, *** < 0.001, **** < 0.0001.

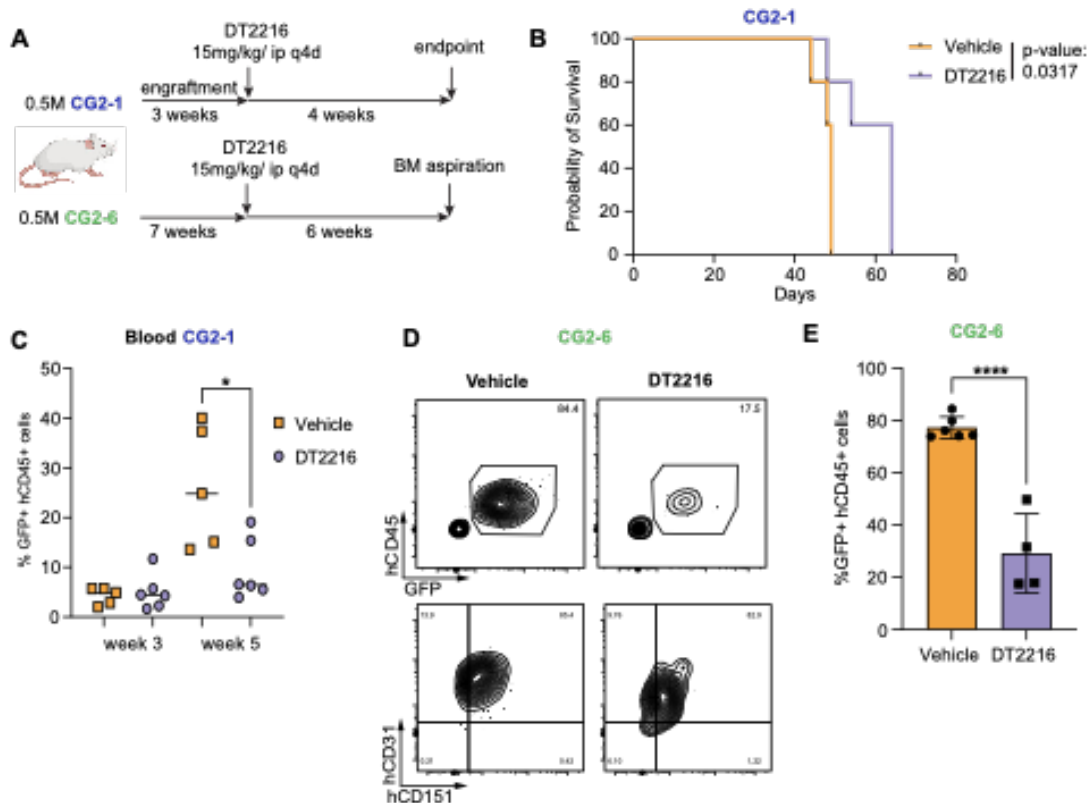


Figure 4-7 – Combinatorial use of BCL-X_L inhibitors and cytarabine demonstrates greater reduction of leukemic burden *in vivo* as compared to single agent treatment.

A) Dose-response curves and half maximal inhibitory concentrations (IC₅₀, Table S13) determined for all six samples of CG2 AMKL, submitted to a viability assay in presence of cytarabine. (Cell-Titer Glo, 6-day incubation, 4 replicates). Viability readout was normalised to DMSO controls for each sample. B) Schematic overview of experimental design of combinatory treatments of xenotransplanted mice with Navitoclax and cytarabine (AraC). C) Percentage of leukemic blasts in peripheral blood (%GFP+hCD45+, left graph), infiltration of bone marrow (BM, middle graph) and spleen (right graph) was assessed in transplanted mice after 3 weeks of indicated treatments. D) Percentage infiltration (%GFP+hCD45+) in the bone marrow of xenotransplanted and treated mice was compared at endpoint between matched Vehicle controls and mice either treated with DT2216 or Navitoclax, E) as well as their respective combinations with cytarabine (AraC).

Importantly, following *in vivo* treatment with either Navitoclax or DT2216, we note a reduction in tumor burden and a survival benefit of leukemic mice, using three CG2 models (mCG2-1, 2 and 6) and a PDX of NUP98r AMKL, the two highest fatality AMKL subgroups. The mCG2-6 model resides in a distinct mega-erythroid differentiation space (CD41^{low}CD31+CD151+), reflecting the cellular heterogeneity of CG2 AMKL, yet demonstrates a common BCL-X_L dependency across this cellular context. Our findings are aligned with a recent publication reporting that adult leukemia of the mega-erythrocytic lineage are sensitive to BCL-X_L-specific inhibitor A-1331852, including the HEL erythrocytic line *in vivo*⁴³⁶.

Expression of BCL2 on its own is not considered a predictor of drug response to Venetoclax⁴⁴⁷ and may explain the relative resistance of CG2 leukemic cells to BCL2 inhibition, as suggested by our work and others^{448,449}. An important finding, since Venetoclax (potent BCL2 inhibitor) is gaining unprecedented momentum for leukemia treatment^{424,425}, including in children. Given that CG2 cells do express higher baseline BCL2 levels than NUP98r AMKL and normal MEP-MKP, combinatorial strategies that trigger apoptosis such as cytotoxic or targeted chemotherapy, in addition to BCL2 inhibition, may ultimately induce apoptosis in CG2 cells that express BCL2, as recently suggested with either azacytidine⁴⁵⁰ or MCL inhibitor S63845⁴⁴⁸.

Moving forward, our work demonstrates that combining BCL-X_L inhibitors (Navitoclax or DT2216) and low-dose cytarabine is more potent against AMKL *in vivo* than either single agent alone, with significant translational potential given the current use of Venetoclax and high dose cytarabine in the treatment of relapsed or refractory pediatric AML^{424,450,451}. However, thrombocytopenia is a dose-limiting toxicity of Navitoclax due to BCL-X_L inhibition in the megakaryocytic lineage⁴⁵². Platelets express BCL-X_L at higher levels than MEP-MKP (Suppl.Fig.S16), in line with the rapid drop in platelets observed in patients exposed to Navitoclax⁴⁵³. The BCL-X_L degrader DT2216, developed to mitigate the on-target thrombocytopenia of Navitoclax, interacts with the Von Hippel-Lindau E3 ligase which is weakly expressed in platelets. When gauging treatment toxicity on normal cells, we found that DT2216 was less toxic to CB-CD34+ cells as compared to Navitoclax, underscoring the translational potential of BCL-X_L degraders for treatment of hematological malignancies of the mega-erythrocytic lineages. Although monotherapy with Navitoclax may seem slightly more effective than DT2216 against AMKL *in vivo* (Fig.7D), the DT2216 intermittent

dosing scheme can be further optimised in future studies, and importantly, both agents are equally effective in combination with cytarabine. Altogether, these preclinical studies suggest that integration of selective and potent BCL-X_L inhibitors to existing treatment regimens may improve disease eradication in pediatric AMKL.

4.2.2 Acknowledgements

Hematology-Oncology Team of CHU Sainte-Justine for their outstanding support; the members of the BCLQ and the Hematology-Oncology Division of CHU Sainte-Justine for their contribution to the biobanking initiative; Élie Haddad, Kathie Béland and the members of the humanized mouse core facility (CHU Sainte-Justine); Ines Boufaied of the flow cytometry facility (CHU Sainte-Justine) for cell sorting; Virginie Saillour, Charles Privé and René Allard of the Integrated Centre for pediatric clinical genomics at CHU Sainte-Justine for WES and scRNAseq studies; France Léveillé, Frédérique Tihy, Géraldine Mathonnet and Emmanuelle Lemyre of the Medical Genetics Service at CHU Sainte-Justine for CGH analysis; Elke Küster-Schöck of the microscopy facility at CHU Sainte-Justine; Raphaëlle Lambert from the Genomics Core Facility (Institute of Research in Immunology and Cancer, IRIC) for RT-qPCR and RNAseq analysis; Simon Mathien and Jean Duchaine from the High Throughput Screening Core Facility (IRIC) for dose-response experiments; Marianne Issac from the Histology Platform (IRIC) for processing of histological samples; Carolina Marmolejo, Anne-Cécile Soufflet, Emma Rose Cheetham, Nadia Emely Chauca Torres and Françoise Couture for their help with experiments; Sami Ayachi for bioinformatic analysis; Keith Humphries, Donald B. Kohn and Connie Eaves for providing lentiviral vectors; Michael A. Lieberman for offering the CHRF-288-11 cell line.

This study was supported by seminal Cole Foundation Transition Awards (S. Cellot and V.P.L.), Terry Fox Research Institute (TFRI) New Investigator grants, a Canadian Cancer Society Research Institute (CCSRI)/Cole Foundation Impact grant (S. Cellot and B.T.W.), an operating grant from the Leukemia and Lymphoma Society of Canada (S. Cellot), an operating grant from the Richard and Edith Strauss Foundation (S. Cellot and B.T. W.), an operating grant from the Canadian Institutes of Health Research (S. Cellot and H.B.; FRN 178326), funding from the CHU Sainte-Justine Foundation (Fonds d'Innovation Thérapeutique), the Charles-Bruneau Foundation (operating grants), and the Canada Foundation for Innovation (John R. Evans Leaders Fund) (S. Cellot). This

research work was made possible thanks to the financial support of the Oncopole, which receives funding from Merck Canada Inc., the Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS), Génome Québec, the Cancer Research Society and IRiCoR (B.T.W., F.B., S. Cellot). V.P.L. is supported by a FRQS Junior 1 Clinical Research Scholarship and by the CHU Sainte-Justine and Charles-Bruneau Foundations. S. Cellot is recipient of a Clinician scientist senior award from the FRQS. V.G., M.R., N.E.H., B.K. and L.T. are recipients of Cole Foundation fellowships. NEH is supported by a post-doctoral Institut de valorisation des données (IVADO) scholarship. The Quebec Leukemia Cell Bank is supported by the Cancer Research Network of the FRQS. The humanized mouse core and the flow cytometry facilities at CHU Sainte-Justine are supported by the Charles-Bruneau Foundation.

4.2.3 Authorship contributions

V.G. and M.R. designed and performed the experiments, analyzed the data, generated the figures and wrote the manuscript. M.B. and S. Cardin led projects, performed experiments, analysed data and wrote the manuscript. L.B., L.L. and F.F. assisted with experiments and data collection. N.E.H. performed bioinformatic analysis, generated figures and wrote the manuscript. A.R., E.A., P.G., L.J., S.J. performed bioinformatic analysis. V.L. and A.F. performed and analysed scRNAseq analysis and wrote the manuscript. V.P.L. supervised bioinformatics and single cell experiments and analyses, and wrote the manuscript. L.T., L.A. and P.P.R. performed and analysed the cell surface proteomic experiments. E.B. performed mass spectrometry analysis. B.P. and S.M.S. performed nanopore genome sequencing and bioinformatic analysis under the supervision of M.A.S. T.A.G. shared the AMKL validation cohort dataset. T.H.T., M.D., H.B., P. Teira, V.P.L. and S. Cellot were in charge of patients and contributed to the biobanking. J.H. supervised the biobanking of patient specimens at the BCLQ. J.C., G.S., F.B., B.T.W., P. Thibault, H.B. provided guidance in designing the experiments and analyses. S. Cellot conceived the experiments, supervised the biobanking of patient specimens at the BCLQ, and wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

4.2.4 Disclosure of conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

4.3 Supplemental material

4.3.1 Supplemental methods

4.3.1.1 Patient samples

Five pediatric samples of AMKL (genotypes: n=2 *NUP98::KDM5A*, N5A; n=1 *NUP98::BPTF*, NTF, and n=1 *CBFA2T3::GLIS2*, CG2) were previously described¹ and detailed in Table S1 together with an additional patient sample of CG2. Primary specimens were collected after project approval from the Research Ethics Boards of Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Sainte-Justine and receiving informed consent from the patients, in agreement with the Declaration of Helsinki. Biobanking was overseen by the Quebec Leukemia Cell Bank (BCLQ, Montréal, Canada).

4.3.1.2 Cell lines

M07e cell line² (ACC 104) was purchased from DSMZ (Germany) and maintained in RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Wisent) and 10 ng/ml recombinant interleukin-3 (IL-3, Gibco). CHR-288-11 cell line was a kind gift from Michael A. Lieberman (University of Cincinnati, Cincinnati, OH)³. CHR-288-11 and ML2 (ACC15, DSMZ, Germany) cells were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS. Low passage (< 20) cell lines were used throughout this study. HEK293 were cultured in DMEM media supplemented with 10% FBS.

4.3.1.3 Lentiviral vectors

4.3.1.3.1 Fusion gene vector

CG2 chimeric cDNA was cloned from M07e total RNA by RT-PCR using the Revert Aid H minus first strand cDNA synthesis kit (Invitrogen) combined with *GLIS2* 5'UTR specific primers (oSC-206, 269, 287) (GRCh38.p13, *CBFA2T3* NM_005187 exons 1-11 coding for amino acids 1 to 554, 1662bp fuse to *GLIS2* NM_001318918 exons 5-8 coding for amino acids 116 to 524, 822 bp). *CBFA2T3::GLIS2* fusion cDNA was amplified in 2 PCR reactions with fragments overlapping at the fusion point (Table S2). N-terminal FLAG Tag-sequence and recombination sites were added to MNDU lentiviral expression vector (generously provided by Keith Humphries, BC Cancer Agency, Vancouver, BC, Canada and Donald B. Kohn, UCLA, Los Angeles, CA)^{4,5} by PCR (Table S2) prior to recombination with the fusion fragments using the GeneArt Seamless Cloning and Assembly Kit (Invitrogen). The integrity of the MNDU expression vector was confirmed by Sanger sequencing.

4.3.1.3.2 ShRNA-mediated knock-down

The following vectors were used for shRNA-mediated knockdown: MNDU-GFP-miRE and the MNDU-GFP-miRE-shRenilla⁶. The GFP cassette of the MNDU-GFP-miRE vector was replaced with a PCR amplified mCherry reporter. Sequences for sh97-mer miR template oligos were taken from Fellmann et al.⁷ and are listed in Table S2. The miRE-shRenilla from MNDU-GFP-miRE-shRenilla was subcloned into MNDU-mCHERRY-miRE vector using XhoI and EcoRI restriction sites. Integrity of all the constructs were confirmed by sequencing.

4.3.1.3.3 Luciferase Vector for bioluminescent model generation

MNDU-Luciferase-PGK-mAmetrine was obtained by subcloning luciferase from MNDU-PGK-luciferase-2A-GFP (Connie Eaves, BC Cancer Agency, Vancouver, BC, Canada) into MNDU-PGK-GFP. The GFP sequence was replaced with mAmetrine from pCCL-c-MNDU3-X2-PGK-Ametrine (Connie Eaves, BC Cancer Agency, Vancouver, BC, Canada).

4.3.1.4 Lentiviral transduction

4.3.1.4.1 Transfection of lentiviral plasmids

Lentiviral particles were produced in HEK293T by transfection of lentiviral vector carrying either the CG2 fusion or shRNAs targeting candidate genes, as described above, together with packaging and VSV-G envelope plasmids using Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's protocol (Thermo Fisher Scientific). Viral supernatant was harvested 48h after transfection, filtered and concentrated with PEG-it Virus Precipitation solution (Systems Bioscience) following the manufacturer's protocol.

4.3.1.4.2 Human CD34⁺ hematopoietic stem/progenitor cell isolation, culture and transduction

Umbilical cord blood (CB) units were collected with maternal consent and provided by Héma-Québec public cord blood bank (Montréal, Canada). The protocol was approved by the Research Ethics Board of CHU Sainte-Justine (approval number 3453). Isolation, culture and transduction of human CD34⁺ cells were performed as described¹ using EasySep CD34 positive selection Kit (StemCell technologies). On the day of the experiment, lentiviral particles carrying the CG2 fusion

or an empty vector were bound to RetroNectin (Takara Bio USA, Inc.) in a precoated 96 well plate by centrifugation following the manufacturer's protocol. CD34+ cells from a pool of 6 thawed CB units were transduced overnight (~50,000 cells per well, 10 wells per condition) with a multiplicity of infection (MOI) of 50 in optimised expansion media^{8,9} supplemented with 1ug/ml polybrene (MilliporeSigma). Unsorted transduced CD34+ cells were washed the next day, each independent sample was split for same day xenotransplantation (2/3 of wells, 1 well/mouse) and gene transfer assessment by flow cytometry (1/3 of wells, percentage of GFP+) 8 days after transduction.

4.3.1.4.3 Transduction for shRNA-mediated knock-down

CG2 cells were transduced for 16h with lentiviral particles carrying shRNA targeting either *BCL2*, *BCL2L1*, *BCL2L2* or Renilla luciferase as a negative control. Gene-transfer rates (percentage of mCherry+ cells) as well as cells for RNA, apoptosis assay by AnnexinV and intracellular flow cytometry staining were collected 72h after infection.

4.3.1.4.4 Transduction for Luciferase model generation

Leukemic bone marrow cells harvested from primary recipient mice mCG2-1, mCG2-2 and pdxNTF were transduced overnight with lentiviral particles carrying a dual reporter vector encoding Firefly Luciferase and Ametrine chromophore genes (as described above) in AML media (see *in vitro* pharmacological inhibition assays section below) supplemented with polybrene. After transduction, cells were washed and kept in culture 48 hours prior to gene transfer estimation and xenotransplantation.

4.3.1.5 Xenotransplantation

All mouse experimental procedures were performed in accordance with the Canadian Council of Animal Care and with approval from the CHU Sainte-Justine Research ethics boards and Animal Institutional ethics committee (approval number: MP-21-2017-1566). Xenotransplantation of primary samples were performed on 7- to 10-week-old NOD-*scid* IL2Rg^{null} (NSG) mice originally obtained from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA) and bred in-house. Cells were injected via tail-vein within 6 to 24 hours following whole-body sub-lethal X-ray irradiation (2.1Gy, CP 160 irradiator, Faxitron X-Ray corporation, USA). CD34+ cells transduced with CG2 or empty lentiviral vector were transplanted at approximate doses of 35,000 cells/mouse. Harvested bone marrow

and splenic cells from primary leukemic mice were serially transplanted at doses of $0.5-1.0 \times 10^6$ cells per mouse for biomass expansion. For drug studies, age-matched littermates were used and randomly distributed into treatment groups after transplant.

4.3.1.6 Estimation of leukemia initiating cell (LIC) frequency

LIC frequency was estimated by limiting dilution assay, with experimental group design and analysis performed using the ELDA software from the Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research software (<http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda/index.html>). Cell doses ranging from 1×10^6 to 2.5×10^2 cells/100 μ l phosphate buffered solution (PBS) were prepared by serial dilutions and transplanted intravenously into sublethally-irradiated (2,1Gy) NSG mice. Animals were euthanized when showing either severe signs of acute leukemia (pallor, lethargy and splenomegaly), hindlimb paralysis or after 6 months post-transplantation. Engraftment was validated after sacrifice and harvest of bone-marrow and spleen cells by immunostaining and analysis by flow cytometry (details see Table S6).

4.3.1.7 NUP98 rearranged AMKL models

Generation and expansion of synthetic *NUP98::KDM5A* and patient-derived *NUP98::BPTF* AMKL models were performed as described previously¹.

4.3.1.7.1 In vivo bioluminescence imaging of leukemia progression

For analysis of the mCG2-2 or pdxNTF leukemia engraftment and tumor progression in mice, cells carrying Luciferase were xenotransplanted in NSG mice, as described above. Cell engraftment and disease progression was followed by bioluminescence image acquisition every 1 to 2 weeks post-transplant using an *in vivo* imaging system (Labeo technologies Inc.) with a cooled charge-coupled device camera HNü 512 EMCCD from Nüvü. At each time-point, D-luciferin (Xenolight™ D-Luciferin Potassium Salt, 150 mg/kg body weight; PerkinElmer) was injected intraperitoneally and mice were anesthetised with 2% isoflurane followed by image acquisition 12-15 minutes post-injection (100 images, acquisition 500ms, gain 2000-3000). Images were analysed with ImageJ, mean signal intensities were recorded in regions of interest that were kept constant between mice and converted for quantification into number of photons per second per cm² per steradian for each sample.

4.3.1.8 Flow cytometry

4.3.1.8.1 Immunophenotyping and antibodies.

Cell surface protein detection for leukemia characterization was performed as previously described¹. An exhaustive list of antibodies used is provided in Table S3.

4.3.1.8.2 Apoptosis assay.

Apoptosis was investigated with APC Annexin V Apoptosis Detection Kit (Biolegend). In brief, cells were collected after 72h of drug treatment with indicated drug concentrations or DMSO, and incubated for 15 minutes with AnnexinV-APC and PI according to the manufacturer's protocol. For cells transduced with lentiviral vectors carrying mCherry, PI was replaced with DAPI at a final concentration of 0.5µg/ml. vectors carrying mCherry, PI was replaced with DAPI at a final concentration of 0.5µg/ml.

4.3.1.8.3 MitoSOX™ Red.

Production of superoxide was analysed with MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator (ThermoFisher Scientific). Cells were collected in 5ml FACS tubes after 72h of drug exposure with indicated compounds. DMSO treated cells were used as negative controls and cells treated with 1µM of Staurosporine as positive controls for induction of apoptosis. Cells were stained with 5µM MitoSox dye and incubated for 20 minutes at 37°C in the dark. Following, cells were washed in pre-warmed PBS and acquired by flow cytometry.

4.3.1.8.4 Mitochondrial Membrane Potential Assay.

Loss of mitochondrial potential was measured with tetramethylrhodamine ethyl ester perchlorate (TMRE) provided in the Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit (II, Cell Signaling). Cells were treated with indicated drugs for 72h in optimised culture conditions. DMSO treated cells were used as negative controls and cells treated with either 1µM of Staurosporine for 72h or carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) at a final concentration of 5µM (15 minutes incubation) as positive controls. TMRE was added for a final concentration of 1µM and incubated for 30 minutes at 37°C in the dark. Subsequently, cells were washed in PBS and acquired by flow cytometry.

4.3.1.8.5 Intracellular flow cytometry of BCL proteins.

For detection of BCL proteins, cells were fixed and permeabilized with BD Cytofix/Cytoperm™ Kit (BD Bioscience) according to the manufacturer's protocol, followed by a blocking step with 5% BSA for 15 minutes at 4°C. Cells were incubated with antibodies against BCL-2, BCL-XL or Isotype controls (Table S3) for 1h at 4°C in the dark with subsequent FACS acquisition.

4.3.1.8.6 Sample acquisition and analysis.

Cells were analysed by flow cytometry either on the FACSCanto II (BD Bioscience) for the MitoSOX assay or on a LSRFortessa (BD Bioscience) with subsequent data analysis with FlowJo v.10.8.1 (BD Bioscience).

4.3.1.9 Histopathology and microscopy

Organs were fixed in 10% neutral buffered formalin and sent to the Histology Core Facility at the Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC) for further processing. In brief, formalin-fixed femurs were decalcified prior to embedding in paraffin. Paraffin embedded samples were cut into 4µm slices and stained either with hematoxylin phloxin saffron (HPS) or hematoxylin eosin (HE). Cytospin preparations of bone marrow and spleen cells were stained by Giemsa according to standard staining procedures. Imaging of cytopins, touch preps and bone marrow sections was performed with a DM6 upright microscope (Leica Microsystems) equipped with a 100x objective and a color camera, at the Platform for Imaging by Microscopy of CHU Sainte-Justine. Images from *in vivo* drug treatment studies were acquired with a Zeiss Axio.Scope.A1 microscope (Zeiss) with a 5x (0.15 A-Plan, Zeiss) and 63x objective (1.4 Plan-Apochromat, oil, Zeiss), equipped with a color camera (AxioCam 105 color, Zeiss) and operated with the Zen 2.6 blue edition software (Zeiss).

4.3.1.10 Molecular studies

4.3.1.10.1 RNA isolation and RT-PCR

Total RNA was isolated with TRIzol and Direct-zol RNA MiniPrep (Thermo Fisher Scientific and Zymo Research). For reverse transcription, 500ng of total RNA was used with the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Bioscience, Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's recommendation. Relative gene expression was determined by the Genomics

Platform at the Institute of Immunology and Cancer (IRIC), using assays designed with the Universal Probe Library (Roche) and TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific). For each qPCR assay, a standard curve was performed to ensure that the efficiency of the assay was between 90% and 110%. The list of utilised primers is presented in Table S2. The QuantStudio qPCR instrument (Thermo Fisher Scientific) was used to detect the amplification level. Relative expression comparison ($2^{-\Delta\Delta CT}$) was calculated with the Expression Suite software (Thermo Fisher Scientific), using *PSMF1* as endogenous control.

4.3.1.10.2 Digital droplet PCR

Expression levels of *CG2* fusion and endogenous wild type *CBFA2T3* were compared by digital droplet PCR (ddPCR) across *CG2* expressing patient (pCG2-1), mCG2-1 to 6 and M07e cell line, normal lineage-depleted human cord blood cells (CB-Lin-) and T21-AMKL CMK cell line. The ddPCR reaction mix was prepared using 1.5-3.5ng cDNA, the QX200 ddPCR EvaGreen Supermix (Bio-Rad: 1864034) and primer pairs described in Table S2. Droplets were generated with a QX200 droplet generator using the Droplet Generation Oil for Evagreen (Bio-Rad: 1864005), according to the manufacturer recommendations. PCR was performed in a 96-well plate ((ddPCR protocol: (95°C-5min) (95°C-30 sec, 58°C-1min, 72°C-30sec)x50 (4°C-5min, 90°C-5min, 12°C-Inf)), and droplets were analysed with a QX200 droplet reader. Absolute quantification analysis (copy/ul) was done using the QX Manager Software V1.2 Standard Edition (Bio-Rad). *CG2* and wild type *CBFA2T3* expression values were normalized to *PSMF1*. The experiment was run in technical duplicates.

4.3.1.10.3 RNA sequencing and bioinformatic analysis

Samples used for RNA sequencing are listed in Table S4. Library preparation, sequencing, and data processing were performed at the Institute for Research in Immunology and Cancer's Genomics Platform (Montréal, Canada). Libraries were prepared using KAPA Stranded mRNA-Seq Kit and sequencing was performed on the Illumina Nextseq500 with 150 cycles paired-end runs (maximum 2 x 80nt). Sequences were trimmed to remove sequencing adapters and low quality 3' bases using Trimmomatic¹⁰ version 0.35 and then aligned to the reference human genome version GRCh38 (gene annotation from Gencode version 26) using STAR version 2.5.1b¹¹. Gene expression was estimated directly from STAR mapping as readcount values as well as computed using RSEM

version 1.2.28¹² in order to obtain transcript level expression and Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped fragments (FPKM), using a stranded RNA protocol. Sequences were also analyzed using FusionCatcher¹³ in order to identify potential gene fusions.

4.3.1.10.4 Differential expression analysis

All differential expression analyses (DEG) were performed using FPKM values, due to data availability, with the limma pipeline and empirical Bayes moderated t-statistics¹⁴. An offset of 1 was added to the FPKM values prior to log₂ transformation and lowly expressed genes were removed. Both validation (St. Jude, first setting)¹⁵ and institutional (CHUSJ, second setting) cohorts were analyzed separately. In the first setting, gene expression profiling from all AMKL samples with the CG2 fusion transcript were contrasted to all other AMKL samples. In the second setting, all AMKL samples with the CG2 fusion transcript were contrasted to AMKL samples involving *NUP98::KDM5A* fusion gene and human CB-CD34+ cells. To account for heterogeneity in the DEG analysis, an equal-weighted average was assigned to CB-CD34+ cells and NUP98 fusion-induced gene expression. A gene was considered significantly regulated if its (absolute log) fold-change is equal or higher than 1 and corresponding adjusted (False Discovery Rate or FDR) p-value <0.05. Significant up and down-regulated genes, driven by the CG2 fusion, that overlap in the two AMKL cohorts constituted the common signature (Table S7).

4.3.1.10.5 Visualization

The two gene expression datasets (institutional and validation cohort) were combined and quantile-normalized prior to use in a scaled heatmap. Heatmaps, principal component analysis, correlation and enrichment plots were visualized using ggplot2 and custom scripts in R programming language. Other heatmaps were visualized using pheatmap (version 1.0.12).

4.3.1.10.6 Cell surface proteomics

Cryopreserved splenic cells from serially transplanted synthetic models of AMKL (mCG2-1, mCG2-2, mN5A) and *NUP98::BPTF* AMKL patient-derived xenograft models (pdxNTF) were thawed and cultivated overnight. Human CD34+ cells were isolated from 11 independent cord blood units and cultivated for 4 days in optimized culture conditions. Those samples were processed alongside low passage M07e and CHR-288-11 cell lines for cell surface protein analysis by biotinylation of

primary amines and streptavidin pull down, as previously described¹⁶. Protein extracts were analysed in triplicates by LC-MS. Protein identification and quantification was performed by PEAKS X pro without alignment. Filters, normalisation, imputation and differential analysis was performed using the DEP R package (versions 1.10.0)¹⁷. DEP was configured to include proteins detected with a minimum of two unique peptides and a threshold of 9 missing values per conditions in order to retain all detected proteins in downstream analysis. Imputation of missing values was implemented using the *min* method to replace missing values by the lowest value in the dataset. P-values from DEP were adjusted according to Benjamini & Hochberg method (<https://www.jstor.org/stable/2346101>). Identification of surface proteins was done manually by querying multiple databases and literature.

4.3.1.10.7 Single cell RNA sequencing

Live single cell suspensions were processed on the Chromium Controller according to the manufacturer's protocol aiming at a capture of 8,000 cells per sample. Sequencing libraries were generated as per the manufacturer's instructions and sequenced on a NovaSeq S6000 aiming at 20,000 reads per cell. Fastq files were aligned to the genome and reads counted using Cell Ranger V3. Count matrices were analysed using Seurat V4. Droplets expressing less than 200 genes were considered empty droplets and discarded. From the remaining cells, we removed those whose percentage of mitochondrial reads was more than 2 standard deviations above the mean mitochondrial percentage of a sample's cells. Reads were log-normalized with a scaling factor of 10,000, principal component analysis was performed using the 2,000 most variable genes and data was embedded in two dimensions using Uniform Manifold Approximation and Projection computed on the first 30 principal components. We further removed, from each sample, clusters of empty droplets that had low RNA counts and did not express genes associated with a specific cell type. A summary of QC metrics is provided in Suppl. Fig. S14A. After filtering, PCA, and two-dimensions embedding was repeated. Cell type classification was performed using Seurat's Categorical data transfer method using the Human Cell Atlas dataset¹⁸ as reference. We obtained this annotated dataset using Bioconductor's ExperimentHub web resource with the HCADData 1.10.0 R package. We restricted the analysis to a maximum of 3,000 cells per cell type using random subsampling to avoid the overrepresentation of abundant cell types. Data exploration

revealed a strong batch effect of sample BM3 which was removed from the dataset resulting in a dataset of 48,503 cells. For lineage analysis, we combined the cell types into 5 cell lineages: HSC / myeloid progenitors ("CD34+ HSC", "CD34+ HSC-cycle", "CD34+ MultiLin", "CD34+ Gran", "CD34+ MDP 1", "CD34+ MDP 2", "CD34+ Eo/B/Mast"), Erythro ("CD34+ ERP-Early", "CD34+ ERP", "Early-Erythroblast", "Erythroblast"), Mega ("CD34+ MEP", "Platelet", "CD34+ MKP"), Lympho ("CD34+ CLP", "CD34+ LMPP", "Pro-B", "NK cells", "Follicular B cell", "CD34+ pre-PC", "CD8 T-cell", "CD34+ pre-T", "CD34+ pre-B cycling", "Naive T-cell", "CD34+ Lymphoid UNK", "CD34+ pre-B", "Plasma Cell"), and Myeloid ("Eosinophil", "Neutrophil", "Granulocytic-UNK", "Immature-Neutrophil", "Monocyte", "Stromal", "Dendritic", "Pre-Dendritic"). AML single-cell data was downloaded from Gene Expression Omnibus (accession GSE116256)¹⁹ and processed identically to the AMKL samples, including cell type classification. Differential gene expression analysis was performed using a Wilcoxon Rank Sum test, limiting the analysis to the genes showing a log₂FC between groups of at least 0.1 and expressed in at least 3 cells. Co-embedding of the GC2 cells with the normal BM cells was performed using RPCA-defined integration anchors.

4.3.1.10.8 Genomic DNA isolation

Genomic DNA was isolated with DNAzol (ThermoFisher Scientific) or Allprep DNA/RNA extraction kit (Qiagen), according to the manufacturer instructions.

4.3.1.10.9 Nanopore sequencing

Genomic DNA (gDNA) of mCG2 models (model 1, 2, 5 and 6) was sequenced using the Oxford Nanopore Technologies (ONT) platform. Libraries were prepared using ONT SQK-LSK110 kit (ONT, Oxford, United Kingdom) following the manufacturer's protocol with an input of 1.5 to 3µg of gDNA per sample. Sequencing was performed on FLO-PRO002 (R9.4.1) flow cells using a PromethION (P24) sequencer (ONT, Oxford, United Kingdom). Fast5 reads were basecalled with Guppy (version 6.3.8) in super high accuracy mode (SUP) producing fastqs which were then aligned to a hybrid reference of Ghrc38 with the construct as a separate chromosome using minimap2 with default parameters (version 2.23). Sam alignment files were then converted to bam files using SAMtools²⁰ (version 1.3.1). The integration sites of the MNDU-CBFA2T3::GLIS2-PGK-GFP construct were determined by manual review of supplementary alignments to our

construct. Bam files were explored using the Integrative Genomics Viewer (IGV)²¹ at the selected insertion sites.

4.3.1.10.10 Whole-exome sequencing (WES) and bioinformatic analysis

Samples used for exome sequencing are listed in Table S4. Library preparation, sequencing, and data processing were performed at the CHU Sainte-Justine Integrated Centre for pediatric clinical genomics (Montréal, Canada). Libraries were prepared using SureSelect Low Input CRE (Agilent) kit and sequencing was performed on the Illumina NovaSeq6000 with paired-end runs (maximum 2 x 100nt) on 4 separate lanes. Each sample was equally divided between lanes. Sequences were aligned to the reference human genome version GRCh38 using bwa-mem version 0.7.15 or higher (Li H. 2013) using the following command, to generate bam files separately for all samples and lanes:

```
bwa-mem -t 8 -M -R '@RG\tID:1\tLB:${LB field }\tPL:ILLUMINA\tPU:undefined\tSM:${sample}' $reference $fastq1 $fastq2'
```

Lane-level bam files merging for each sample and marking of duplicates was performed using Picard Tools version 2.10.7 or higher. Base calibration and indel realignment were performed on bam files using GATK analysis toolkit version 3.8 with default parameters²², with template from dbsnp version 151²³. Mean depth of coverage was determined with Qualimap²⁴ version 2.2.2 and SAMtools²⁰ version 1.16.

Germline and somatic variant calling were performed using GATK best practices version 3.8²². For germline variants, HaplotypeCaller was run separately for each sample with default commands using standard annotation, then output vcf files were combined in gvcf for cohort-level re-genotyping with *CombineGVCFs* and *GenotypeGVCFs* commands, respectively. For somatic variants, Mutect2 was run on AML-generating samples in tumor-only mode and using *af-only-gnomad.hg38* as a germline resource from the gatk bundle. Variants calls were then filtered using *FilterMutectCalls* commands with default parameters. Variants were annotated for functional impact and cross-referenced to known databases (Cosmic, Clinvar, gnomAD) using Variant Effect Predictor (VEP). Then, annotated vcf files were filtered and prioritized using an in-house filtering pipeline in R. Only variants in leukemia-associated genes, with population frequencies in gnomad

<0.05, with a predicted functional impact (missense, splicing of loss-of-function variants) and with a VAF \geq 10% were kept (See Table S8 for gene list).

4.3.1.10.11 CNA analysis using Sequenza

Tumor ploidy and copy number were estimated from samples with paired tumor-normal whole-exome sequencing by Sequenza²⁵. All analyses were run in python v3.6 and segmentation files were generated for further investigation of copy number aberrations in models of CG2.

4.3.1.10.12 Array-based comparative genomic hybridization

Array-based comparative genomic hybridization (aCGH) analyses were conducted with standard procedures by the Medical Genetics Service of CHU Sainte-Justine (Montréal, Canada).

4.3.1.11 *In vitro* pharmacological inhibition assays

All xenograft models of AML and AMKL were maintained in optimised serum-free media. CG2 cells were maintained in IMDM (Gibco) with 15% BIT9500 (StemCell Technologies), 20ng/ml recombinant human interleukin 3 (IL-3, Gibco), 20ng/ml recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF, Shenandoah Biotechnology Inc.), 50ng/ml recombinant human FMS-like tryptophan-kinase 3 ligand (FLT3-L, Shenandoah Biotechnology Inc.), 100ng/ml recombinant human Stem Cell Factor (SCF, Shenandoah Biotechnology Inc.), 50 μ g/ml Gentamicin (Gibco), 10 μ g/ml Ciprofloxacin (Sigma-Aldrich), 100nM 2- β -Mercaptoethanol (Sigma Aldrich), 500 nM Stemregenin⁹ (SR1, Cayman Chemical) (Cedarlane) and 750 nM UM729²⁶ (StemCell Technologies) for either 72h or 6d. NTF and N5A cells were maintained in the media described for CG2 with the addition of 50ng/ml recombinant human thrombopoietin (TPO, Biotechne) and 10 μ g/ml Low-density-lipoprotein (LDL, StemCell Technologies). CB-CD34+ cells were maintained in media described above under culture of human CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells.

4.3.1.11.1 Dose response curves.

Dose-response assays were performed by the High-Throughput Screening Core Facility from the Institute for Research in Immunology and Cancer (IRIC, Montréal, Canada). Curves were generated by seeding 2,000 to 5,000 cells in 384-well plates in quadruplicates and addition of either inhibitor (10 dilutions from 10 μ M to 1nM in 3-fold steps) or DMSO vehicle (0.1%). Read-

out was conducted after 6 days of incubation at 37°C and 5% CO₂ with CellTiter-Glo® Cell Viability Assay (Promega). Percentage of viability for each condition was calculated with the following formula: 100 x (mean luminescence of compound / mean luminescence of DMSO). Dose-response curves and half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) were determined in GraphPad Prism v9.1.2 by nonlinear regression analysis (four parameters).

4.3.1.12 *In vivo* drug studies

For *in vivo* drug studies, 6- to 8-week-old female NOD-scid IL2Rgnull (NSG) mice were sub-lethally irradiated (2.1Gy) and transplanted with 0.5M mCG2-1 cells, 0.1M mCG2-2, 0.5M mCG2-6 or 0.1M pdxNFTF cells, as described above. Leukemic engraftment was detected either by bleeding or *in vivo* imaging 3-7 weeks prior to drug treatment. Navitoclax (ABT-263) was dissolved in 30% SEEDs (self-emulsifying drug delivery; 15.9% PEG E 400 (Sigma Aldrich), 2.1% Capmul MCM (Abitec Corporation), 4% Cremophor EL (Sigma Aldrich), 8% Labrasol ALF (Gattefosse)) and 70% KCL-HCL buffer (pH 1.2) and administered by daily oral gavage at 100mg/kg²⁷. DT2216 was dissolved in 50% Phosal 50PG (LIPOID), 45% Miglyol 810N (Azelis Canada) and 5% Tween 80 (Sigma Aldrich), and administered by intraperitoneal (ip) injection every 4 days at 15mg/kg²⁸. For drug combination experiments, mice were treated with 20mg/kg of Cytarabine (AraC) dissolved in PBS by ip injection for 5 days together with either Navitoclax (100mg/kg, oral gavage) or DT2216 (15mg/kg, ip q4d), as described above. Control mice were treated with vehicle only. For endpoint experiments, mice were monitored daily for changes in body weight and sacrificed after completion of treatment, as indicated in the respective figures, or when vehicle group reached defined human endpoints, followed by standard necropsy procedures. For survival analysis, human endpoints were defined as one of the following: loss of 20% of initial body weight or rapid loss of body weight, worsening of general appearance (dehydration, hunched posture, paleness, sizable abdominal enlargement, lack of responsiveness) and hindleg paralysis. Organs for histopathology (tibia, 1/3 of spleen, liver, lung, kidney) were put in 10% formalin and prepared for histology as described above. Single cell suspensions were prepared from bones (femur, tibia and pelvic bones) as well as remaining spleen tissue in IMDM with 2% FBS (Seradigm). Isolated cells were characterised by flow cytometry and apoptosis assay by Annexin V/PI, as described above.

4.3.1.13 Statistical analysis

GraphPad Prism v9.1.2 (San Diego, CA, USA) was used for statistical analysis. P-values were determined either by two-tailed students t-test or one-way analysis of variance (ANOVA). P-values: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. Error bars represent SD.

4.3.2 Supplemental Figures

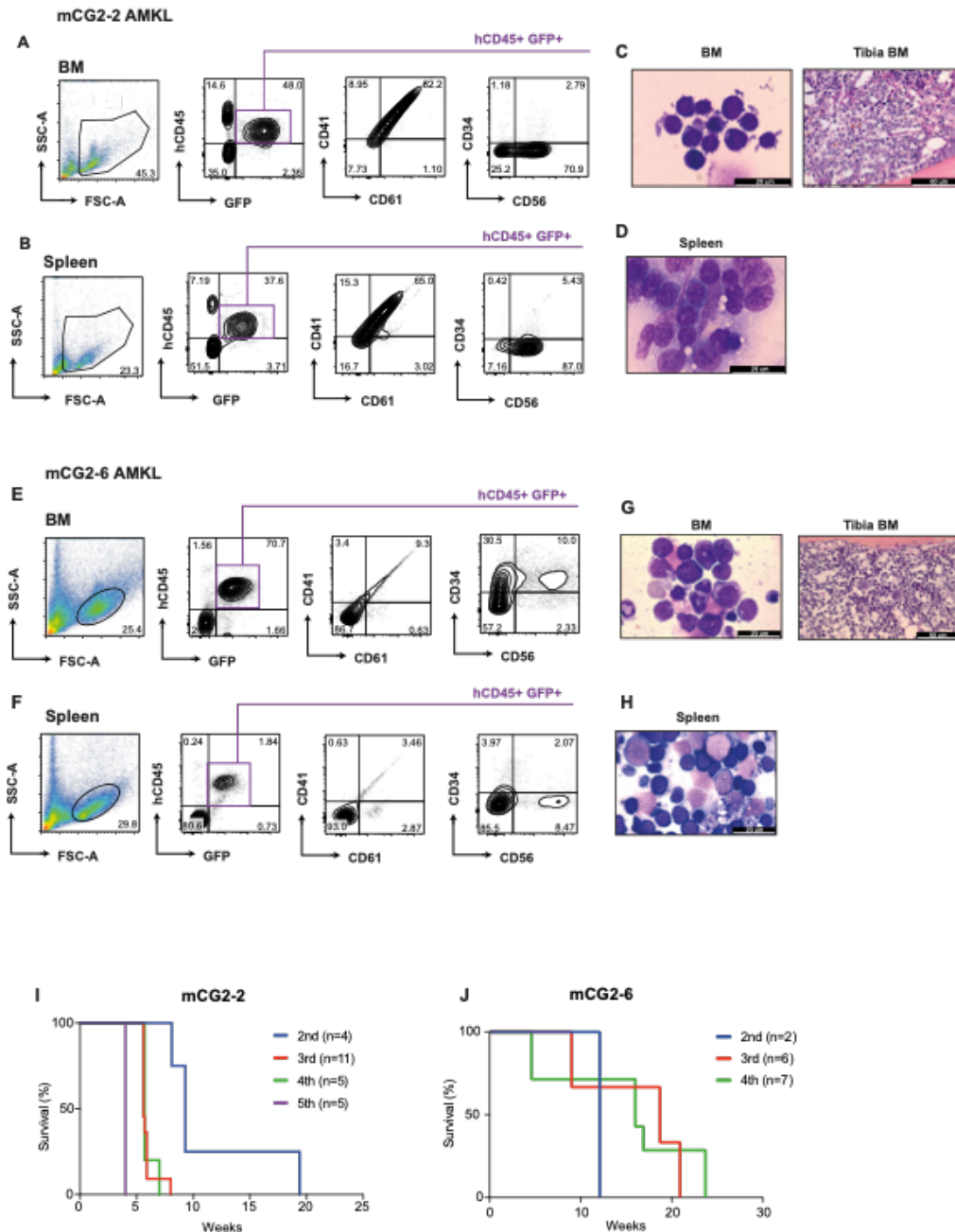


Figure 4-7 – Supplemental Figure S1. Phenotypic characteristics of recipient mice serially transplanted with mCG2-2 and mCG2-6 AMKL.

A) Flow cytometry profiles of bone marrow (BM) and B) spleen cells isolated from mCG2-2 primary recipient mouse (20.3 weeks post-transplantation). C) Giemsa-stained BM cytopsin (left) and hematoxylin-phloxine-saffron (HPS) stained section of tibia BM (right) as well as D) giemsa-stained spleen touch-preparation from mCG2-2 primary recipient mouse. E) Flow cytometry profiles of BM and F) spleen cells isolated from mCG2-6 primary recipient mouse (28.1 weeks post-transplantation). G) Giemsa-stained BM cytopsin and HPS stained section of tibia BM as well as H) giemsa-stained spleen touch-preparation from mCG2-6 primary recipient mouse. I-J) Survival curves of mCG2-2 and mCG2-6 serially transplanted recipients.

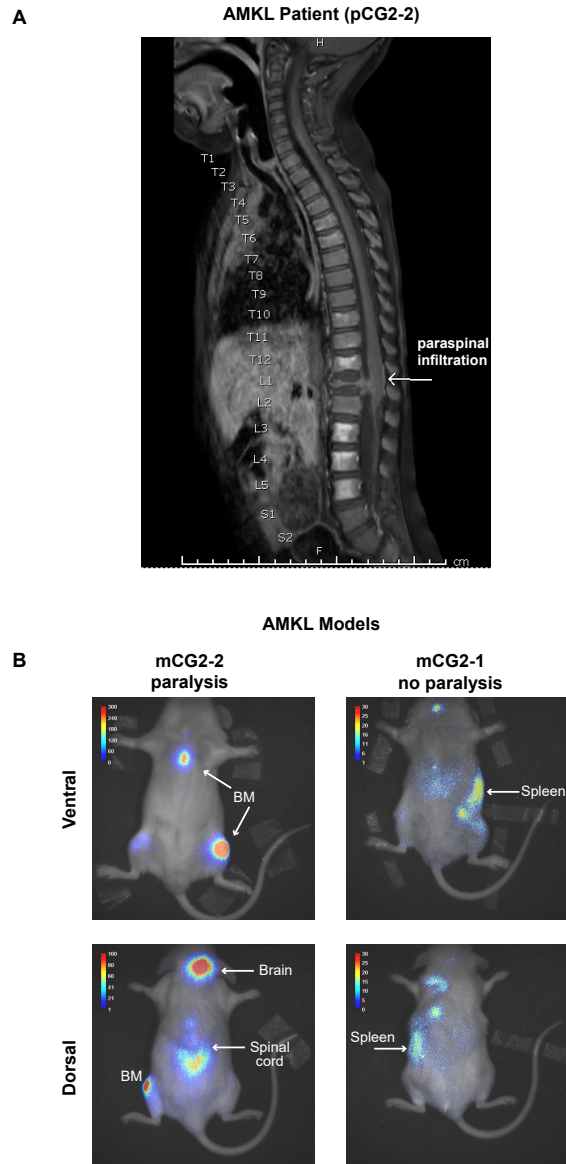


Figure 4-8 – Supplemental Figure S2. Extramedullary involvement in luciferase-expressing models of CBFA2T3::GLIS2 AMKL similar to patient disease.

A) MRI scan of a 2-year-old patient with de novo CG2 AMKL (pCG2-2) showing paraspinal infiltration. **B)** Mouse recipient of CG2-2 luciferase-xenograft model (left panel) shows leukemic infiltration of the bone marrow (BM) and central nervous system (brain and spinal cord) with concurrent hind limb paralysis symptom (tertiary recipient N71, 56 days after transplantation). Mouse recipient of CG2-1 luciferase-xenograft (right panel, tertiary recipient N855, imaged 63 days post-transplant) presents leukemic infiltration of the BM and spleen without central nervous system infiltration or signs of paralysis.

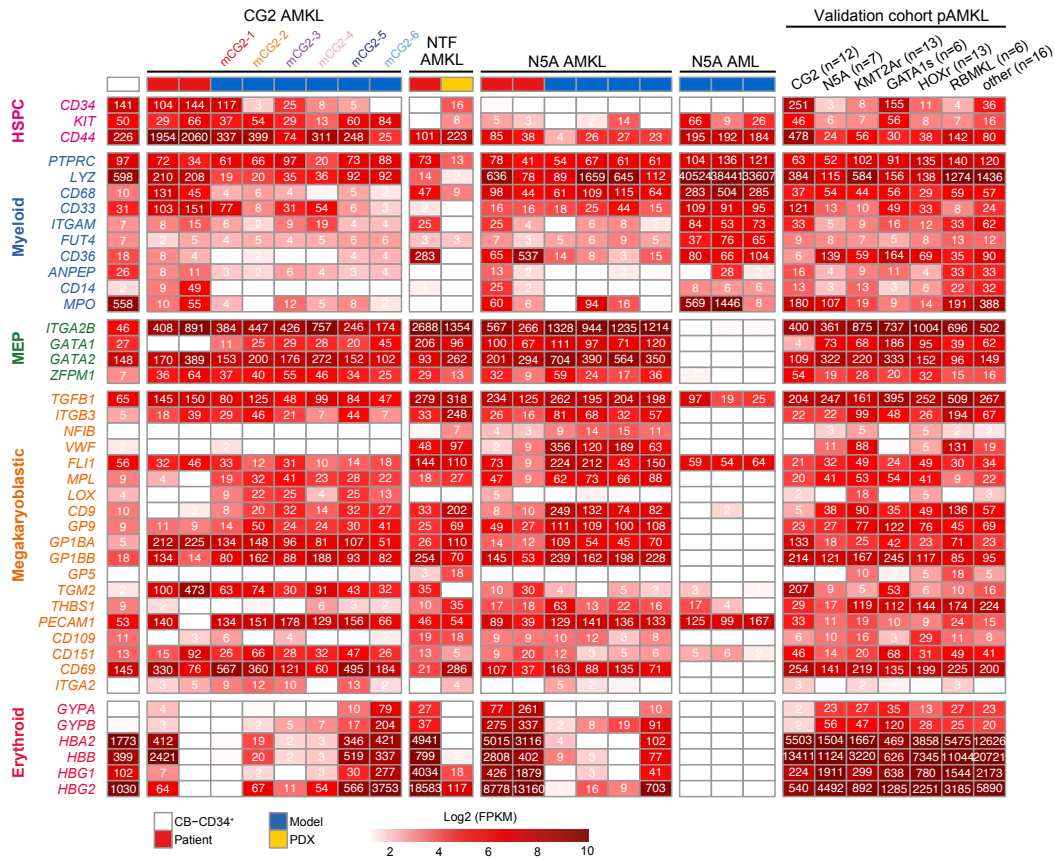


Figure 4-9 – Supplemental Figure S3. CBFA2T3::GLIS2 leukemic cells express megakaryocytic and erythroid lineage markers.

Heatmap depicting RNAseq gene expression (FPKM) of selected hematopoietic lineage markers in leukemic cells derived from CBFA2T3::GLIS2 (CG2) leukemia, as compared with normal cord blood cells (CB-CD34+, n=4), NUP98 rearranged AMKL (NUP98::BPTF, NTF; NUP98::KDM5A, N5A) and N5A AML from our institutional cohort. Gene expression in a validation cohort¹⁵ is represented as mean expression per indicated AMKL genotype (right panels). HSPC, hematopoietic stem and progenitor cells; MEP, mega-erythroid progenitors; PDX, patient-derived xenograft; *KMT2Ar* or *HOXr*, *KMT2A* or *HOX* rearranged; *GATA1s*, *GATA1* truncating-mutation; *RBMKL*, *RBM15::MKL1*.

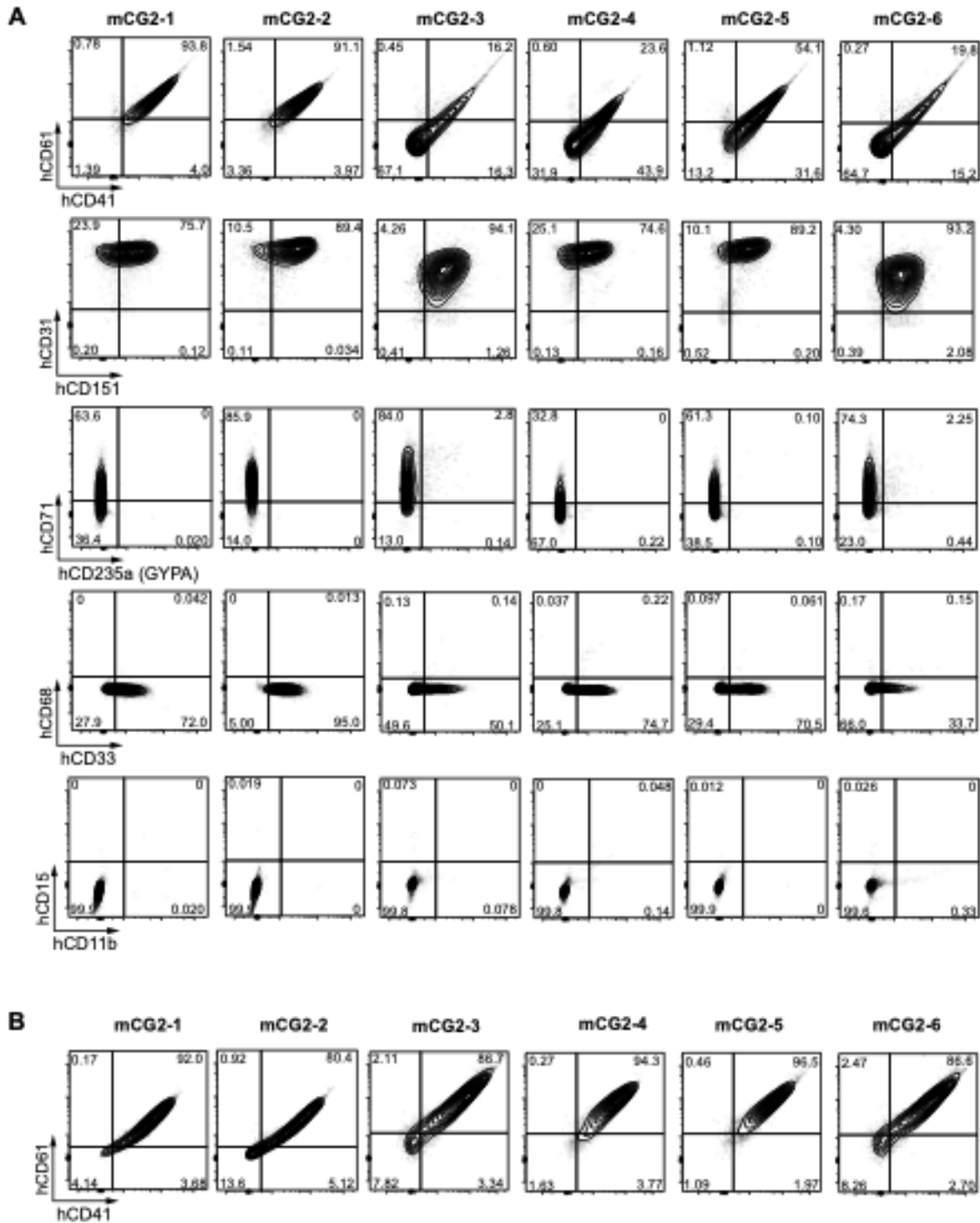


Figure 4-10 – Supplemental Figure S4. Synthetic models of CG2 lie immunophenotypically in the mega-erythroid space.

A) All six branches of CG2 models were profiled by flow cytometry. Depicted populations are gated on GFP+ cells. **B)** Synthetic models of AMKL were cultured for 6 days in optimised culture medium and surface marker expression was analysed by flow cytometry. Depicted populations are gated on GFP+ cells.

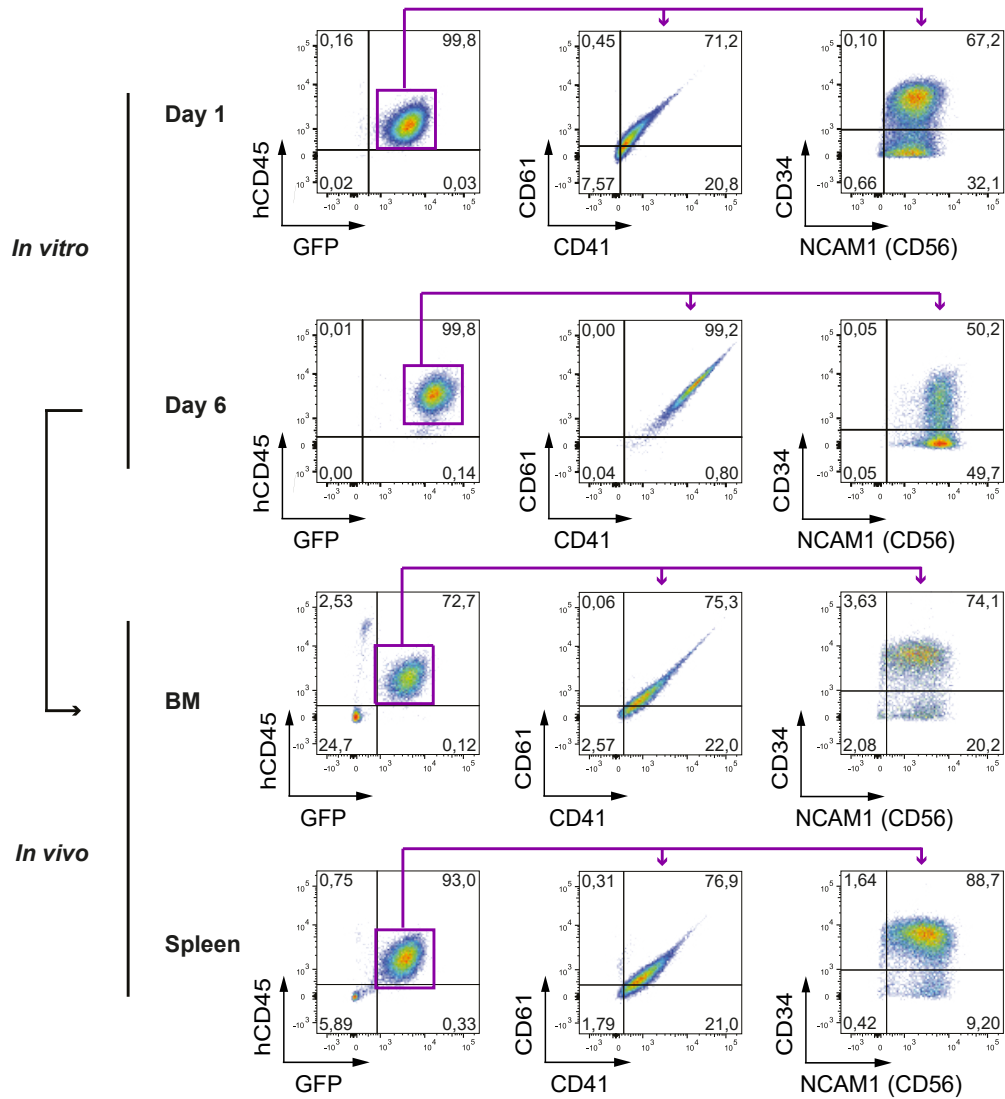
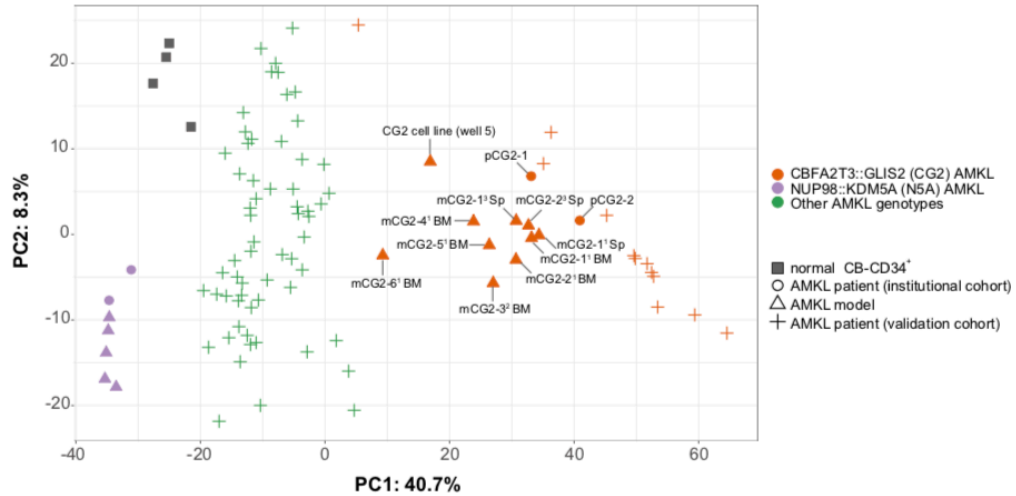


Figure 4-11 – Supplemental Figure S5. Maintenance of leukemic potential in optimized culture conditions.

Flow cytometry profiles showing maintenance of immunophenotypic features and leukemic potential in CBFA2T3::GLIS2 AMKL xenograft cells (mCG2-1) maintained for 6 days in optimized culture conditions prior to transplantation in NSG recipient mouse and after leukemic engraftment at the time of sacrifice in BM and Spleen (AMKL secondary recipient K423, 2.9×10^6 transplanted cells).

A



B

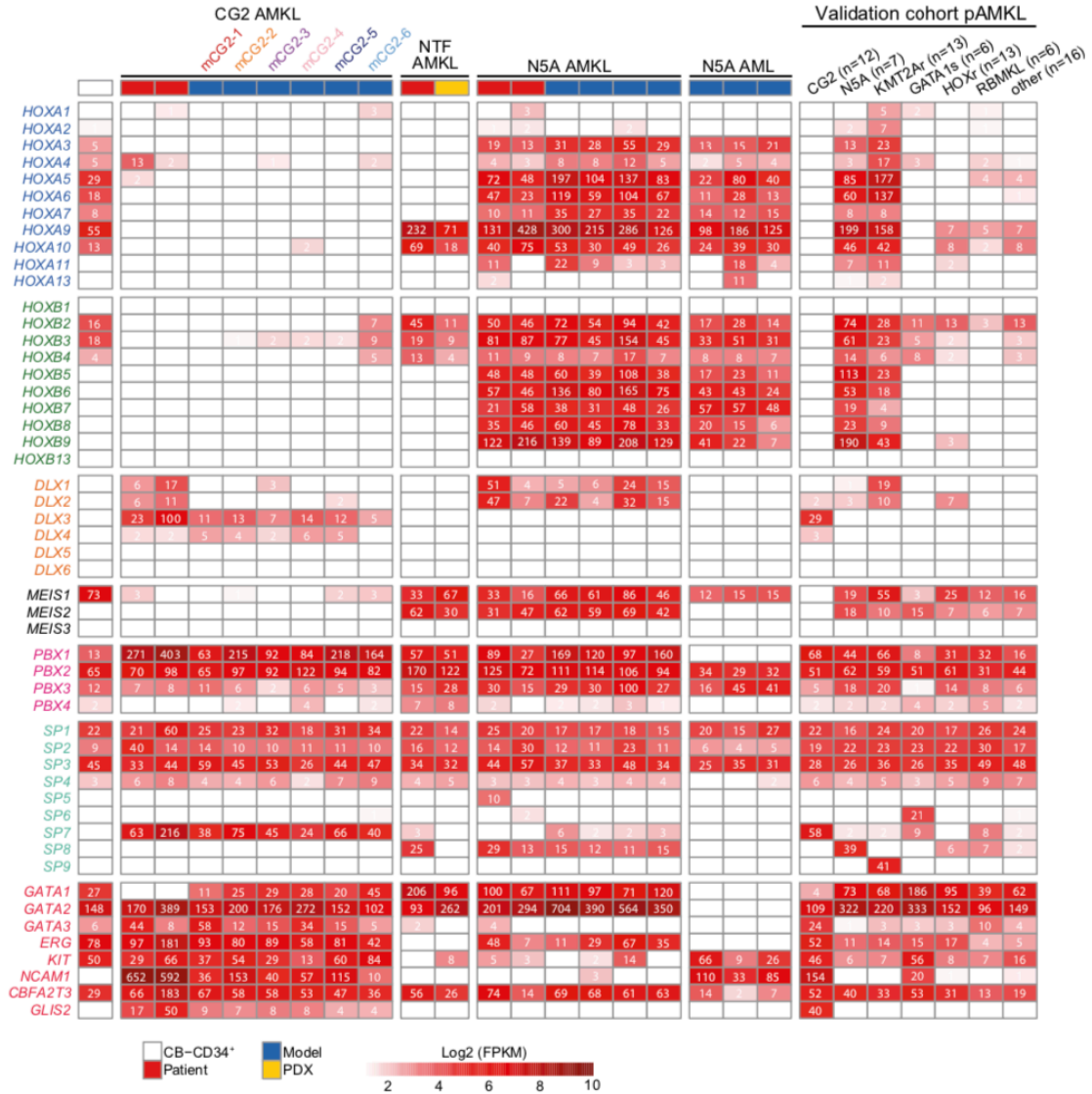


Figure 4-12 – Supplemental Figure S6. Transcriptomic profiling of CBFA2T3::GLIS2 models correlates with patient disease and defines non-HOXA/B and non-MEIS1/2 leukemia.

A) Principal component analysis plot of CBFA2T3::GLIS2 (CG2, orange), NUP98::KDM5A (N5A, purple) model (▲), patient-derived (●) leukemias, normal cord blood (CB)-CD34⁺ cells (gray, ■) and a published validation dataset of pediatric AMKL¹⁵ (green, +) calculated with the 729 differentially expressed genes associated with CG2 signature (common up/down genes described in Fig.2). **B)** Heatmaps illustrating RNAseq gene expression (FPKM) of selected transcription factors in leukemic cells derived from CG2 leukemia, as compared with normal CB-CD34⁺ cells (n=4), NUP98-rearranged AMKL (NUP98::BPTF, NTF; N5A) and N5A AML from our institutional cohort (left panels). Gene expression in a validation cohort is represented as mean expression per indicated AMKL genotype (right panel¹⁵). PDX, patient-derived xenograft; *KMT2Ar* or *HOXr*, *KMT2A* or *HOX* rearranged; *GATA1s*, *GATA1* truncating-mutation; *RBMKL*, *RBM15::MKL1*.

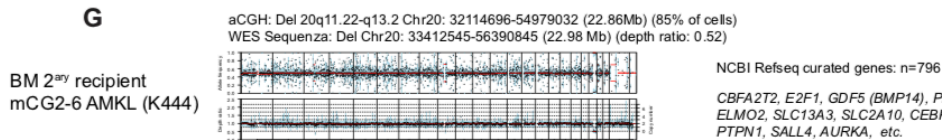
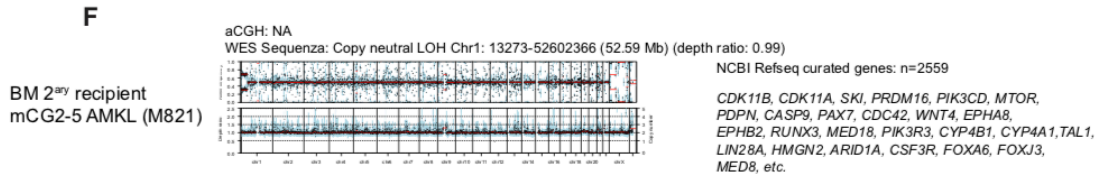
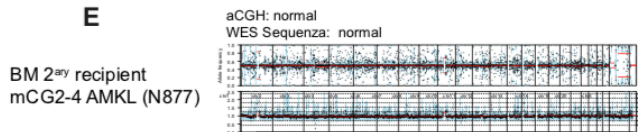
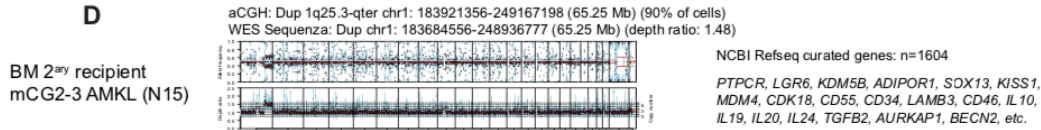
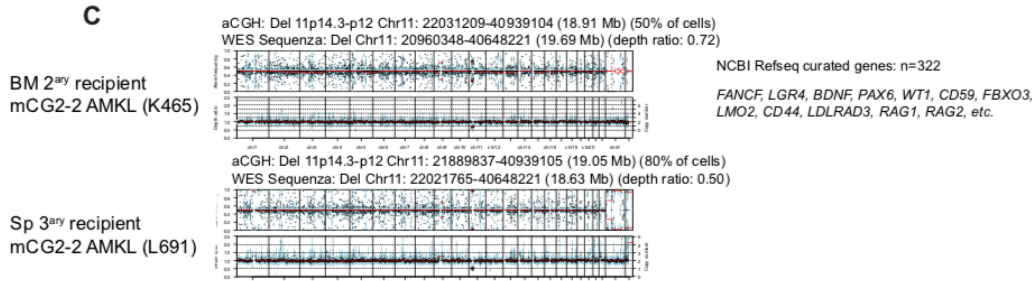
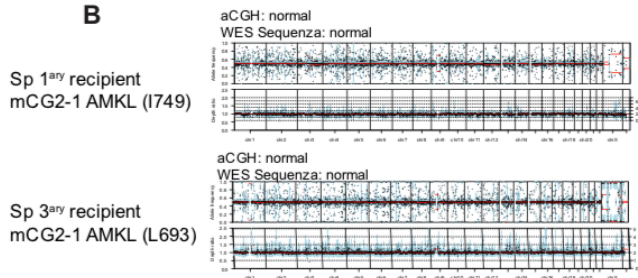
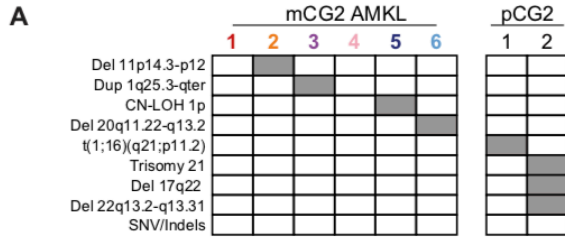


Figure 4-13 – Supplemental Figure S7. Copy number variations (CNVs) detected in CBFA2T3::GLIS2 leukemia models.

A) Genetic events detected in CG2 leukemia from models (mCG2) and patients (pCG2). Copy number variations (CNVs) identified by array-based comparative genomic hybridization (aCGH) and/or whole exome sequencing (WES). Single nucleotide variant (SNV)/indels assessed by WES analysis. Del, deletion; Dup, duplication; CN-LOH, copy neutral loss of heterozygosity. Trisomy 21 is a recurrent chromosomal anomaly in pediatric AMKL, including the CG2 genotype¹⁵. Partial duplication of chromosome 1q was observed in pediatric and adult AMKL, with or without association with Down syndrome^{15,29–31}. Deletions of chromosome 11p or 17q were identified in a few cases of pediatric AMKL¹⁵. Deletions of chromosome 11p³² or 20q^{33,34} are associated with myeloid malignancies or myelodysplastic syndromes in adult patients. Aside from Trisomy 21, other indicated CNVs have not previously been associated with the CG2 genotype. **B-G)** Summary of CNVs identified by aCGH and WES using genomic DNA extracted from CBFA2T3::GLIS2 models. Parental cord blood DNA was used as paired normal sample for the analyses. Left panels: Sequenza²⁵ representations of somatic CNVs identified by WES in CG2 xenograft DNA. Right panels: total number of genes and selected candidates involved in the indicated CNVs. GRCh37/hg19 and GRCh38/hg38 human genome reference builds were used for aCGH and WES, respectively. Sp, spleen; BM, bone marrow.

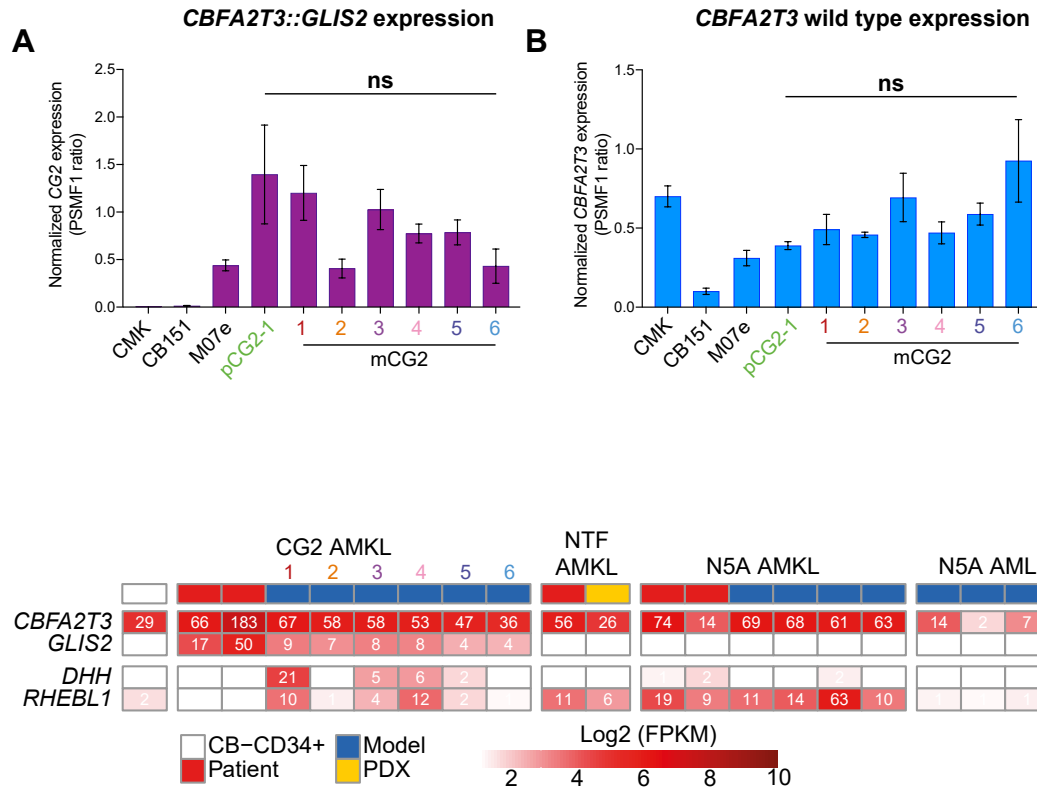


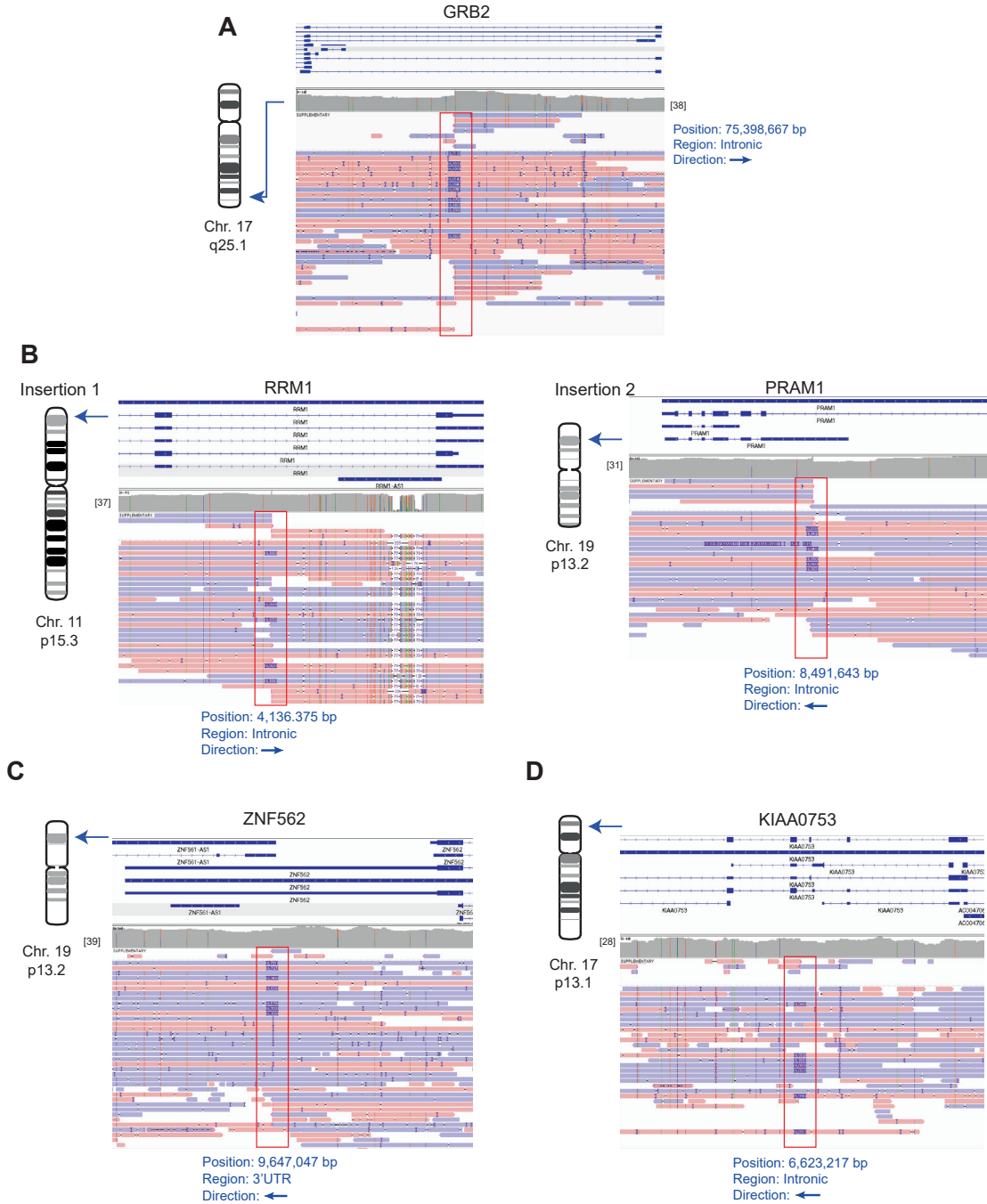
Figure 4-14 – Supplemental Figure S8. Expression of *CBFA2T3::GLIS2* (CG2) gene fusion in CG2 models.

Digital droplet (dd)PCR analysis of A) *CBFA2T3::GLIS2* gene fusion and B) wild type *CBFA2T3* in CG2-positive AMKL from patient (pCG2) and models (mCG2). CG2 and *CBFA2T3* expression (copy/ul) was normalized against PSMF1. CMK cell line and cord blood (CB)-CD34+ cells (CB151) are used as negative controls for CG2 expression. Depicted is the mean of duplicates. PCR primer sequences and amplicon lengths can be found in Table S2. C) Heatmap representing expression values (FPKM) for the fusion partner genes in leukemic cells and normal CD34+ cord blood cells (CB-CD34+, average of n=4) from our institutional dataset.

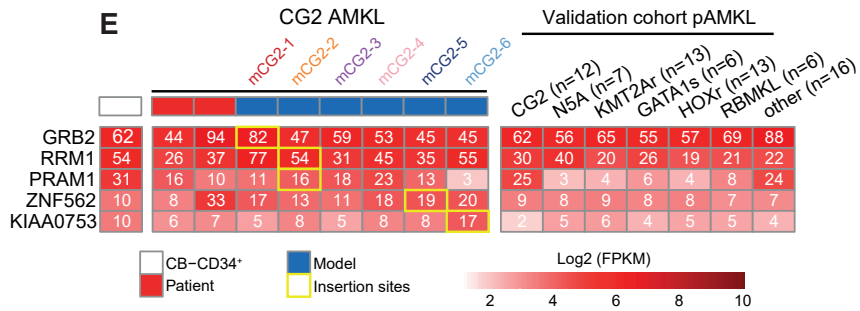
(Figure on the next page)

Figure 4-15 – Supplemental Figure S9. Lentiviral integration sites in models of *CBFA2T3::GLIS2* AMKL.

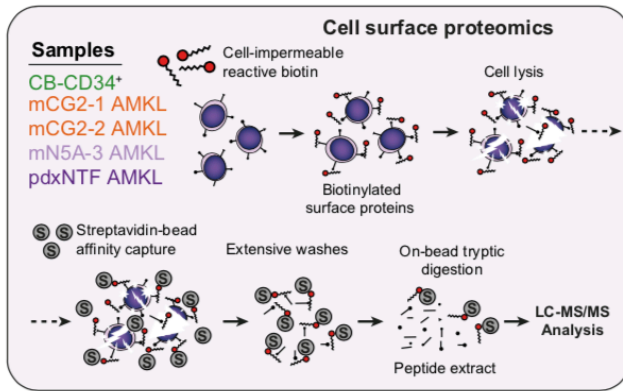
The integration sites of the MNDU-*CBFA2T3::GLIS2*-PGK-GFP lentiviral vector are shown for **A**) mCG2-1, **B**) mCG2-2 (two distinct insertion sites), **C**) mCG2-5 and **D**) mCG2-6. The chromosomal locus, official gene name, structural annotations (intron, exon and untranslated region (UTR)) and provirus orientation (directional arrow) are represented for each integration site. Sequencing reads are colored based on their strand complementarity (red: +, blue: -). Maximum sequencing depth for the region is presented between brackets next to the IGV depth track. **E**) Heatmap presenting the expression (RNAseq, FPKM) of the genes in which an insertion was found. Yellow squares highlight the expression of genes associated with integration sites in each model leukemia. Gene expression in a validation dataset¹⁵ is represented as mean expression per indicated AMKL genotype (right panel), as a comparison.



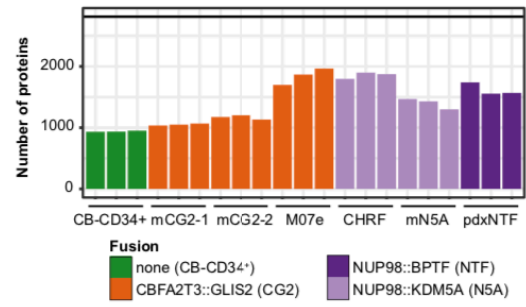
Indels ≤ 2 were not displayed



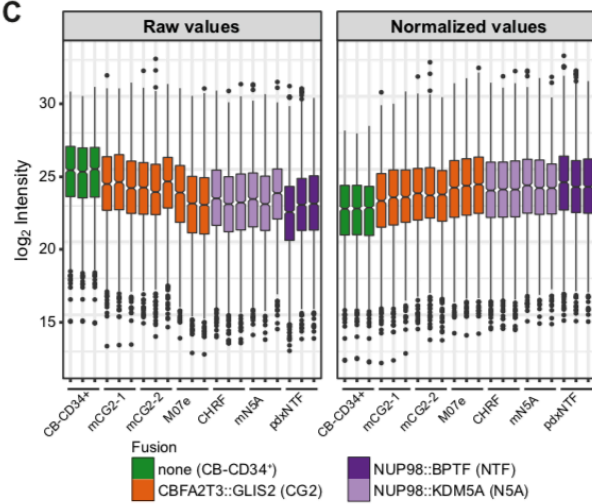
A



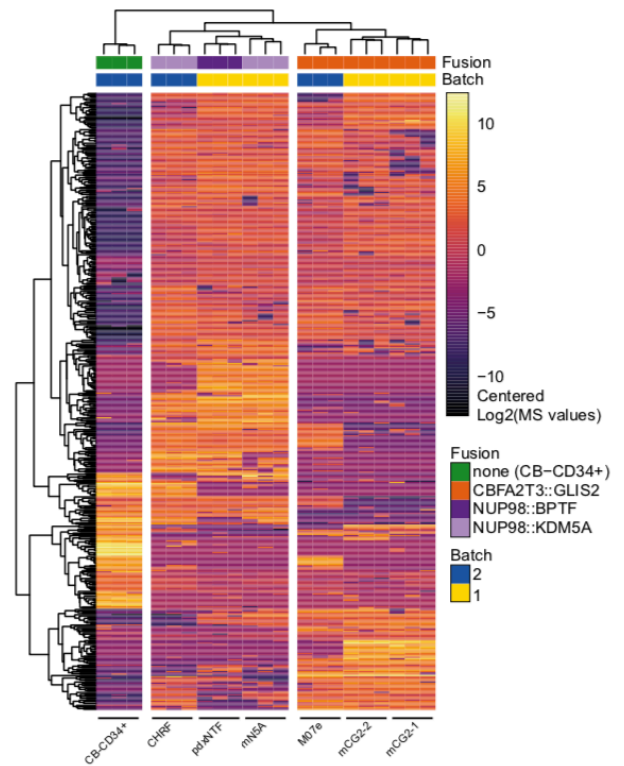
B



C



D



E

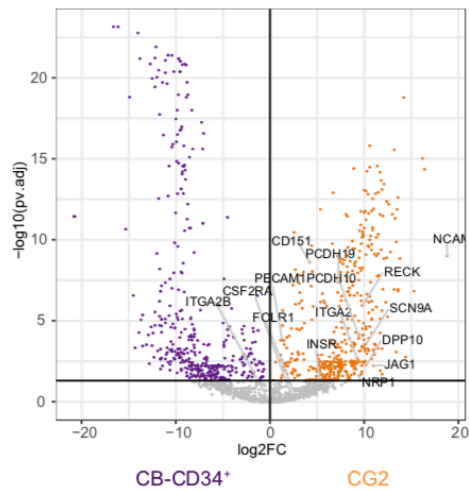


Figure 4-16 – Supplemental Figure S10. Cell surface proteomics of CBFA2T3::GLIS2 (CG2) and NUP98 rearranged (NUP98r) acute megakaryoblastic leukemia (AMKL) models.

A) Overview of the samples and methods used to perform cell surface proteomic analysis. Surface proteins were extracted from normal cord blood (CB)-CD34⁺ cells cultured for 4 days (pool of 11 CB units) and leukemic cells isolated from the spleen of recipient mice (n=2 CG2 and n=2 NUP98r AMKL models). AMKL models were analyzed by LC-MS in triplicates. **B)** Number of proteins identified for each sample with a minimum of 2 unique peptides detected. **C)** Distribution of signal intensity for each sample before and after variance stabilization normalisation (VSN). **D)** Heatmap showing significantly differentially expressed proteins between normal CB-CD34⁺ cells, CG2 models (mCG2), cell line (M07e) and NUP98r AMKL (pdxNTF, mN5A), as well as a cell line with a N5A fusion (CHRF, CHRF-288-11). Unsupervised clustering shows genotype-specific association and grouped technical replicates. Adjusted p-value < 0.01. CG2, CBFA2T3::GLIS2; N5A, NUP98::KDM5A; NTF, NUP98::BPTF; mAMKL, synthetic model of AMKL; pdx, patient-derived xenograft. **E)** Volcano plot presenting differentially expressed cell surface proteins between mCG2 (orange) and normal CB-CD34⁺ cells (purple) (Log₂(MS intensity) (Differentially expressed proteins: p-value < 0.05).

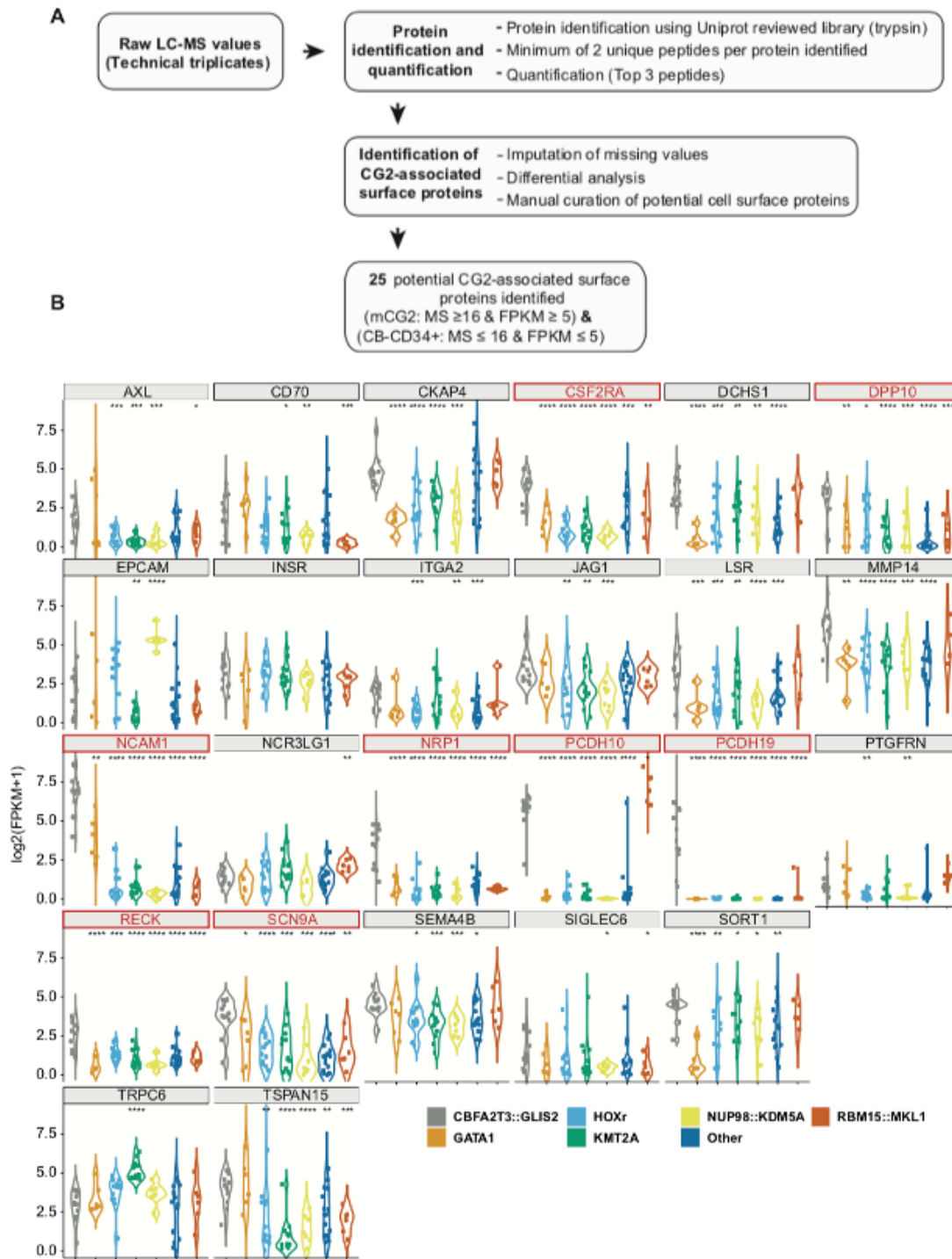


Figure 4-17 – Supplemental Figure S11. Expression of genes encoding CBFA2T3::GLIS2 (CG2)-associated cell surface proteins in an external transcriptomic dataset of pediatric AMKL.

A) Algorithm used to select CG2-associated cell surface proteins to be validated by flow cytometry. B) Violin plots presenting the expression (RNAseq, FPKM) of genes encoding 25 CG2-associated cell surface proteins (Fig. 2D) in a validation dataset of pediatric AMKL¹⁵. Significant differential expression between CG2 and each molecular subtype of AMKL is indicated (t-test, p-values: * <0.05, ** <0.005, *** <0.001, **** <0.0001). Upregulation of 8 genes, indicated in red, is predictive of CG2 genotype.

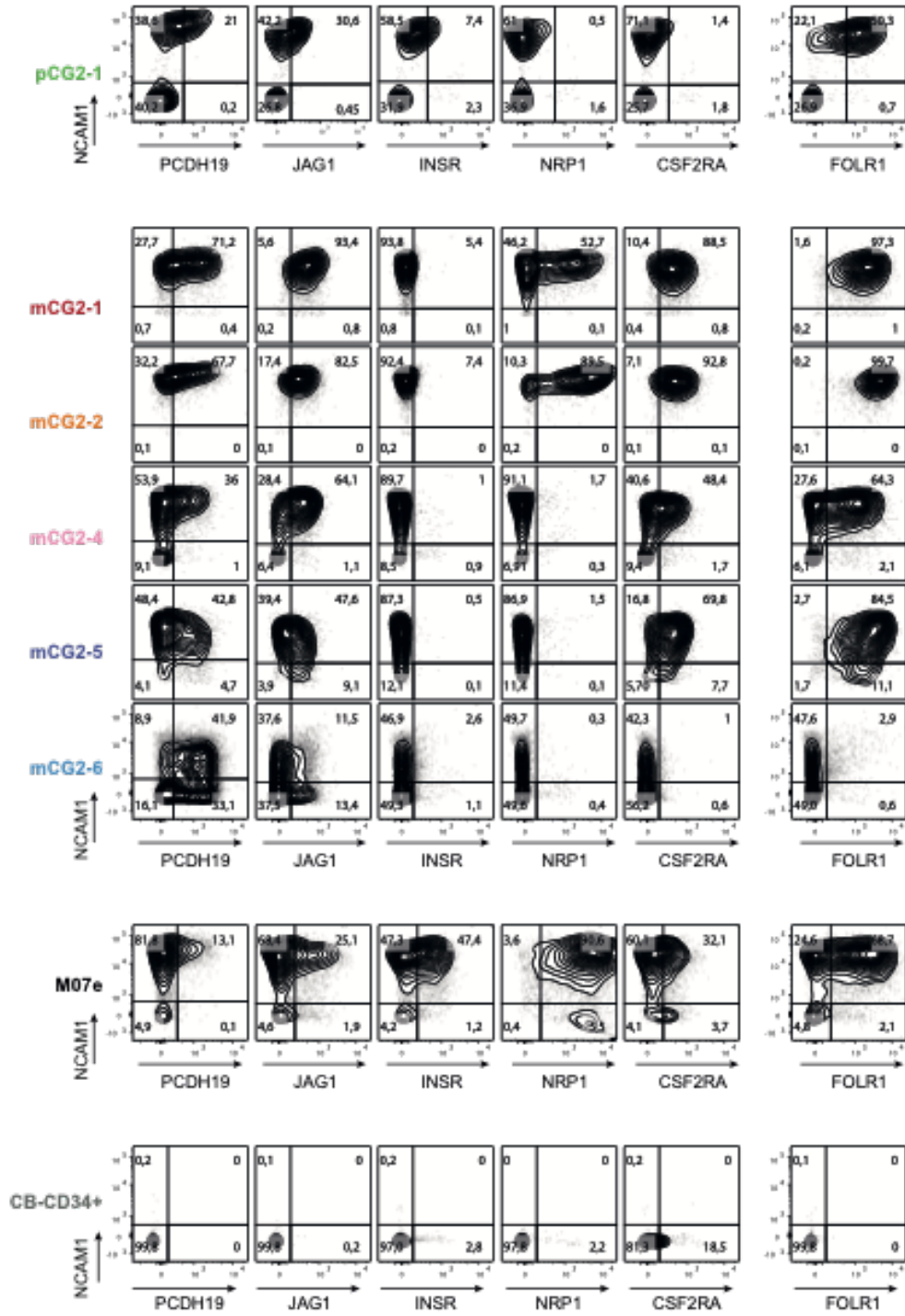


Figure 4-18 – Supplemental Figure S12. Validation of CBFA2T3::GLIS2 (CG2) AMKL-associated cell surface proteins by flow cytometry.

Flow cytometric validation of CG2-associated cell surface protein candidates identified in the surfaceome analysis (see Fig. 2E and Suppl. Fig. S11) and FOLR1 expression. Highly infiltrated xenografts of CG2 leukemia models (mCG2) (>95% GFP positive splenic cells) were compared to CG2 AMKL from patient (pCG2-1), M07e cell line and normal human cord blood cells (CB-CD34+).



Figure 4-19 – Supplemental Figure S13. Correlative expression of cell surface marker genes associated with CBFA2T3::GLIS2 (CG2) subtype in an external transcriptomic dataset of pediatric AMKL¹⁵.

Left panels: scatter plot representations showing pairwise correlation of 8 cell surface marker genes specific to CG2 genotype (markers identified in Suppl. Fig.S11B). Right panels: values, from top to bottom, represent the global and subtype-specific Kendall rank correlation coefficients. P-values: * <0.05, ** <0.005, *** <0.001, **** <0.0001. Pairwise correlations indicated in red are shown in Fig. 2F.

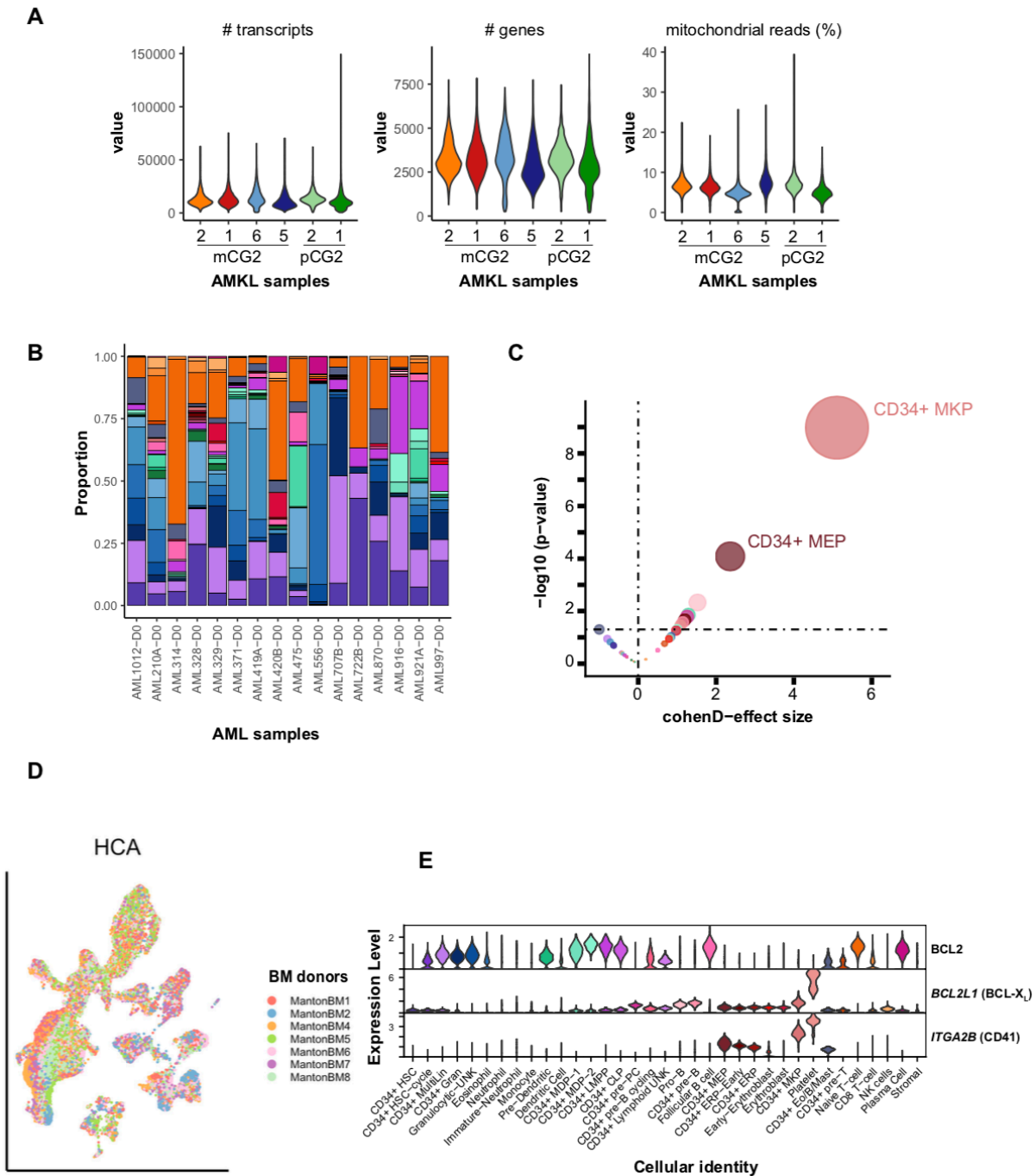


Figure 4-20 – Supplemental Figure S14. Cellular identity of CBFA2T3::GLIS2 leukemia assessed by scRNAseq.

A) Quality metrics of scRNAseq data of synthetic models of CBFA2T3::GLIS2 (mCG2) and patient CG2 (pCG2) AMKL. **B)** Cell type distribution in adult AML19. Color coding for subpopulations is depicted in Fig. 3A. **C)** Dot plot showing the association between the CG2 leukemic state (CG2 AMKL models and patients compared with other AML subtypes and normal bone marrow (BM) cell populations defined by the Human Cell Atlas (HCA)18. The size of dots correlates with the level of association. CD34+ megakaryocyte progenitor (MKP) and CD34+ megakaryocyte-erythroid progenitor (MEP) show the strongest correlations with the CG2 leukemic state, as calculated with the Cohen’s d effect size. **D)** UMAP of bone marrow samples from healthy adult donors (HCA dataset). Cells are color coded according to origin by donor. **E)** Violin plots showing expression of selected genes in normal BM cells (HCA dataset).

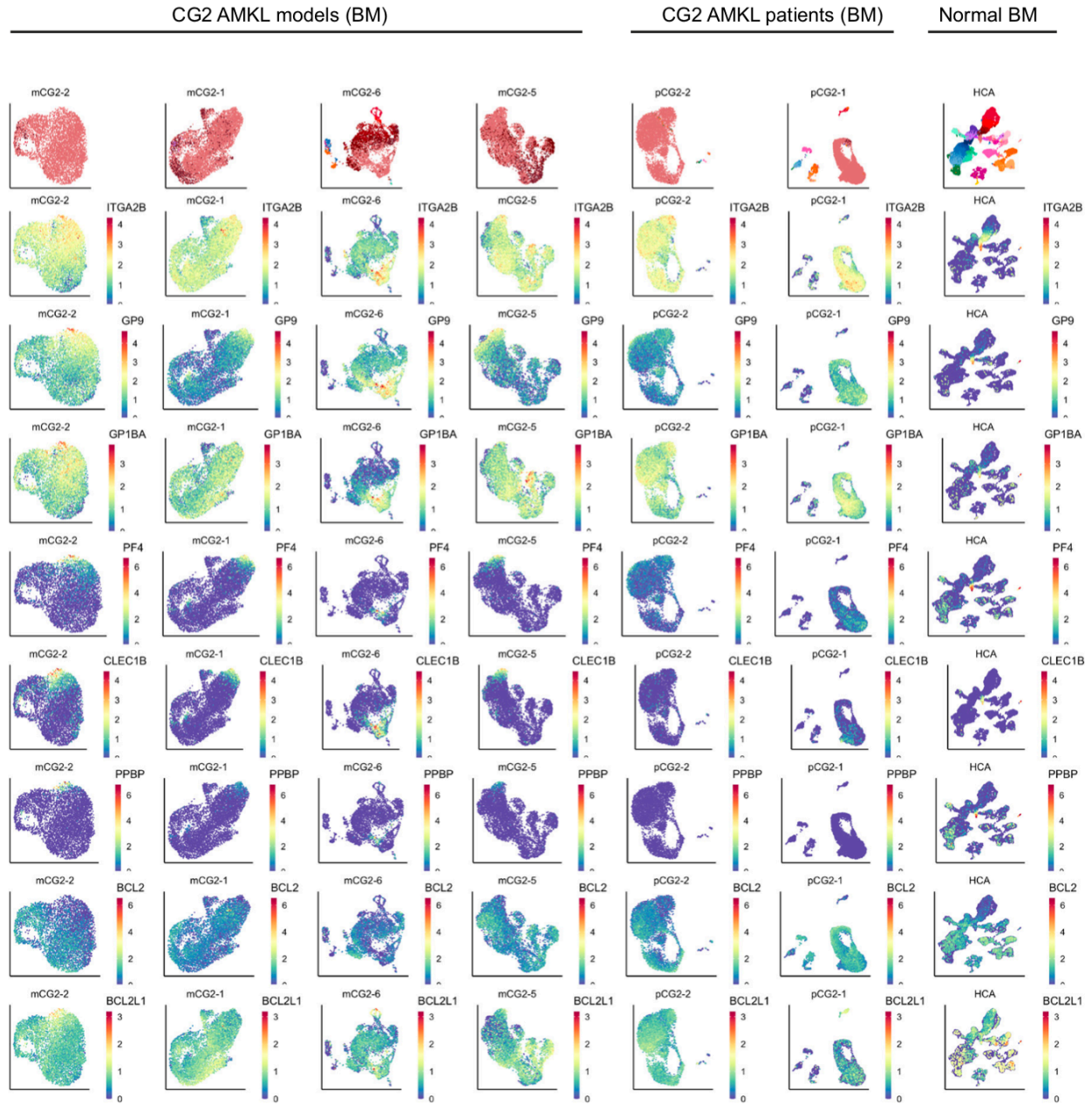


Figure 4-21 – Supplemental Figure S15. UMAP embedded gene expression of relevant markers. Cellular populations are colored as described in Figure 3A. Gene expression is depicted after imputation. CG2, CBFA2T3::GLIS2; BM, bone marrow; HCA, Human Cell Atlas18.

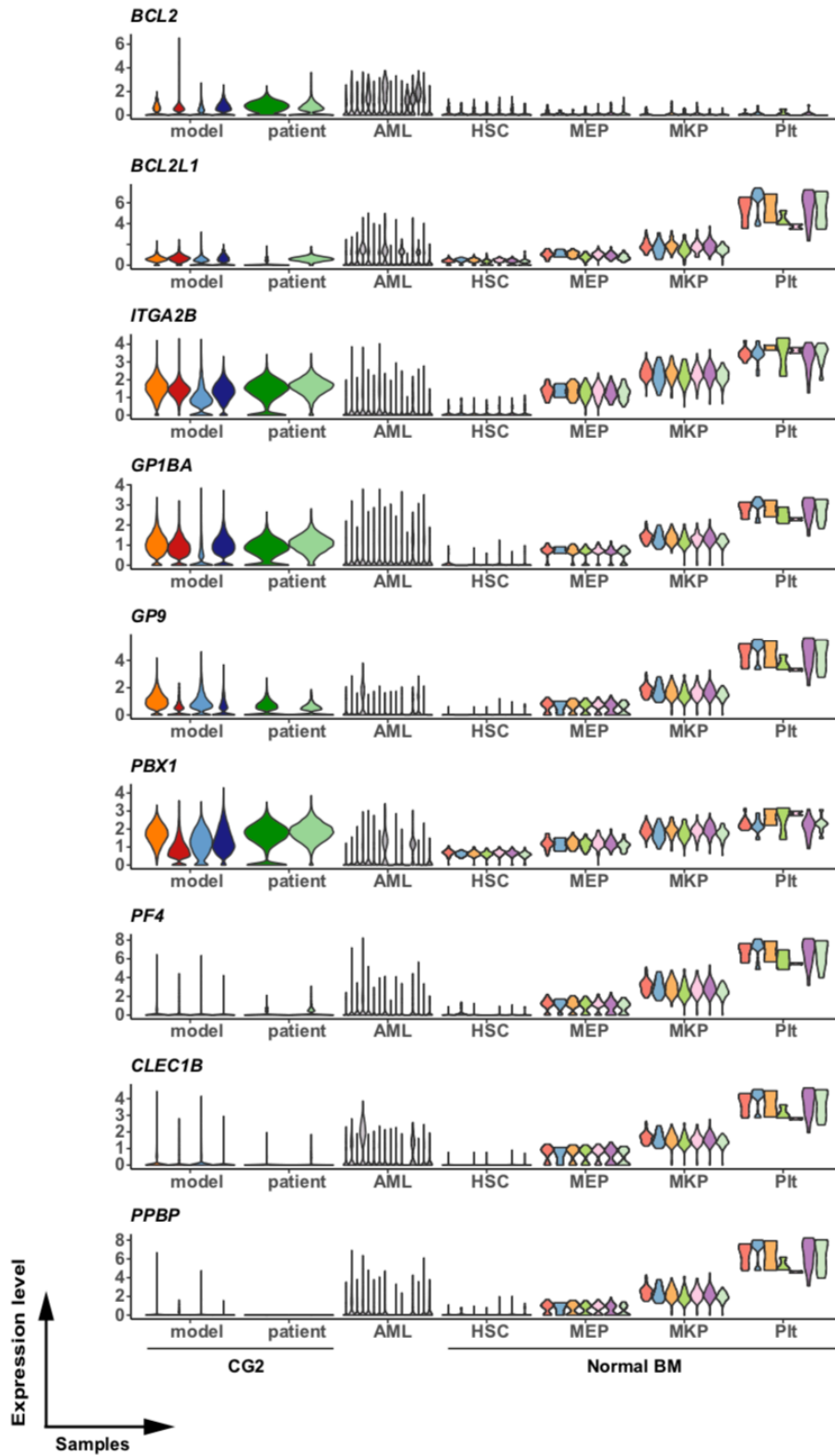


Figure 4-22 – Supplemental Figure S16. Expression of relevant marker.

Violin plot representation of the relevant marker in the models, patients, AML samples and normal bone marrow samples, as in Figure 3C. Gene expression is represented as imputed expression.

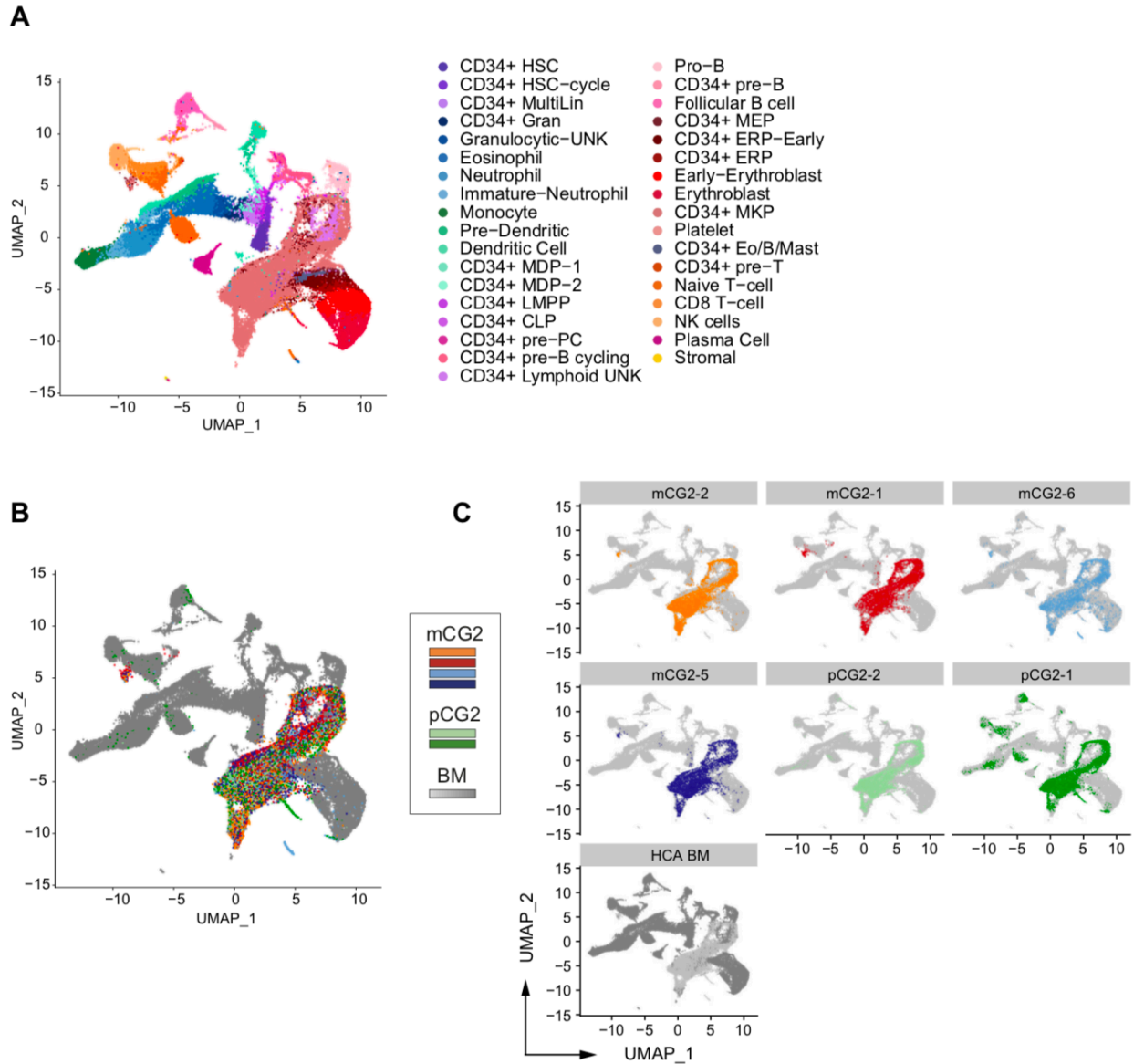


Figure 4-23 – Supplemental Figure S17. Co-embedding of normal bone marrow cells with cells from patients and models.

A) UMAP representation of the co-embedding, color-coded based on cell type, or sample of origin (B). C) Explicit representation of each sample in the UMAP.

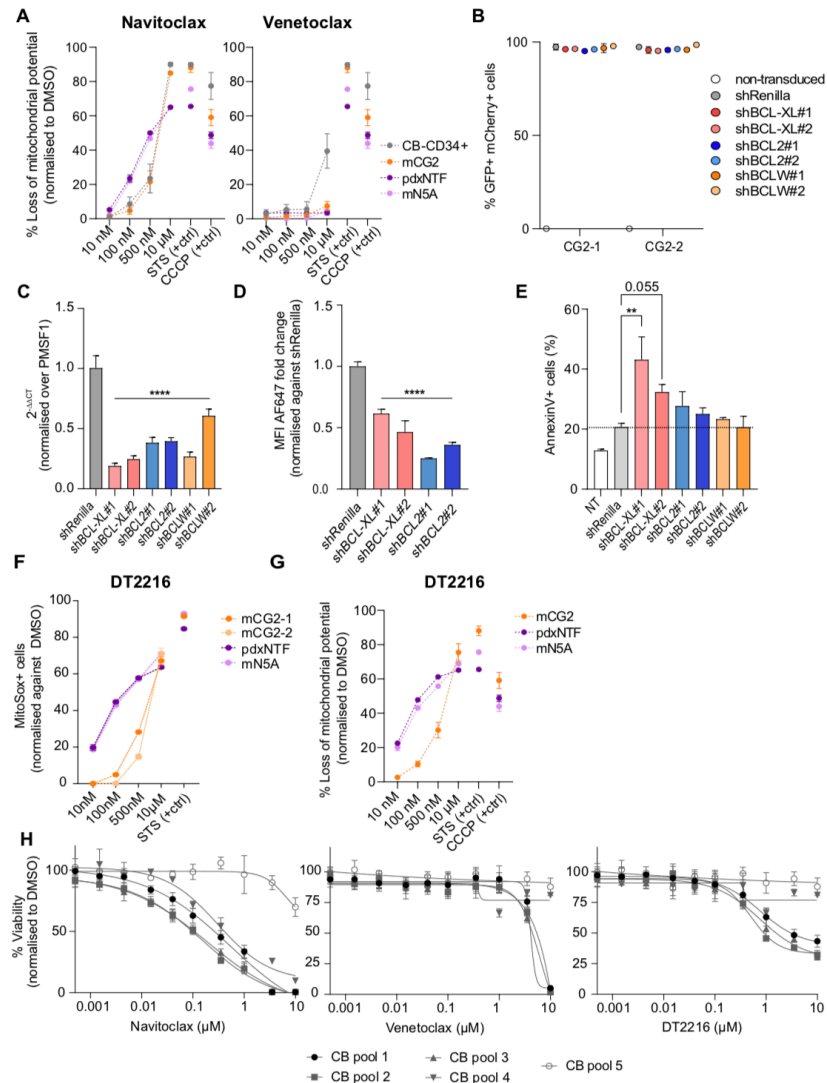


Figure 4-24 – Supplemental Figure S18. Inhibition of BCL-XL impairs AMKL.

A) Loss of mitochondrial potential analysed by TMRE staining in models of AMKL treated with either Navitoclax, Venetoclax or DMSO for 72h in optimised culture conditions. Staurosporine (STS, 1µM final) and CCCP (5µM final) were used as positive controls. **B)** Gene transfer rates measured by flow cytometry (GFP+ mCherry+) 72h after transduction with the indicated shRNA-expressing lentiviral vectors targeting pro-survival or Renilla luciferase control genes, as compared to non-transduced (NT) cells in two models of CG2 (mCG2-1 and mCG2-2). **C)** Relative gene expression of *BCL2L1*, *BCL2* and *BCL2L2* and **D)** intracellular protein levels of BCL2 and BCL-X_L were measured 72h after shRNA-mediated knock-down of BCL-X_L, BCL2 or BCL-W in mCG2-2. As control, cells were transduced with a lentiviral vector containing an shRNA against Renilla luciferase. **E)** Apoptosis was measured by Annexin V in a second synthetic model of CG2 AMKL (mCG2-2) after shRNA-mediated knock-down in comparison to control cells transduced with shRNA against Renilla (shRenilla) or non-transduced cells (NT). **F)** Mitochondrial superoxide production was measured by MitoSox staining in models of AMKL after treatment with different concentrations of DT2216 or 1µM of Staurosporine (STS) as a positive control. **G)** Loss of mitochondrial potential measured by TMRE staining in models of AMKL after 72h of incubation with DT2216 or DMSO in optimised culture conditions. 1µM of Staurosporine (STS) and 5µM of CCCP were used as positive controls. **H)** Dose response curves of healthy CD34+ cord blood pools (n=3 of independent CB samples per pool) incubated for 6d with either Navitoclax, Venetoclax or DT2216, followed by readout with Cell-Titer Glo. Viability readout was normalised to DMSO for each individual sample. CB-CD34+, CD34+ cord blood cells; CG2, CBFA2T3::GLIS2; N5A, NUP98::KDM5A; NTF, NUP98::BPTF; mAMKL, synthetic AMKL model; pdx, patient-derived xenograft. P-values: ** <0.01, **** <0.0001.

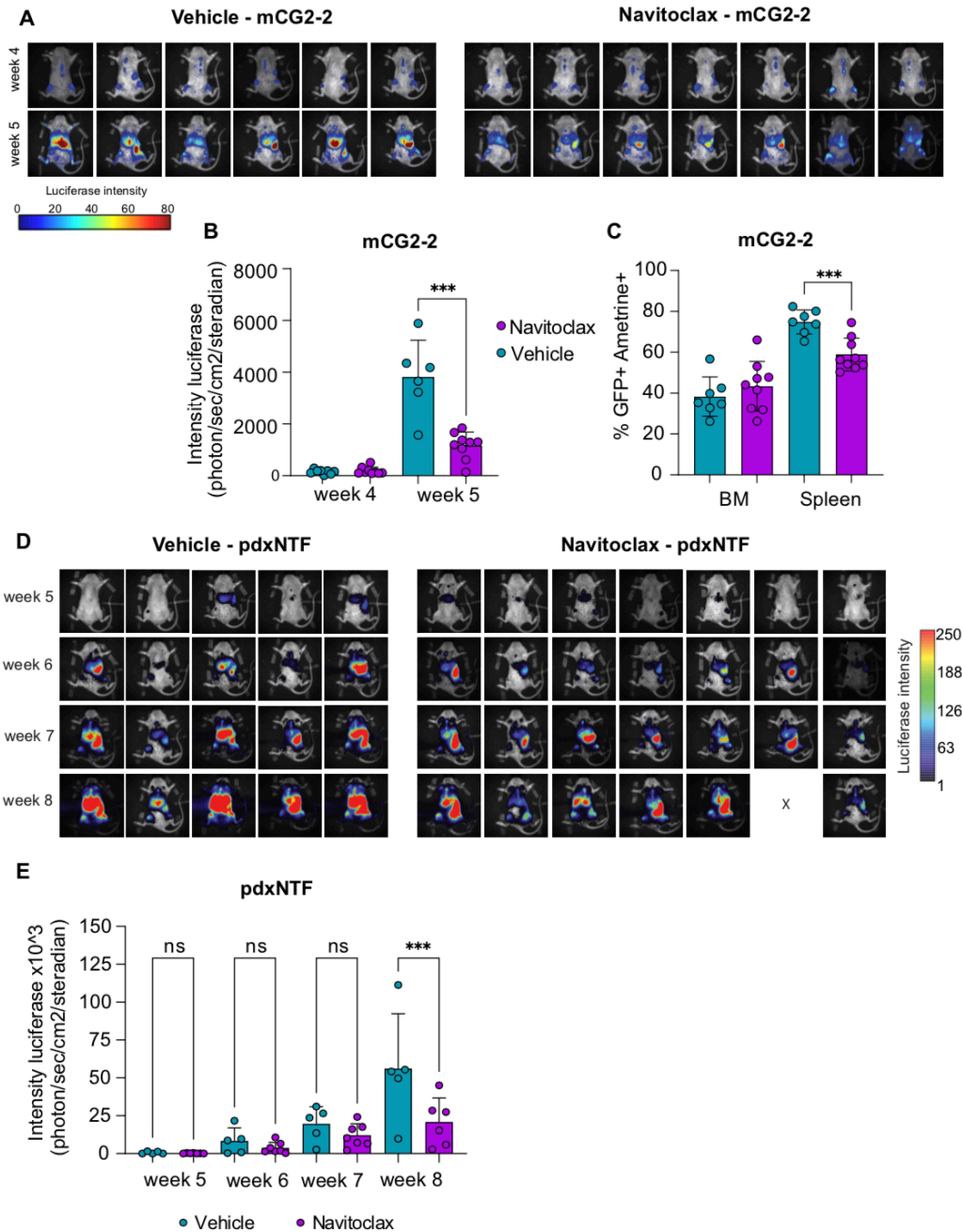


Figure 4-25 – Supplemental Figure S19: Additional models of CG2 and NUP98r patient-derived xenograft are sensitive to Navitoclax treatment in vivo.

A) In vivo imaging of xenografted recipients of mCG2-2 luciferase model during treatment with either vehicle or Navitoclax at week 4 and 5. Luciferase intensity increases from blue to red. B) Quantification of luciferase images in vehicle versus Navitoclax-treated mice, shown in Fig. A. C) Endpoint analysis of CG2-2 treated mice after 2 weeks of treatment comparing leukemic burden (%GFP+ Ametrine+) in bone marrow (BM) and spleen. D) Bioluminescent in vivo imaging of luciferase patient-derived xenograft with the NUP98::BPTF fusion (pdxNTF) from week 5 (before treatment) until the end of 21 days of treatment (week 8) with either vehicle or Navitoclax. Luciferase intensity increases from blue to red. X indicates death of mouse. E) Quantification of luciferases images of pdxNTF over the course of treatment. CG2, CBFA2T3::GLIS2; NTF, NUP98::BPTF; mAMKL, synthetic AMKL model; pdx, patient-derived xenograft; ns, not significant. P-values: * <0.05, *** <0.001.

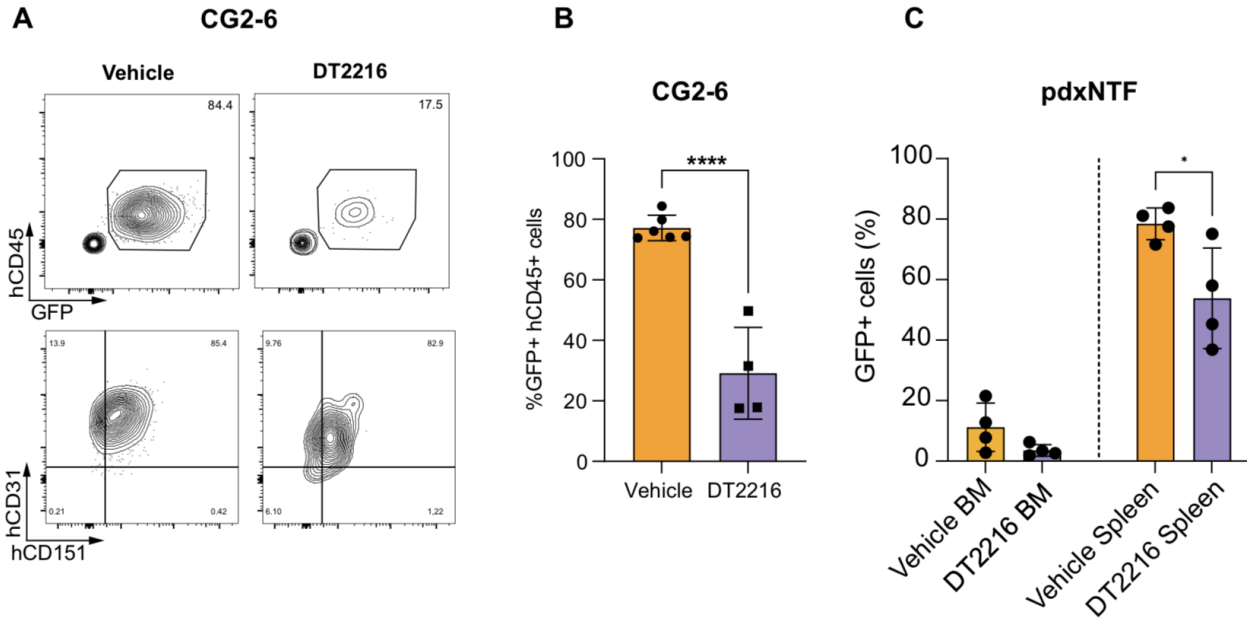


Figure 4-26 – Supplemental Figure S20: Additional models of CG2 and NUP98r patient-derived xenograft are sensitive to DT2216 treatment in vivo.

A) Representative flow cytometry profile of leukemic blasts collected by bone marrow aspiration of mCG2-6 xenografted mice at week 6 of treatment, treated either with vehicle or DT2216. B) Quantitative analysis of BM aspirations after final treatment of mCG2-6 mice with either vehicle or DT2216 (%GFP+ hCD45+). C) PdxNTF xenografted mice were treated for 4 weeks with DT2216 and an endpoint analysis was performed after completion of treatment, comparing leukemic blasts (% GFP+) in BM and spleen of vehicle- or drug-treated mice. CG2, CBFA2T3::GLIS2; pdx, patient-derived xenograft; NTF, NUP98::BPTF.

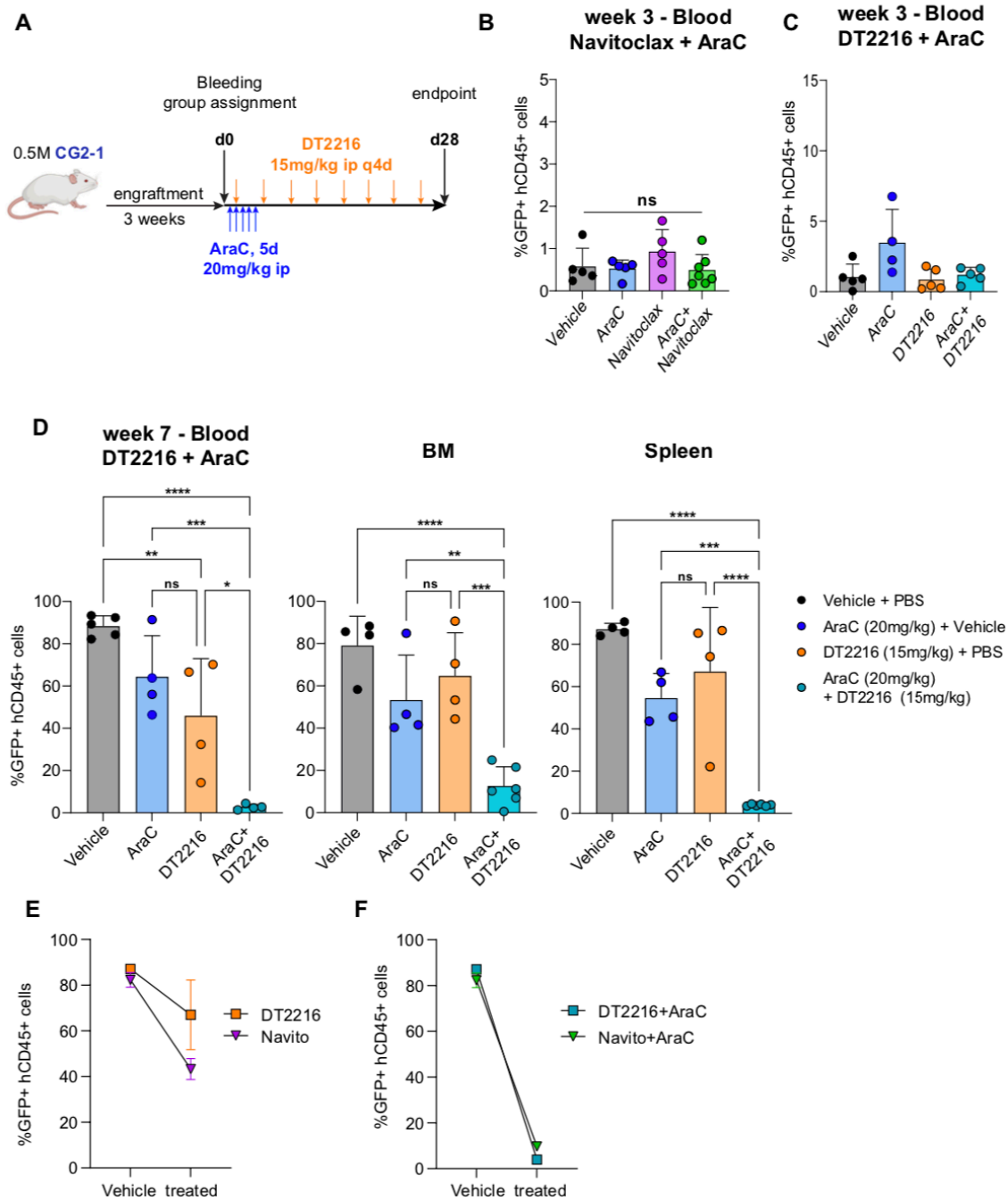


Figure 4-27 – Supplemental Figure S21: Combination of inhibition of BCL-XL with Cytarabine reduces leukemic blasts in vivo.

A) Schematic overview of experimental design of drug combinations for xenotransplanted mice with DT2216 and Cytarabine (AraC). B) Circulating leukemic blasts (%GFP+hCD45+) in the blood of CG2-1 xenografted mice at week 3 post-transplant and before treatment with combinations of AraC and Navitoclax, Navitoclax alone or C) AraC with DT2216 or DT2216 alone. D) Percentage of leukemic blasts in peripheral blood (%GFP+hCD45+, left graph), infiltration of bone marrow (BM, middle graph) and spleen (right graph) was assessed in CG2-1 transplanted mice after 4 weeks of indicated treatments. E) Percentage infiltration (%GFP+hCD45+) in the spleen of xenotransplanted and treated mice was compared at endpoint between matched Vehicle controls and mice either treated with DT2216 or Navitoclax, F) as well as their respective combinations with AraC. CG2, CBFA2T3::GLIS2.

5 Identification des vulnérabilités thérapeutiques des leucémies mégacaryoblastiques induites par les oncogènes chimériques NUP98r et CBFA2T3::GLIS2.

5.1 Préface

Cette section comporte des résultats non publiés dont toute l'interprétation a été faite par l'auteur. La conception des expériences a été faite par l'auteur avec le soutien de Sonia Cellot et Mélanie Bilodeau. Les courbes doses-réponses au jour six ont été effectuées avec la participation de Verena Gress.

5.2 L'inhibition des voies JAK-STAT et PI3K-AKT-mTOR induit l'apoptose de manière synergique de modèles humains de leucémie mégacaryoblastique

5.2.1 Introduction

Près de 17% des cas de leucémies aiguës mégacaryoblastiques (AMKL) présentent une activation constitutive de la voie JAK2-STAT5¹⁴⁸. L'inhibition de la voie signalétique JAK-STAT fut identifiée comme une approche thérapeutique potentielle afin de traiter les AMKL^{161,166}. De ce fait, plusieurs inhibiteurs de cette voie, tels que le ruxolitinib et le tofacitinib, sont actuellement à l'étude dans le traitement des AML pédiatriques et des désordres myéloprolifératifs⁴⁵⁴⁻⁴⁵⁶. Cependant, ces inhibiteurs présentent une efficacité limitée. Cette limitation est notamment démontrée par l'adaptation des cellules tumorales à la présence d'un inhibiteur de JAK2 ainsi une réduction marginale de la masse tumorale lors du traitement des patients^{457,458}.

Tel que démontré par d'autres groupes de recherche, les mutations JAK2-V617F, MPL-W515L, FLT3-ITD ainsi que les mutations activatrices du récepteur tyrosine kinase KIT sont parmi les mutations les plus courantes engendrant une activation constitutive de la voie JAK-STAT^{273-275,459}. Ces mutations sont aussi associées à l'activation de l'axe PI3K-AKT-mTOR chez les leucémies myéloïdes aiguës (LMA)^{274,299,459}. De plus, environ 60% des cas de LMA présentent une activation constitutive de l'axe PI3K-AKT-mTOR^{297,298}.

Notre laboratoire a développé plusieurs modèles robustes d'AMKL dérivés de cellules normales CD34+ isolées de sang de cordon ou dérivés d'échantillons primaires de patient (pdx). Le séquençage de l'ARN de ces modèles montre une forte corrélation transcriptomique avec les leucémies primaires humaines de leur sous-groupe respectif.

Plusieurs indications démontrent l'activation de la voie JAK-STAT chez les leucémies AMKL présentant un réarrangement du gène *NUP98* (NUP98r) ou une fusion *CBFA2T::GLIS2* (CG2). Les analyses d'enrichissement de type GSEA (Gene set enrichment analysis) ont démontré que le protéome de surface du modèles pdxNTF présente un enrichissement pour les protéines liées à l'activation des voies JAK-STAT et de mTOR (voir figure 3-6 B)¹⁶¹. De plus, ce modèle exprime JAK2 sous une forme mutée et constitutionnellement activée JAK2-V617F (voir tableau : 3-1). Dans le

cas de notre modèle mCG2, celui-ci exprime fortement le récepteur CSF2RA (Colony stimulating factor 2 receptor alpha), le récepteur du GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony stimulating factor), pouvant activer JAK2 (voir figures 4-2 E et 4-12). De plus, les AMKL qui présentent une fusion CG2 ont un programme transcriptionnel qui reflète l'activation de la voie JAK-STAT ¹⁶².

Il fut également démontré par plusieurs groupes que l'inhibition des récepteurs tyrosines kinases jumelée à une inhibition de l'axe PI3K-AKT-mTOR induisaient l'apoptose des cellules AML de manière synergique ^{297,313-317}. Cependant, cet effet synergique n'a pas été démontré chez un modèle d'AMKL humain. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'inhibition combinée de la voie JAK-STAT et de l'axe PI3K-AKT-mTOR induit l'apoptose de manière synergique de nos modèles AMKL.

Dans cette optique, nous avons validé la sensibilité de nos modèles NUP98r et CG2 (mCG2) aux inhibiteurs des JAK et de l'axe PI3K-AKT-mTOR par des courbes doses-réponses. Afin de mieux comprendre la sensibilité de ces cellules à ces inhibiteurs, utilisés seuls ou en combinaison, nous avons étudié leur effet sur la prolifération cellulaire ainsi que l'induction de l'apoptose sur une période de 3 à 4 jours.

L'induction de l'apoptose de manière synergique par une inhibition de la voie JAK-STAT et de l'axe PI3K-AKT-mTOR fut confirmée chez nos modèle AMKL par l'étude de quatre combinaisons différentes d'agents pharmacologiques ciblant ces voies. Contrairement au AMKL, la lignée cellulaire ML-2, une lignée de LMA humaine présentant la fusion *KMT2A::AFDN* (alias *ML::AF6*), y est résistante.

L'effet de ces composés sur la phosphorylation de STAT5 ainsi que des cibles en aval des complexes mTOR 1 et 2 (mTORC1/2) a été validé par immunobuvardage de type Western et consolide l'intérêt d'inhiber le complexe mTORC2 en présence d'une inhibition de JAK2.

5.2.2 Matériels et méthodes

5.2.2.1 Culture cellulaire

Les modèles leucémiques ainsi que les cellules CD34+ de sang de cordon ont été cultivés dans des conditions de culture optimisée. Les lignées cellulaires furent cultivées selon les recommandations des fournisseurs.

5.2.2.2 Préparation des composés

Les différents inhibiteurs (inhibiteur des protéines JAK : ruxolitinib, tofacitinib, baricitinib, AT9283, BBT594. Inhibiteurs de PI3K, mTORC1/2 : BGT226, GSK2126458, PF-05212384, BEZ235. Inhibiteurs de mTORC1/2 : AZD9055, torin 1, torin , PP242, vistusertib. Inhibiteurs de mTORC1 : rapamycin, ridaferolimus) furent achetés des compagnies MedChemExpress (NJ, États-Unis) ou Selleckchem (TX, États-Unis) et préalablement resuspendus à une concentration de 10 mM avec du DMSO. Afin d'assurer une suspension homogène, certaines suspensions ont été soumises à un processus de sonication.

5.2.2.3 Courbes doses-réponses

Les courbes doses-réponses furent effectuées à la plateforme de criblage de haut débit de l'institut de recherche en immunologie et oncologie (IRIC) de l'Université de Montréal. Les différents types cellulaires étudiés ont été cultivés en plaque 384 puits pour un volume de 50 µl par puit. La densité cellulaire de départ fut établie entre 40,000 et 100,000 cellules/ml (entre 2,000 et 5,000 cellules/puit). La lecture, en quadruplicata, de la luminescence relative à la concentration d'ATP fut effectuée au jour 6 suivant l'ajout des composés (incubation à 37°C en présence de 5% CO₂) (CellTiter-Glo[®] Cell Viability Assay (Promega)). Le pourcentage de la valeur d'ATP relative à la condition DMSO fut calculé ainsi : $100 \times (\text{moyenne de la fluorescence des puits d'une condition essais} / \text{moyenne de la fluorescence des puits DMSO})$. Les valeurs de la concentration inhibitrice médiane (IC₅₀) furent déterminées par une analyse de régression non linéaire à quatre paramètres grâce à Graphpad Prism V9.1.2.

5.2.2.4 Évaluation de l'effet des inhibiteurs de JAK et de la voie PI3K-AKT-mTOR sur la croissance cellulaire et la survie

Les différents types cellulaires ont initialement étéensemencés au jour 0 à 300,000 cellules/ml (30,000 cellules/puit) en triplicata par conditions sur une plaque 96 puits. Les composés ont été ajoutés le même jour à leur IC₅₀ respectif selon le type cellulaire. Les cellules ML-2, résistantes aux inhibiteurs de JAK, ont été exposées au ruxolitinib à 1 µM, tofacitinib 5 µM et baricitinib 1 µM. Des plaques indépendantes ont été générées pour chacune des acquisitions par cytométrie en flux. Après exclusion des doublons, le compte cellulaire fut basé sur le nombre absolu de cellules présentant une faible valeur SSC (Side scatter) et qui est négative pour le DAPI

(4',6-diamidino-2-phenylindole). Les comptes cellulaires ont été effectués par cytométrie en flux en duplicata pour chacun des puits. La proportion de cellules apoptotiques fut évaluée par cytométrie en flux après resuspension des cellules dans un volume réactionnel composé d'Annexin V binding buffer, Annexin-V APC 0.5% et DAPI 1 µg/ml. Les cellules apoptotiques ont été définies comme Annexin-V APC+ DAPI- (précoces) or Annexin-V APC+ DAPI+ (tardives).

Dans le cas des courbes combinant le ruxolitinib et le vistusertib, huit acquisitions ont eu lieu sur trois jours (Temps : 3h, 6h, 9h, 12h, 24h, 36h, 48h et 72h). Le ruxolitinib fut utilisé à une concentration de 0.7 µM et le vistusertib à une concentration de 0.5 µM pour tous les types cellulaires.

Dans le cas des matrices synergiques, les cellules ont été placées en présence d'un inhibiteur de JAK2 ou de la voie PI3K-AKT-mTOR à des concentrations croissantes avoisinant les valeurs des IC50 pour chacun des différents composés (ruxolitinib : 0 µM, 0.175 µM, 0.35 µM, 0.70 µM; BBT594 : 0 µM, 0.35 µM, 0.7 µM, 1.4 µM; BGT226 : 0 µM, 0.005 µM, 0.01 µM, 0.02 µM; torin 2 : 0 µM, 0.0125 µM, 0.025 µM, 0.05 µM; vistusertib (AZD2014) : 0 µM, 0.125 µM, 0.25 µM, 0.5 µM). Chacune des combinaisons a été effectuée en triplicata techniques et chacune des matrices a été effectuée en duplicata biologique. Les valeurs d'apoptose obtenues ont été analysées en utilisant l'application Synergyfinder 2.0 ⁴⁶⁰.

5.2.2.5 Western blot

Les différentes cultures cellulaires ont été placées en présence des inhibiteurs pharmacologiques aux concentrations indiquées pendant une heure avant d'être lavées deux fois avec du PBS à froid. Ces cellules ont ensuite été centrifugées à froid avant d'être gardées à -80 degrés Celsius. Les cellules ont ensuite été lysées en utilisant du tampon RIPA (Alfa Aesar, MA, États-Unis) en présence d'inhibiteurs de phosphatase et de protéases (Pierce, A32959, MA, États-Unis) selon les recommandations des fabricants. Après dosage des protéines selon la méthode BCA (Pierce, 23225, MA, États-Unis), 25 µg de protéines furent utilisés pour les immunobuvardages de type Western. Les immunobuvardages ont été faits suivant la plateforme Bio-Rad (CA, États-Unis) selon les protocoles conventionnels recommandés par la compagnie.

5.2.3 Résultats

5.2.3.1 Les inhibiteurs de la voie de JAK-STAT induisent une diminution de la prolifération cellulaire ainsi que l'apoptose de nos modèles d'AMKL.

Les valeurs d'IC50 obtenues lors de courbes doses-réponses démontrent une forte sensibilité des modèles AMKL induites par la fusion CG2 comparativement aux modèles mN5A et pdxNTF lorsqu'exposé au ruxolitinib, un inhibiteur de JAK1 et JAK2 (IC50 ruxolitinib mCG-1 : 0.028 μ M, mCG-2 : 0.053 μ M, mN5A : 0.434 μ M, pdxNTF 0.634 μ M) (figure : 5-1 A-D et table 5-1). Comparativement aux AMKL, les cellules CD34+ isolées de sang de cordon semblent moins sensibles à l'inhibition des JAK alors que la lignée cellulaire ML-2 se montre résistante (IC50 ruxolitinib CD34-HSPC : 1.229 μ M, ML-2 : >10 μ M). Cette sensibilité au ruxolitinib est comparable à celle obtenue pour le baricitinib, tous deux des inhibiteurs des protéines JAK1 et JAK2 ^{461,462}. Dans le cas du tofacitinib, un inhibiteur de JAK1 et JAK3 ⁴⁶³, les modèles CG2 sont aussi plus sensibles que les modèles NUP98r (figure : 5-1 A-D). De façon générale, les cellules AMKL semblent plus sensibles au ruxolitinib comparativement au tofacitinib (figure : 5-1 A, B, D).

Ces résultats d'IC50 sont comparables à ce que nous avons obtenu précédemment lors des courbes doses-réponses utilisant le ruxolitinib et le tofacitinib (voir figure 3-6) ¹⁶¹. La sensibilité de nos modèles leucémiques au ruxolitinib et au tofacitinib est comparable aux résultats publiés par un autre groupe pour les lignées cellulaires CHRF288-11 et M07e, présentant respectivement la fusion *NUP98::KDM5A* et *CBFA2T3::GLIS2* ¹⁶⁶.

La forte sensibilité des cellules mCG2 ne semble pas s'expliquer par une augmentation du nombre de cellules apoptotiques sur les quatre premiers jours de culture en présence d'un inhibiteur de JAK (figure 5-1 E). De plus, le compte cellulaire des cellules mCG2 démontre qu'elles continuent de proliférer sur 4 jours en présence de ces inhibiteurs (figure 5-1 F). Il est donc plausible que les valeurs IC50 des modèles CG2 soient représentatives d'une différence de vitesse proliférative perceptible au jour six des cellules exposées à un inhibiteur de la voie de JAK-STAT comparativement aux puits contrôles DMSO. Un décompte cellulaire précis sur six jours combinés à l'utilisation d'un fluorochrome tel que le CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) nous permettrait de vérifier cette hypothèse.

Dans le cas des modèles mN5A et pdxNTF, il est possible de déceler une augmentation de la proportion de cellules apoptotiques (figure 5-1 E) concomitante à une perte de prolifération cellulaire lorsque les cellules sont exposées à un inhibiteur de la voie de JAK-STAT (figure 5-1 F) . L'effet des inhibiteurs, comparativement à la courbe contrôle DMSO, est plus manifeste au jour trois. Tandis qu'au quatrième jour, les modèles AMKL NUP98r montrent une certaine adaptation à la présence des inhibiteurs. Cette adaptation est démontrée par une diminution de la fraction apoptotique au sein de la culture (figure 5-1-E) ainsi qu'un regain de la prolifération cellulaire (figure 5-1 F).

(figure on the next page)

Figure 5-1 - Courbes doses réponses des inhibiteurs des JAK et effet des inhibiteurs sur la prolifération et la viabilité cellulaire.

A-C) Courbes doses-réponses des inhibiteurs de la voie JAK-STAT et **D)** concentrations inhibitrices médianes (IC50) pour les types cellulaires indiqués. Les valeurs d'ATP sont comparées aux valeurs normalisées (100%) de la condition contrôle DMSO (Cell-Titer Glo, 6 jours d'incubation, 4 réplicats). **E)** Évolution de la fraction Annexin-V positive (%) sur 4 jours pour chaque type cellulaire incubé en présence d'inhibiteurs de la voie JAK-STAT. Pour chaque type cellulaire, la concentration des inhibiteurs fut ajustée aux valeurs d'IC50 présentée en **D**. Ne présentant pas de valeur IC50, les cellules ML-2 ont été exposées au ruxolitinib à 1 uM, tofacitinib 5 uM et baricitinib 1 uM. Chaque condition représente la valeur moyenne de trois puits indépendants (+/- SEM). **F)** Courbes de proliférations cellulaires (Log2 *Fold Change* comparé au jour 0 – compte fait en duplicata pour chacun des puits, trois puits indépendants par conditions).

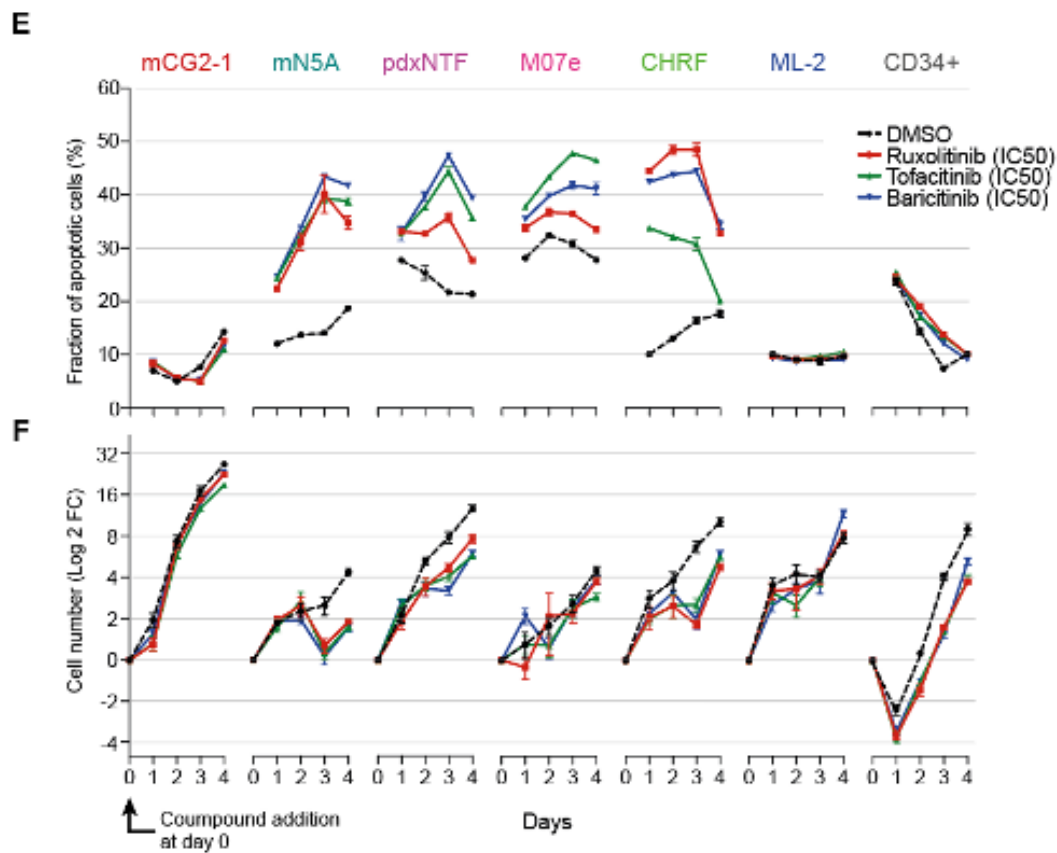
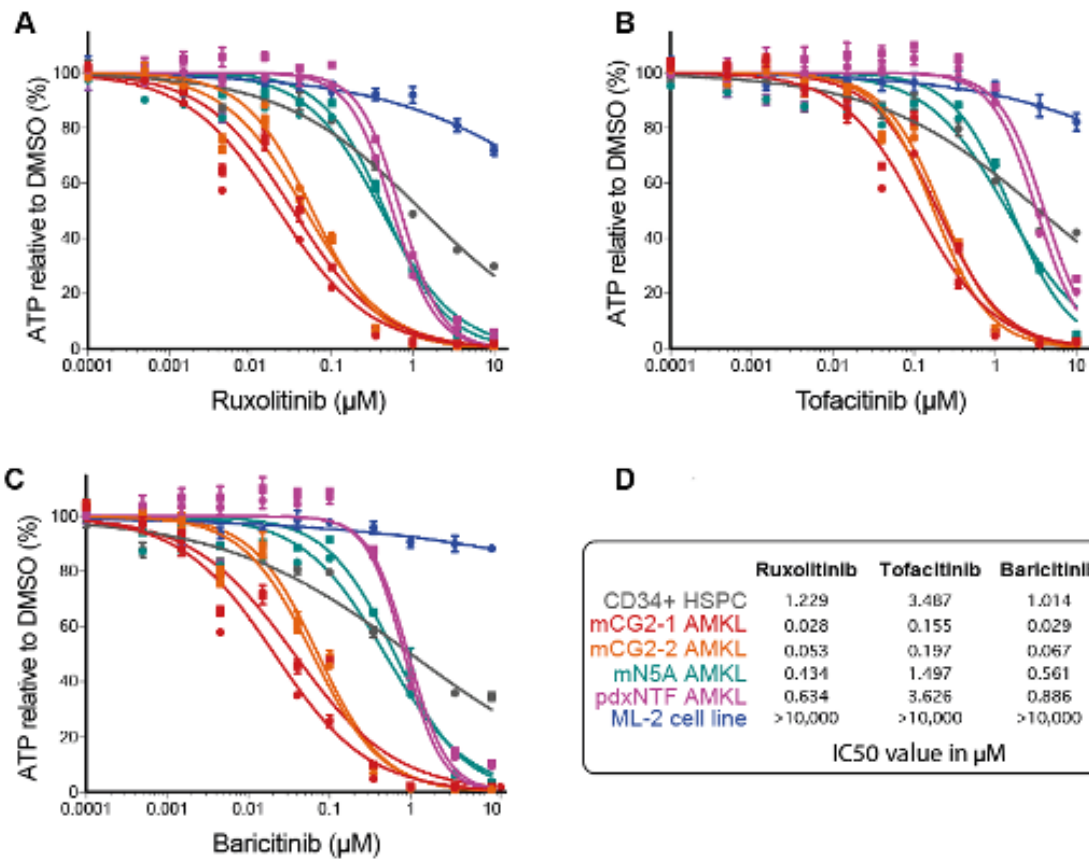


Tableau 5-1 - Valeurs d'IC50

		mCG2-1	mCG2-2	mNSA	pdxNTF	M07e	CHRF288-11	ML-2	CD34
JAK Inhibitors	Ruxolitinib	0.028	0.053	0.434	0.634	0.016	0.112	> 10.000	1.299
	Tofacitinib	0.155	0.197	1.497	3.626	0.119	0.805	> 10.000	3.497
	Baricitinib	0.029	0.067	0.561	0.886	0.027	0.207	> 10.000	1.014
	AT9283	0.004	0.005	0.015	0.008	0.021	0.218	0.003	0.006
	BBT594	0.406	0.347	1.314	0.496	0.490	0.242	0.182	0.220
PI3K mTORC1/2 Inhibitors	BGT226	0.006	0.003	0.015	0.006	0.008	0.005	0.011	0.002
	GSK2126458	0.082	0.037	0.041	0.045	0.076	0.006	0.015	0.011
	PF-05212384	0.026	0.007	0.009	0.001	0.009	0.001	0.008	0.001
	BEZ235	0.044	0.025	0.187	0.056	0.037	0.023	0.052	0.023
mTORC1/2 Inhibitors	AZD8055	0.056	0.021	0.135	0.030	0.052	0.037	0.035	0.010
	Torin 1	0.061	0.031	0.389	0.041	0.052	0.028	0.057	0.011
	Torin 2	0.034	0.016	0.075	0.028	0.016	0.012	0.024	0.008
	PP242	0.587	0.219	0.504	0.462	0.340	0.913	0.559	0.093
	Vistusertib	0.331	0.139	0.508	0.174	0.160	0.188	0.130	0.029
mTORC1 Inhibitors	Rapamycin	NA	0.012	NA	NA	0.044	0.035	0.004	0.016
	Ridafarolisimus	4.689	0.004	18283	0.548	0.577	0.183	0.307	0.025

5.2.3.2 Nos modèles d'AMKL sont sensibles à l'inhibition du complexe 2 de mTOR.

Vu l'importance de la voie PI3K-AMK-mTOR chez les leucémies myéloïdes, nous avons étudié l'effet de la rapamycine sur la prolifération de nos modèles leucémiques. La rapamycine, un inhibiteur allostérique du complexe 1 mTOR (mTORC1)⁴⁶⁴, peu importe sa concentration, semble générer un retard prolifératif comparativement à la condition DMSO (voir la figure 5-2 - A).

L'utilisation de la rapamycine seule n'induit pas l'apoptose des cellules AMKL mCG2 alors que la présence d'une concentration plus élevée de ruxolitinib (0.5 µM) que son IC50 (0.028 µM) semble induire une modeste élévation de la proportion de cellules apoptotiques de ce modèle (figure 5-2 – B). Lorsque le ruxolitinib est utilisé en combinaison avec la rapamycine, la proportion de cellules apoptotiques augmente significativement comparativement à la condition DMSO (figure 5-2 B).

Une heure suivant l'ajout de la rapamycine aux cellules mCG2-1, cet inhibiteur induit une déphosphorylation partielle de mTOR à la serine-2448, la cible de la kinase p70S6⁴⁶⁵, elle-même la cible de mTORC1⁴⁶⁶ (figure 5-2 C). Cette perte de phosphorylation est concomitante à un maintien de la phosphorylation de AKT au niveau de sa sérine 473, la cible du complexe 2 de mTOR (mTORC2)²⁹¹. De plus, cette phosphorylation de AKT n'est pas affectée par la présence de ruxolitinib et démontre une diminution de l'activité du complexe mTORC1 alors que le complexe

mTORC2 reste actif chez le model mCG2 malgré la présence de ruxolitinib ou de rapamycine employé seul ou en combinaison.

Cette inhibition incomplète de la voie PI3K-AKT-mTOR par la rapamycine nous a amené à évaluer l'effet de composés pouvant inhiber à la fois le complexe mTORC1 et le complexe mTORC2. Contrairement à la rapamycine qui inhibe allostériquement mTORC1 depuis son interaction avec FKBP12, les composés Vistusertib (AZD2014)⁴⁶⁷, torin 2⁴⁶⁸ et BGT226⁴⁶⁹ inhibent l'activité de mTOR de manière compétitive à l'ATP (adénosine triphosphate) au niveau de son site actif. Ces composés inhibent ainsi l'activité du complexe mTORC1 et mTORC2. En présence de tels inhibiteurs, tous les types cellulaires se sont montrés sensibles ($IC_{50} < 1 \text{ M}$ comparativement à la condition contrôle DMSO (IC_{50} vistusertib mCG-1 : 0.331 μM , mCG-2 : 0.139 μM , mN5A : 0.508 μM , pdxNTF 0.174 μM , CD34+ HSPC : 0.029 μM , ML-2 : 0.130 μM) (figure 5-2 D-G, table supplémentaire 5-1).

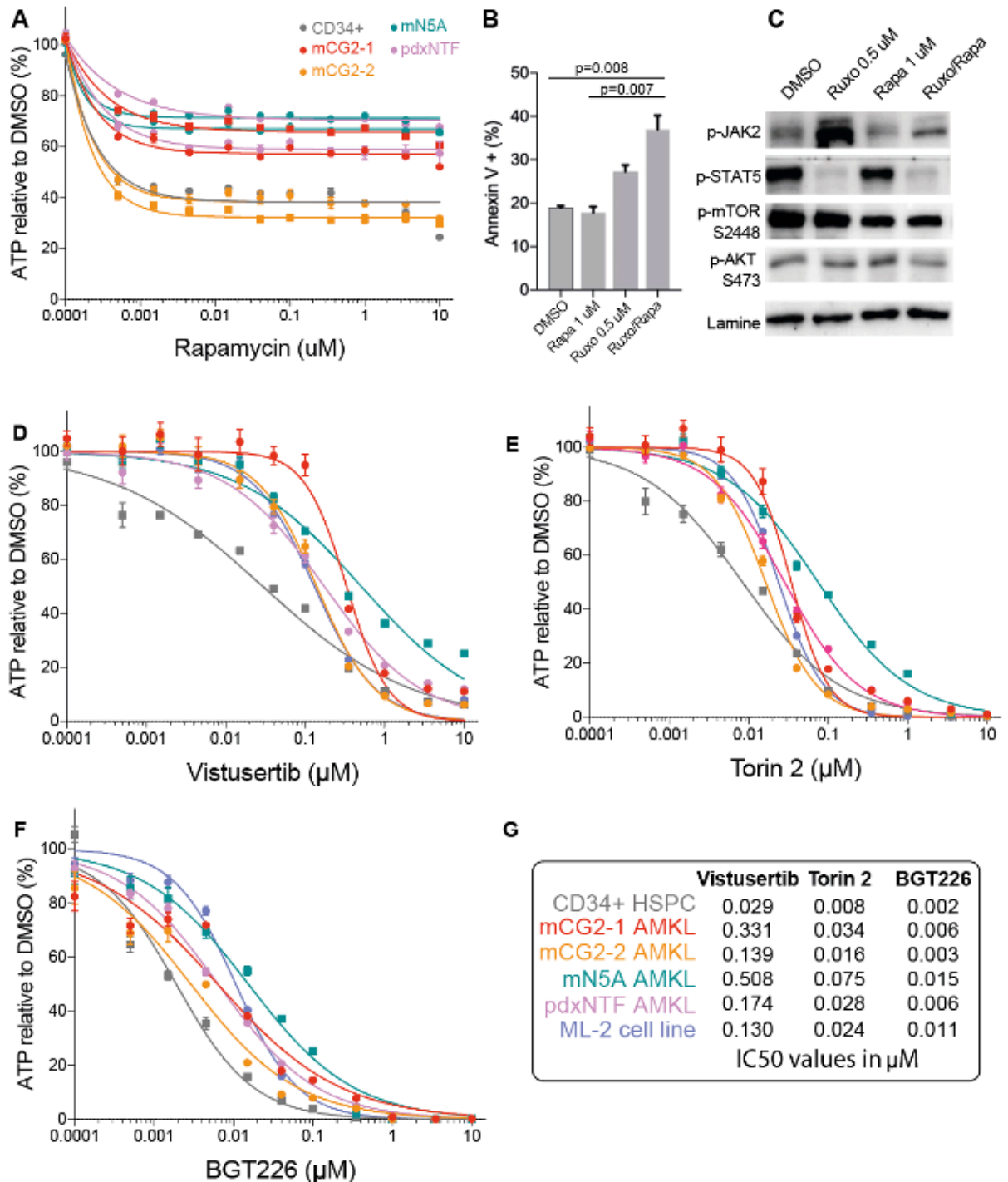


Figure 5-2 - Courbes doses réponses des inhibiteurs de la voie PI3K-AKT-mTOR.

A) Courbes doses-réponses de la rapamycin pour les types cellulaires indiqués (Cell-Titer Glo, 6 jours d'Incubation, 4 réplicats). **B)** Essais de viabilité des cellules mCG2-1 après 72 heures d'exposition continue au ruxolitinib et la rapamycine (valeur-p; Analyse de la variance à un facteur). **C)** Western blot d'un lysat cellulaire mCG2-1 exposée pendant une heure au ruxolitinib et à la rapamycine. **D-F)** Courbes doses-réponses des inhibiteurs de la voie PI3K-AKT-mTOR et **G)** concentrations inhibitrices médianes (IC50) pour les types cellulaires indiqués. Les valeurs d'ATP sont comparées aux valeurs normalisées (100%) de la condition contrôle DMSO (Cell-Titer Glo, 6 jours d'incubation, 4 réplicats).

5.2.3.3 L'inhibition combinée de JAK2 ainsi que mTORC1/2 induit l'apoptose des leucémies AMKL de manière synergique

Dans un premier essai afin de démontrer le potentiel synergique de la combinaison du ruxolitinib avec un inhibiteur de l'axe PI3K-AKT-mTOR pouvant cibler les complexes mTORC1 et mTORC2, nous avons suivi le compte cellulaire ainsi que la mesure de la fraction cellulaire apoptotique en présence de ruxolitinib et de vistusertib employés seuls ou en combinaison. Le vistusertib, lorsqu'employé seul, induit une inhibition de la prolifération (figure 5-3 – A) sans entraîner l'apoptose des modèles CG2 positifs (voir figure 5-2 – B). Cependant, l'action synergique du ruxolitinib et du vistusertib dans l'induction de l'apoptose semble être présente chez tous nos modèles d'AMKL et paraît particulièrement importante pour les modèles mN5A et pdxNTF. Pour sa part, la lignée cellulaire ML-2 ne semble pas être affectée par ces inhibiteurs.

Dans le but de confirmer l'interaction synergique de l'induction de l'apoptose des inhibiteurs de JAK et d'inhibiteurs de mTORC1 et mTORC2, nous avons élaboré quatre matrices jumelant des inhibiteurs de nos voies d'intérêts (ruxolitinib-BGT226, ruxolitinib-torin2, ruxolitinib-vistusertib et BBT594-vistusertib) et évalué la fraction cellulaire apoptotique par cytométrie en flux au jour trois. Les valeurs furent analysées en utilisant l'application SynergyFinder et, puisque nous présumons une indépendance entre ces composés, nous avons retenu le modèle de référence Bliss comme score prédictif de synergie^{460,470}. Il est généralement admis qu'un score Bliss plus élevé que 10 est fortement prédictif d'une interaction synergique.

Les valeurs du score Bliss montrent un effet synergique (Bliss > 10) pour la majorité des combinaisons entre un inhibiteur de JAK2 et des complexe mTORC1 et mTORC2 (figure 5-3 C et E tableau 5-2). À ces concentrations, la synergie semble être plus importante chez les modèles mN5A et pdxNTF que chez les modèles d'AMKL induits par CG2. De plus, les lignées cellulaires M07e et CHR288-11 répondent comme nos modèles AMKL alors que la lignée cellulaire ML-2 ne semblent pas être affectées par ces différentes combinaisons. (voir figure 5-3 - D et E et le tableau supplémentaire 5-2).

La combinaison du ruxolitinib et du vistusertib entraîne la perte de phosphorylation de STAT5 ainsi que des cibles sous le complexe mTORC1 : pS6 et 4EBP1 (voir figure 5-3 – F). Contrairement à la

rapamycine, le vistusertib induit la perte de phosphorylation de AKT à la serine 473 démontrant l'inhibition du complexe mTORC2.

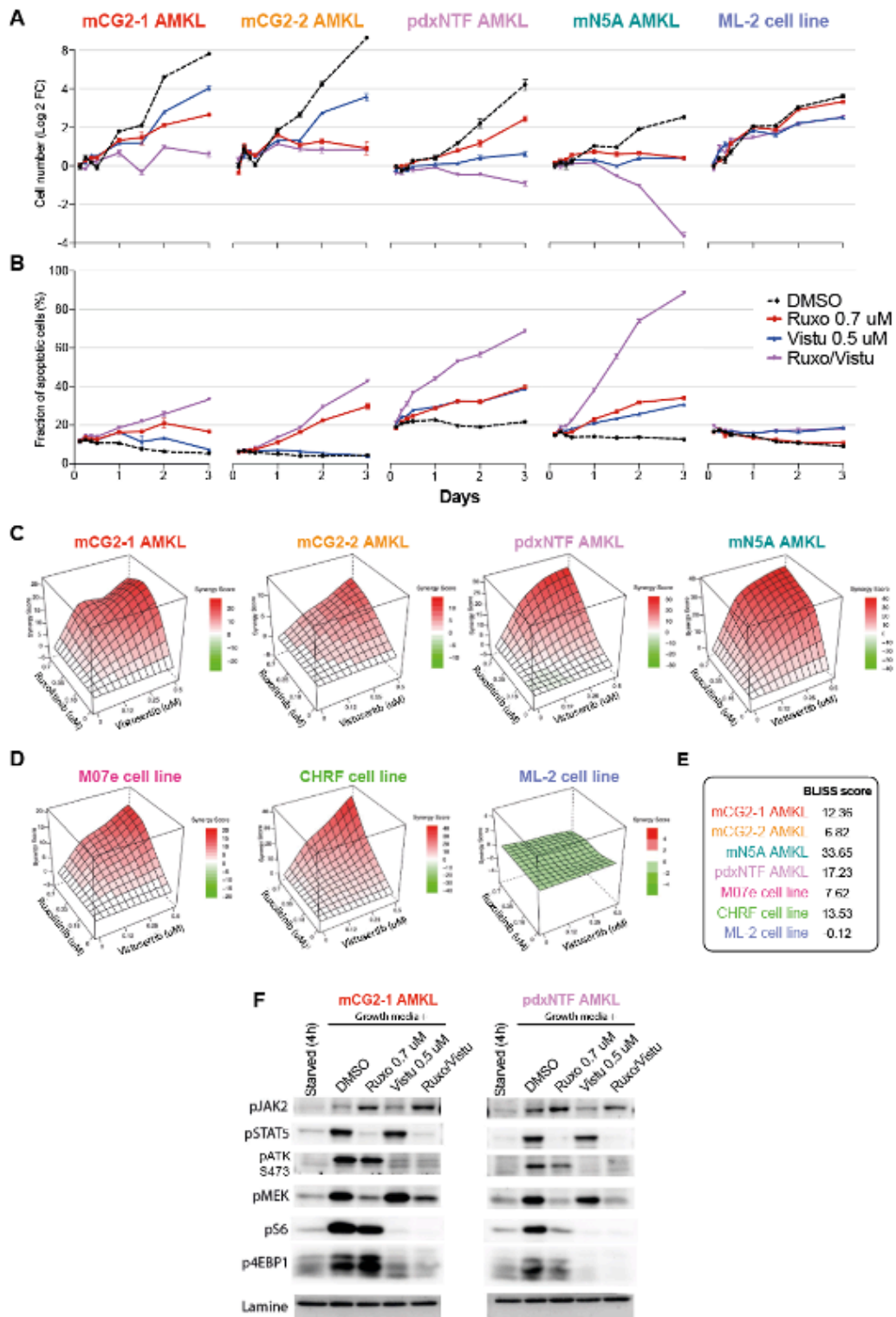


Figure 5-3 - Le ruxolitinib et le vistusertib induisent l'apoptose des modèles AMKL de manière synergique.

A) Courbes de prolifération cellulaire (Log2 *Fold Change* comparé au jour 0 – compte fait en duplicate pour chacun des puits, trois puits indépendants par conditions) et **B)** évolution de la fraction apoptotique (Annexin-V positive) (%) sur 3 jours pour chaque type cellulaire incubé en présence continue de DMSO, ruxolitinib (0.7 uM) avec ou sans vistusertib (0.5 uM). Chaque condition représente la valeur moyenne de trois puits indépendants (+/- SEM). **C)** Essais d'induction de l'apoptose de manière synergique par la combinaison de ruxolitinib et de vistusertib pour nos modèles leucémiques et **D)** des lignées cellulaires. Matrice représentant les valeurs du score BLISS pour la combinaison de ruxolitinib et vistusertibe (16 conditions par matrices – chaque condition faite en triplicata technique). **E)** Moyenne de la valeur BLISS des matrices **C** et **D** (fait en duplicata biologiques). **F)** Western blot d'un lysat cellulaire des modèles d'AMKL mCG2-1 et pdxNTF en présence de ruxolitinib (0.7 uM) et de vistusertib (0.5 uM) pendant une heure.

Tableau 5-2 - Valeurs du score synergique Bliss entre des inhibiteurs de la voie JAK-STAT et de la voie PI3K-AKT-mTOR

			Replicat 1		Replicat 2		Mean	
			Most BLISS score synergistic area		Most BLISS score synergistic area		Most BLISS score synergistic area	
mCG2-1	Ruxolitinib	BGT226	9.91	10.49	6.07	6.51	7.99	8.50
		Torin 2	7.71	7.89	4.04	4.29	5.88	6.09
		Vistusertib	15.13	16.05	8.16	8.68	11.64	12.36
	BBT594	Vistusertib	8.22	9.42	2.32	3.96	5.27	6.69
mCG2-2	Ruxolitinib	BGT226	10.69	11.32	5.07	5.36	7.88	8.34
		Torin 2	1.61	4.40	3.45	3.64	2.53	4.02
		Vistusertib	5.99	6.42	6.66	7.21	6.32	6.82
	BBT594	Vistusertib	6.73	6.97	2.94	4.35	4.84	5.66
mN5A	Ruxolitinib	BGT226	12.74	14.42	17.38	18.91	15.06	16.67
		Torin 2	9.88	10.73	9.83	10.96	9.85	10.84
		Vistusertib	31.02	32.04	34.13	35.26	32.57	33.65
	BBT594	Vistusertib	-3.71	-1.70	-0.32	1.17	-2.01	-0.27
pdxNTF	Ruxolitinib	BGT226	9.69	10.94	14.92	16.08	12.30	13.51
		Torin 2	5.93	6.65	4.75	5.64	5.34	6.15
		Vistusertib	14.53	16.00	16.74	18.45	15.63	17.23
	BBT594	Vistusertib	2.46	3.04	9.08	9.98	5.77	6.51
M07e	Ruxolitinib	BGT226	4.64	5.25	2.51	3.02	3.58	4.13
		Torin 2	7.07	7.62	1.47	1.76	4.27	4.69
		Vistusertib	9.36	9.95	4.72	5.28	7.04	7.62
	BBT594	Vistusertib	1.91	2.18	4.42	5.16	3.16	3.67
CHRF	Ruxolitinib	BGT226	11.99	14.09	6.33	7.49	9.16	10.79
		Torin 2	15.97	18.02	3.31	3.87	9.64	10.95
		Vistusertib	11.91	13.45	12.02	13.61	11.96	13.53
	BBT594	Vistusertib	9.26	10.06	12.27	13.76	10.76	11.91
ML2	Ruxolitinib	BGT226	-0.62	-0.21	-0.63	-0.28	-0.62	-0.25
		Torin 2	-0.97	-0.44	-0.47	-0.27	-0.72	-0.36
		Vistusertib	-0.22	-0.09	-0.22	-0.14	-0.22	-0.12
	BBT594	Vistusertib	0.51	1.33	-4.31	-2.12	-1.90	-0.39

5.2.4 Discussion

Bien que l'inhibition de JAK2 par un inhibiteur de type 1 (ruxolitinib, tofacitinib et baricitinib) entraîne l'apoptose de nos modèles d'AMKL humains, cette inhibition présente des effets inopportuns ^{166,461}. Premièrement, l'inhibition de JAK2 par des inhibiteurs de type 1 ne semble induire qu'une modeste réduction de la masse tumorale chez des modèles myéloprolifératifs ⁴⁵⁷. Cela peut être expliqué par le fait que ces cellules s'adaptent à l'inhibition continue de JAK2 en recrutant JAK1 et TYK2 au niveau des récepteurs cytokiniques actifs ⁴⁵⁸.

De plus, puisque les inhibiteurs de type 1 interagissent avec la forme phosphorylée de JAK2, ils entraînent chez les cellules exposées l'accumulation de JAK2 phosphorylé sous une forme inactive. Lors du retrait de l'inhibiteur ou d'une éventuelle perte de son efficacité, JAK2 phosphoryle très rapidement STAT5 ⁴⁷¹. Ce mécanisme est à l'origine de rechutes chez les patients atteints de myélofibrose lors de l'arrêt du traitement par le ruxolitinib ⁴⁷¹⁻⁴⁷³. De plus, l'utilisation d'une dose sous-optimale pourrait expliquer l'augmentation de la prolifération de certaines lignées cellulaires mégacaryoblastiques ⁴⁷⁴.

Ces observations peuvent expliquer en partie certains de nos résultats. Nos modèles leucémiques semblent effectivement montrer une phosphorylation importante de JAK2 concomitante à une perte de phosphorylation de STAT5 en présence de ruxolitinib. De plus, une perte d'efficacité du ruxolitinib en culture ainsi qu'une compensation de l'inhibition de JAK2 par une activation de JAK1 et TYK2 pourraient expliquer le retour de la prolifération cellulaire et la diminution du ratio de cellules apoptotiques de nos modèles leucémiques au quatrième jour d'exposition au ruxolitinib.

Ces observations démontrent les lacunes des inhibiteurs de JAK2 de type 1 lorsqu'utilisés seuls dans le traitement des AML. Dans cette optique, des inhibiteurs de JAK2 de type 2, se liant à la conformation inactive de JAK2, furent développés. Cependant, comparativement aux inhibiteurs de type 1, ces inhibiteurs ne démontrent pas d'avantage dans la réduction de la masse tumorale et présentent de potentiels effets « off-target » ^{475,476}. Nous avons néanmoins étudié l'inhibiteur BBT594 en combinaison avec le vistusertib. Cette combinaison semble moins efficace que la combinaison ruxolitinib-vistusertib afin d'induire l'apoptose de nos modèles. Cependant, il est possible que le BBT594 maintienne son efficacité plus longtemps que le ruxolitinib, mais nous

n'avons pas évalué cette hypothèse. Très peu d'inhibiteurs de JAK2 de type 2 existent à ce jour malgré l'intérêt envers son mécanisme d'action.

À la vue du faible succès de l'inhibition de JAK2 en monothérapie, la recherche d'une voie signalétique coopératrice dans le maintien de la survie cellulaire se présente. Nos résultats vont de pair avec plusieurs études démontrant que l'inhibition combinée d'un inhibiteur des JAK avec un inhibiteur de l'axe PI3K-AKT-mTOR induit l'apoptose de manière synergique^{297,313-317}.

Dans cette étude, nous avons confirmé que la combinaison d'inhibiteurs de la voie JAK-STAT et de l'axe PI3K-AKT-mTOR induisait l'apoptose de manière synergique de nos modèles humains d'AMKL. Cependant, l'effet de ces combinaisons d'agents pharmacologiques n'a pas été étudié chez les cellules normales. Certains groupes ont démontré que l'inhibition de l'axe PI3K-AKT-mTOR n'induisait pas d'effets cytotoxiques importants des cellules normales CD34+ humaines aux doses affectant les échantillons de patient atteint d'AML²⁹⁸.

Dans une étude subséquente, il sera primordial d'inclure une population cellulaire normale telle que des cellules CD34+ isolées de sang de cordon. Cet aspect est essentiel afin d'étudier le potentiel thérapeutique combiné de ces inhibiteurs. Une augmentation de l'éventail de concentration des matrices lors des essais de synergies *in vitro* aiderait à mieux caractériser la dynamique synergique entre le ruxolitinib et le vistusertib. De plus, des études de pharmacocinétiques chez la souris pour chacun de ces composés sont essentielles à une éventuelle étude visant à confirmer l'aspect synergique *in vivo* chez nos modèles leucémiques.

6 Discussion

6.1 Le diagnostic moléculaire

6.1.1 L'importance du diagnostic moléculaire en leucémie pédiatrique

Pendant plusieurs années, les analyses cytogénétiques, morphologiques et cytochimiques ont joué un rôle de premier plan concernant la classification des leucémies. L'arrivée du séquençage de nouvelle génération est venue changer ce paradigme. Cette avancée majeure a permis de mieux comprendre l'organisation du génome humain, notamment en précisant le nombre de gènes, leur positionnement sur les chromosomes ainsi que leur séquence nucléotidique. L'analyse du transcriptome est aujourd'hui la méthode de référence afin d'identifier de nouveaux transcrits de fusion et leur identification est un aspect important du diagnostic des leucémies pédiatriques.

Dans cette thèse, nous avons identifié deux transcrits chimériques chez des nourrissons atteints de leucémie ainsi que plusieurs nouvelles mutations retrouvées en oncologie par séquençage de l'ARN et de l'ADN (exomes)(voir aussi les articles en annexes - Section VIII).

Dans un premier temps, nous avons identifié *BPTF* comme un partenaire de *NUP98* chez un patient atteint d'une leucémie mégacaryoblastique (AMKL). La découverte de ce transcrit chimérique vient préciser l'éventail des partenaires de fusion de *NUP98*. De plus, grâce au séquençage de l'ARN, nous avons pu confirmer que cette leucémie présente bien un profil transcriptomique semblable à celles comportant une fusion *NUP98::KMD5A*. Lors de la confirmation du transcrit chimérique par réaction de RT-PCR, nous avons découvert un deuxième isoforme de la protéine BPTF présentant un second domaine PHD en C-Terminal près du bromodomaine. Cet isoforme présente une grande similitude avec la protéine Nurf301, son homologue chez la drosophile. BPTF présente donc trois domaines de reconnaissance de la chromatine très rapprochés les uns des autres. La découverte de ce nouveau variant permet d'élargir notre compréhension des marques épigénétiques reconnues par cette protéine ³³⁰.

Une bonne compréhension des anomalies génétiques générant un transcrit chimérique, tout comme l'identification des différents variants d'épissage possible entre ces partenaires, permet la génération d'essais de PCR précis pouvant être utilisés afin de suivre la diminution de

l'expression du transcrite de fusion par les cellules de la moelle osseuse chez les patients sous traitement tout comme une réémergence de celui-ci lors d'une rechute.

Dans un second temps, nous avons identifié deux cas de leucémie lymphoblastique (LAL)-B présentant la fusion *ACIN1::NUTM1*. Ces patients présentent une petite portion du gène *ACIN1* en N-terminal, fusionné à la majorité du gène *NUTM1* (NUclear protein in Testis Midline carcinoma 1). Les patients atteints d'une fusion impliquant *NUTM1* font partie d'un sous-groupe émergent de leucémie pédiatrique. Bien que les fusions de *NUTM1* furent précédemment associées avec des carcinomes de la ligne médiane à pronostic réservé, la présence de ces fusions chez les LAL-B semble représenter un sous-groupe de leucémie associé à un pronostic plus favorable ⁴⁷⁷.

Nous avons proposé deux nouveaux essais pouvant permettre d'identifier une leucémie associée à la fusion de *NUTM1*. Puisque l'expression de *NUTM1* est normalement réservée aux cellules testiculaires, l'expression de *NUTM1* constitue un biomarqueur et permet d'identifier les cas probables de leucémie associés à une fusion de ce gène. Cette détection peut être au niveau protéomique par immunohistochimie ou moléculaire par l'analyse de l'ARN (ARNseq, RT-PCR, qRT-PCR, ddPCR).

L'identification des transcrits chimériques ainsi que des différentes mutations coopératives aux leucémies permet une meilleure classification du risque encouru par les patients et peuvent guider les choix associés au traitement ⁴⁷⁸.

6.1.2 L'avancement des technologies et les défis associés au diagnostic moléculaire.

L'arrivée de nouvelles technologies de séquençage, telles que le séquençage par nanopore ainsi que le séquençage de cellules uniques, présente des avantages importants comparativement aux séquençages de type Illumina qui a prédominé dans les dix dernières années.

6.1.2.1 Le séquençage par nanopore

Le séquençage par nanopore permet d'analyser des séquences génétiques beaucoup plus longues que la technologie Illumina (illumina : 2 x 300 pb, Nanopore : jusqu'à 2 Mpb) et permet un assemblage beaucoup plus rapide ⁴⁷⁹. Effectivement, l'identification de fusions à partir d'une

préparation d'ARN provenant de cellules d'un patient leucémique peut être aussi rapide que quelques heures, voir quelques minutes. Cette vitesse impressionnante peut être atteinte par l'analyse en temps réel des données. Cependant, cette technologie génère beaucoup d'erreurs lors de l'identification des acides nucléiques comparativement à la technologie Illumina (taux d'erreur; illumina : <0.1%, Nanopore : 1% à 5%) ⁴⁷⁹.

Dans notre cas, l'identification du nouveau variant du gène *BPTF* fut possible grâce à l'identification et la caractérisation d'une bande inattendue sur un gel d'agarose. L'utilisation du séquençage par nanopore nous permettra d'identifier plus facilement ces nouvelles fusions et variants d'épissage. Il est à noter aussi qu'avec l'arrivée du séquençage par nanopore de nouvelles approches d'analyses bioinformatiques seront à développer, ce qui est crucial afin de mieux comprendre l'hématopoïèse normale et leucémique. Nos travaux ont pu identifier de nouvelles mutations au sein de leucémies pédiatriques cependant nous n'avons pas exploré les mutations touchant les régions intergéniques ainsi que les introns. Ces analyses seront à la portée des futures analyses génétiques.

6.1.2.2 Le séquençage de l'ARN et de l'ADN de cellule unique

Le séquençage de l'ARN et de l'ADN de cellule unique (scARNseq et scADNseq) permet d'étudier un échantillon cellulaire hétérogène sous une approche cellule par cellule. Cette technologie permet de découvrir des populations cellulaires qui sont masquées lors de l'analyse de ces échantillons par la technologie Illumina (bulk sequencing). Les analyses de scARNseq présentent le désavantage d'être imprécis lorsque le nombre de cellules analysées est faible. Puisque cette technologie ne réussit pas à séquencer facilement tout le contenu de l'ARN d'une cellule, plusieurs gènes se retrouveront avec une valeur d'expression égale à zéro ⁴⁸⁰. Ces faux négatifs, aussi appelés « dropout », peuvent être compensés par une imputation des valeurs manquantes se basant sur la similitude entre les cellules au sein de l'échantillon.

Le séquençage de l'ARN à cellule unique permettra une meilleure compréhension de l'hétérogénéité intratumorale, notamment lors du diagnostic ainsi que lors de la génération de modèles leucémiques. Une meilleure compréhension de l'hétérogénéité cellulaire au sein d'un échantillon permettra de clarifier le profile d'expression des cellules leucémiques

comparativement aux cellules normales et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles afin de mieux prévenir les rechutes causées par des cellules leucémiques résistantes qui seraient autrement masquées lors du séquençage selon la technologie Illumina.

La normalisation de l'analyse des résultats provenant du séquençage de type scARNseq est un défi. La génération d'un consensus permettant l'analyse des données de séquençage est importante afin d'assurer la reproductibilité des résultats de recherche ainsi que son inclusion dans un contexte clinique. Une fois cette technologie bien maîtrisée, elle permettra un diagnostic plus rapide ainsi qu'un meilleur suivi des patients tout au long du traitement.

6.2 La génération de modèles leucémiques.

6.2.1 L'importance de la génération de modèles

La recherche sur la leucémie est entravée par le manque de biomasse ainsi que la rareté de certains sous-types de leucémie. Lors d'un diagnostic de leucémie, le patient commence rapidement son traitement et, dans ce contexte, il est difficile de retrouver des cellules leucémiques ayant été prélevées lors du diagnostic pour les besoins de la recherche. De plus, certains sous-types de leucémies, tels que les leucémies mégacaryoblastiques, peuvent présenter une myélofibrose rendant l'aspiration médullaire difficile. Le nombre de cellules obtenue dans ces cas peut alors être limitant. La génération de modèles leucémiques vise, entre autres, à pallier au manque de biomasse pour les besoins de la recherche.

6.2.2 Les modèles de leucémie synthétiques et dérivés de cellules de patients

Les modèles de leucémie dit « synthétique » proviennent de la transformation de cellules hématopoïétiques normales en cellules leucémiques. Cette transformation peut être induite en créant les mutations à fort potentiel oncogénique au sein de celles-ci. La génération de modèles synthétiques a l'avantage de pallier aux problèmes émanant de la rareté de certaines leucémies tel que les AMKL positives aux fusions *NUP98::KDM5A* (N5A) ou *CBFA2T3::GLIS2* (CG2). La possibilité de générer ces modèles à partir de différents contextes génétiques est un avantage majeur de cette approche. Cependant, la génération de modèles synthétiques peut parfois laisser place à des événements inattendus. Par exemple, bien que certaines souris transplantées avec

des cellules CD34+ transduites par la fusion N5A ont généré des AML reproduisant la maladie observée chez les patients, certaines souris ont généré une leucémie de type LAL-B. La fusion N5A n'a pas été retrouvée chez un patient atteint d'une LAL-B à ce jour. Il pourrait s'agir d'un sous-type rare de leucémie ou d'un artéfact issu de la méthodologie utilisée.

Dans le cas où des cellules d'une leucémie primaire sont disponibles, la xénotransplantation de ces cellules chez la souris est l'approche la plus simple afin de générer un modèle. Ce modèle dérivé du patient (pdx) est la méthode la plus utilisée et efficace afin de permettre l'expansion du nombre de cellules leucémiques. Bien que l'aspect technique soit simple, certaines embûches peuvent empêcher la prise de la greffe ainsi que l'expansion des cellules leucémiques chez les souris. Premièrement, l'échantillon transplanté doit être de bonne qualité. Certaines cellules leucémiques sont très fragiles et ne supportent pas la manipulation *ex vivo*. De plus, la dépendance de certaines cellules leucémiques à des cytokines humaines ou à une interaction avec le microenvironnement de la moelle osseuse humaine peuvent entraîner un échec de la greffe chez la souris.

La banque de cellules souches leucémiques du Québec (BCLQ) est une initiative visant à préserver les cellules leucémiques provenant de patients lors du diagnostic ainsi que dans le cas d'une rechute. Cette initiative est primordiale afin de standardiser le prélèvement ainsi que la conservation des cellules leucémiques à des fins de recherche. Dans notre cas, l'accessibilité aux cellules provenant de leucémies lors du diagnostic ainsi que d'éventuelles rechutes est primordiale. De plus, certaines molécules, telles que des agonistes de l'autorenouvellement comme l'UM729 peuvent être utilisées *ex vivo* afin de préserver la capacité des cellules leucémiques provenant de patients à générer un modèle de xénogreffe en souris ¹⁴.

6.2.3 Les caractéristiques recherchées lors de la génération d'un modèle leucémique

Plusieurs caractéristiques sont recherchées lors de l'évaluation d'un nouveau modèle de leucémie. Les modèles leucémiques doivent être représentatifs des leucémies des patients, générer une grande quantité de cellules et pallier à la rareté des cas. De plus, la stabilité génomique du modèle est importante afin de permettre les mesures répétées des différentes expériences.

6.2.3.1 Les modèles doivent être représentatifs des leucémies retrouvées chez les patients.

Premièrement, les modèles leucémiques doivent phénotypier la maladie retrouvée chez les patients. Cette ressemblance est évaluée, entre autres, par des études transcriptomiques, morphologiques et immunophénotypiques.

La morphologie ainsi que l'immunophénotype de nos modèles leucémiques ressemblent grandement aux cellules mégacaryoblastiques retrouvées chez les patients. De plus, l'analyse du profil transcriptomique de nos modèles montrent une forte corrélation entre ces modèles et les spécimens primaires de patients qui présentent des leucémies du même sous-type morphologique et génétique.

Comparativement aux modèles de leucémies dérivées de cellules murines, nos modèles ont l'avantage d'être dérivés de cellules CD34+ humaines isolées de sang de cordon. Puisque nous tentons de générer des modèles leucémiques retrouvés chez les patients de moins de trois ans, les cellules CD34+ isolées de sang de cordon est une population cellulaire pertinente lors de nos essais de transformation, comparativement aux cellules de la moelle osseuse ou de sang mobilisé provenant d'un adulte.

6.2.3.2 Les modèles leucémiques doivent générer une grande biomasse.

Tel que mentionné précédemment, les modèles doivent pallier au manque de cellules leucémiques dont fait face la recherche. À cette fin, un modèle doit permettre la génération d'une grande quantité de cellules.

Dans notre cas, les modèles N5A, NTF ainsi que mCG2-1 et mCG2-2 infiltrent tous la rate des souris et génèrent des splénomégalies. La quantité de cellules générée dans ces cas est très importante et peut atteindre plus de 200 millions de cellules leucémiques par rate de souris.

Cependant, plusieurs essais de modélisation effectués par notre laboratoire ont généré de faibles quantités de cellules à potentiel leucémique. Certaines populations myéloprolifératives n'ont pas permis de régénérer la maladie lors de leur retransplantation en souris secondaires et constituaient possiblement des états pré-leucémiques. Bien que certaines de ces myéloproliférations s'apparentaient aux leucémies des patients basées sur l'analyse du

transcriptome, de l'immunophénotype et de la morphologie, les faibles masses cellulaires obtenues s'avéraient limitantes afin de confirmer leur potentiel d'autorenouvellement.

6.2.4 La pénétrance du phénotype leucémique suivant la transduction lentivirale

Dans notre contexte, suivant la transduction lentivirale de cellules CD34+ par un oncogène de fusion ainsi que la xénotransplantation de ces cellules en souris, la pénétrance réfère à la proportion d'individus/animaux qui présentent un phénotype associé à la leucémie. Plus la pénétrance est élevée, plus il sera facile de conclure sur la force oncogénique de la fusion et d'obtenir des leucémies présentant un contexte génétique diversifié. Dans un cas où la pénétrance est faible, il restera toujours des doutes concernant la nécessité qu'une mutation secondaire soit essentielle à la transformation leucémique. Du même coup, l'ajout d'une mutation coopératrice à la fusion étudié, tel que JAK2-V617F, nous auraient potentiellement permis d'obtenir une plus grande pénétrance du phénotype leucémique lors de nos essais de modélisation ^{165,166}.

Tel que démontré au tableau 1-1, plusieurs expériences de modélisation d'une leucémie mégacaryoblastique ont été tentées en vain et l'un des premiers modèles d'AMKL induite par la fusion CG2 fut effectué par la transduction lentiviral de CG2 chez des cellules de foie fœtal de souris ¹⁶⁵. L'utilisation de cellules CD34 positives isolées de foies fœtaux humain pourrait potentiellement augmenter la pénétrance du phénotype leucémique lors de nos essais de modélisation par transduction lentivirale. Cette population cellulaire présente une plus grande proportion de cellules souches hématopoiétiques que les cellules CD34 positives issues du sang de cordon ³¹. Puisque les AMKL affectent majoritairement les enfants de moins de 3 ans, la cellule à l'origine de la leucémie est potentiellement retrainte dans le temps ¹³⁷.

6.2.4.1 Impact du temps de latence sur la génération de modèles leucémiques

Le temps de latence est décrit comme étant le temps entre la transplantation et l'émergence de la leucémie chez la souris. Le temps de latence dépend de plusieurs variables dont les délais du processus de transformation et la fréquence de cellules souches leucémiques générés et transplantés. Un court temps de latence peut être représentatif d'un processus de transformation rapide et/ou d'une forte pénétrance du phénotype. À l'opposé, un temps de latence plus long

peut laisser supposer que les cellules transduites doivent acquérir une mutation secondaire ou des changements épigénétiques afin de se développer en leucémie. Il est à noter qu'une longue latence (plus de 40 semaines), peut entraîner l'échec d'une expérience de modélisation car les souris peuvent développer des maladies liées à leur âge plutôt qu'à la xénotransplantation. Dans nos expériences, plusieurs souris sont décédées dû à leur âge réduisant ainsi nos chances de générer un modèle leucémique et donc la pénétrance du phénotype recherché (latence mN5A : 21 à 71 semaines, pdxNTF : 28 à 33 semaine, mCG2 : 10 à 36 semaine).

6.2.4.2 Analyse de la clonalité de nos modèles leucémiques et son implication

La clonalité d'une population leucémique réfère au nombre de clones qui la compose. Un clone correspond à l'ensemble des cellules filles dérivant d'une cellule mère unique. Une population monoclonale dérive d'une seule cellule initiale, une population oligoclonale dérive de quelques cellules initiales et finalement la population polyclonale provient d'une multitude de cellules initiales qui peuvent avoir évoluées dans le temps. Afin d'étudier la clonalité, le potentiel des cellules leucémiques doit être évalué de façon individuelle (single cell) ou en ayant recours à des techniques de traçage. Par exemple, les sites d'intégration rétroviraux peuvent agir comme des marqueurs moléculaires de clonalité identifiables par des techniques comme le buvardage de type Southern, le PCR inverse ou le séquençage du génome par nanopore.

Il est important de noter que nos modèles synthétiques et dérivés de patients continuent d'évoluer dans le temps. L'apparition de mutation de manière stochastique au sein des différents modèles peut entraîner une diversification du phénotype. Cette hétérogénéité intra tumorale, tout comme celle retrouvée chez les patients, peuvent entraîner une perte de reproductibilité des expériences subséquentes utilisant ce modèle ^{481,482}. Dans notre contexte de modélisation, il est crucial de surveiller l'intégrité du phénotype original tout au long de la transplantation en série chez la souris.

6.2.4.2.1 Concernant la clonalité de nos modèles synthétiques CG2 et N5A

Dans le cas de la fusion CG2, nous avons généré six modèles leucémiques représentatifs de la leucémie retrouvée chez les patients ¹⁶². Les modèles CG2 générés ne présentaient pas de mutations somatiques ou de petites insertions/délétions potentiellement pathogéniques.

Cependant, quatre modèles leucémiques sur six présentaient des anomalies chromosomiques différentes (CNVs) estimées être présentes dans une grande proportion de cellules (>80%). Ces événements sont arrivés tôt dans le processus de transformation leucémique mais nos travaux ne permettent pas de déterminer s'ils sont contributifs à la maladie.

Afin d'évaluer la clonalité de nos modèles leucémiques CG2-GFP positifs, nous avons effectué le séquençage du génome par nanopore de quatre de nos six modèles. Ce séquençage nous a permis de confirmer que trois leucémies modèles étaient issues d'un clone unique comportant un seul site d'intégration lentiviral alors que la quatrième leucémie modèle était formé d'un ou de deux clones (deux sites d'intégration lentiviraux identifiés).

Dans le cas des leucémies mégacaryoblastiques induites par une translocation du gène *NUP98*, il est difficile de statuer si une mutation coopérative est nécessaire à la transformation leucémique. Bien que plusieurs cas d'AMKL présentant une fusion de *NUP98* démontrent une mutation de *RB1*¹⁴⁸ ou de la voie JAK-STAT^{211,318}, nous n'avons pas retrouvé de mutation coopératrice chez le modèle N5A. Le temps entre la transplantation et la génération de ce modèle étant très long (entre 27 et 71 semaines, moyenne : 48 semaines) combiné avec la faible quantité de cellules transplantées ainsi qu'un faible transfert de gènes suivant la transduction lentiviral pointent vers la génération de leucémies clonales.

6.2.4.2.2 L'analyse de la clonalité du modèles dérivé de patients pdxNTF

Concernant le modèle pdxNTF, ce modèle provient de la xénotransplantation d'un échantillon de moelle osseuse d'un patient. Lors de nos transplantations sériées, nous avons identifié la mutation JAK2-V617F à une fréquence allélique d'environ 50%. Cette mutation ne fut pas détectée chez le patient ainsi que lors de la caractérisation de la première génération de la leucémie pdxNTF. Il est possible que la première génération de souris xénotransplantées comportait une hétérogénéité de clones dans les organes hématopoiétiques et qu'un clone présentant la mutation JAK2-V617F n'ait pas été détectée lors de nos premières analyses. Ce clone pourrait être apparu suivant la transplantation sériée de la leucémie chez la souris.

Puisque les cellules leucémiques ne présentent pas d'intégration lentivirale, l'analyse de la clonalité de ce modèle pdx pourrait être effectué par l'ajout de codes barres génétiques aux

cellules émanant de la première génération. Le suivi des générations de souris suivant la transplantation sériée de ce modèle, couplé à un profond séquençage de l'ADN, pourrait mettre en lumière l'architecture clonale de cette leucémie ⁴⁸². Dans le contexte d'un modèle pdx, la latence est en partie associée avec la capacité des cellules leucémiques à s'adapter et à proliférer chez la souris ainsi que le nombre de cellules souches leucémiques transplantées. Ce passage chez la souris induit nécessairement une forte pression de sélection tel que représenté par les difficultés rencontrées lors des tentatives de génération de modèles pdx ⁴⁸³.

6.2.5 Les difficultés rencontrées lors de la génération de modèles synthétiques de leucémies

Plusieurs paramètres vont influencer les résultats lors des expériences de génération d'un modèle leucémique par transduction lentivirale d'un oncogène de fusion.

6.2.5.1 L'abondance du transcrit chimérique et la transformation leucémique par CG2

Une des hypothèses pouvant expliquer les difficultés rencontrées lors de la génération du modèle CG2 est que les promoteurs utilisés afin d'exprimer la fusion sont trop forts. Dans ce contexte, CG2 serait en surabondance et entraînerait l'apoptose des cellules transduites plutôt que la transformation leucémique.

Cette hypothèse est basée sur le cas de la fusion *RUNX1::RUNX1T1*, une protéine de fusion présentant des domaines NHR ainsi qu'un domaine de liaison à l'ADN, tout comme les portions respectives de *CBFA2T3* et *GLIS2* de la fusion CG2. Il fut récemment démontré qu'une augmentation de l'expression de la fusion *RUNX1::RUNX1T1* pouvait induire l'apoptose des cellules leucémiques ^{484,485}. Cette hypothèse est d'autant plus intéressante puisque *CBFA2T3* ainsi que la fusion *RUNX1::RUNX1T1* peuvent toutes deux interagir avec le complexe associé à *TAL1* formé de *LMO2*, *RUNX1* et *GATA2* ²²¹.

Il est possible que le promoteur *MNDU3*, utilisé par notre laboratoire afin d'induire l'expression de la fusion CG2, entraîne une expression trop élevée de la protéine chimérique menant aux difficultés rencontrées lors de la génération du modèle ³⁷¹. Afin de contrer cette problématique, il serait aussi possible de générer une inversion du chromosome 16 en utilisant les propriétés du système CRISPR-Cas9 en coupant simultanément les gènes *CBFA2T3* et *GLIS2*. Dans ce cas,

puisque *CBFA2T3* maintient son promoteur endogène, il est donc attendu que celui-ci soit exprimé à des niveaux physiologiques s'apparentant à ceux retrouvées chez les patients.

Une faible expression de la fusion CG2 par les cellules leucémiques pourrait expliquer le faible nombre de séquences recoupant les partenaires de fusion retrouvées lors du séquençage de l'ARN de ces patients (résultats non présentés). Des essais de ddPCR, pouvant mesurer l'expression absolue du transcrit chimérique à différentes étapes de la modélisation ainsi qu'au niveau de cellules leucémiques d'échantillons primaires de patient, pourraient nous éclairer sur cette relation entre la transformation leucémique et le niveau d'expression de CG2.

De plus, comparativement à la lignée cellulaire Kasumi *RUNX1::RUNX1T1* positive, où une nouvelle transduction de la fusion *RUNX1::RUNX1T1* entraîne l'apoptose de ces cellules ⁴⁸⁵, il serait possible de valider cette hypothèse par une seconde transduction de la fusion CG2 chez nos modèles leucémiques CG2 positives.

6.2.5.2 Le choix de la population cellulaire servant de base à la modélisation leucémique.

Le choix de la population cellulaire humaine servant à la génération du modèle leucémique est aussi un facteur clé à considérer lors de ces essais. Dans notre cas, nous avons choisi d'utiliser des cellules CD34+ isolées de sang de cordon. Cette population est très hétérogène et est formée de multiples progéniteurs hématopoïétiques. L'utilisation d'une population aussi hétérogène comporte l'avantage d'entraîner l'expression de la fusion chez différents sous-types cellulaires. Cette approche réduit ainsi le risque d'échec causé par l'utilisation d'une population homogène non susceptible à la transformation leucémique. Cependant, l'utilisation d'une population hétérogène pourrait aussi expliquer les différents sous-types de leucémie générés lors des essais de modélisation utilisant la fusion N5A.

De plus, afin de favoriser l'hétérogénéité, nous avons constitué des « pool » cellulaires CD34+ provenant de différents donneurs. Cette dernière considération permet de pallier l'éventualité où l'un des échantillons CD34+ ne soit pas susceptible à la transformation leucémique. Cette approche permet alors de compenser cet échantillon par les autres présents au sein de ce «pool».

Bien que l'utilisation d'une population hétérogène comporte plusieurs avantages, son utilisation a le potentiel de générer des difficultés lors des tentatives de reproduction des résultats.

Plusieurs groupes ont échoué à générer un modèle de LMA par la surexpression de la fusion CG2. Dans ce contexte, nous émettons l'hypothèse que la transformation leucémique doit survenir chez une cellule faisant partie des stades les plus immatures de l'hématopoïèse. Cette hypothèse émane du fait que CBFA2T3, et potentiellement la fusion CG2, interagit avec un complexe protéique composé de sept facteurs de transcription (TAL1, LYL1, LMO2, RUNX1, ERG, FLI1, GATA1/2) afin de bloquer la différenciation des lignées mégacaryocytaires et érythroïdes^{163,486}. Dans ce contexte et afin d'induire un blocage lors de la différenciation méga/érythroïde, la fusion doit être présente chez une cellule immature exprimant les membres du complexe. Puisque l'expression de *TAL1*, *LYL1*, *RUNX1* et *LMO2* est associée aux cellules souches hématopoïétiques, la fusion CG2 n'aurait potentiellement pas d'effet chez les cellules commises n'exprimant pas les membres de ce complexe³⁵.

6.2.5.3 Les essais de modélisation par transduction de transcrit chimérique sont biaisés par le choix du transcrit étudié.

Suivant une translocation chromosomique, les cellules ont le potentiel d'exprimer plusieurs isoformes du même gène de fusion. Ce comportement fut décrit chez les patients présentant la fusion *NUP98::BPTF* ainsi que *ACIN1::NUTM1*. Ces variants d'épissages complexifient grandement les essais de modélisation de la leucémie par transduction de gène chimérique. Dans la plupart des cas, un seul transcrit chimérique est utilisé lors de ces essais. Dans le cas de la modélisation de la leucémie induite par NTF, deux isoformes ont été retrouvés chez le patient. Il n'est pas exclu que les deux isoformes doivent être présents chez la même cellule afin d'induire une transformation leucémique. Cependant, les essais de double transduction se heurtent à la difficulté d'obtenir un transfert de gène important chez les cellules CD34+, réduisant l'attrait pour ces essais.

Puisque les cellules leucémiques peuvent générer différents isoformes et que les essais de modélisation se concentrent généralement sur un seul isoforme à la fois, le choix du transcrit

chimérique à étudier joue un rôle important lors de la caractérisation du potentiel oncogénique de la protéine chimérique ainsi que des applications éventuelles du modèle.

6.3 La caractérisation moléculaire des modèles leucémiques

Une approche « multi-Omique », recoupant la protéomique, la transcriptomique ainsi que la génomique, nous a permis d'avancer de manière importante dans notre compréhension de la leucémie. Cependant, ces approches génèrent une quantité phénoménale de données. Les analyses bio-informatiques sont maintenant essentielles afin d'identifier des schémas d'expression soutenant l'état leucémique.

6.3.1 La caractérisation de nos leucémies a mis en évidence la voie JAK-STAT comme potentielle cible thérapeutique.

Plusieurs indications pointent vers l'importance de la voie JAK-STAT chez les AMKL. Premièrement, les analyses de type GSEA (Gene set enrichment analysis) ont pu démontrer une activation de la voie JAK-STAT chez nos modèles leucémiques mN5A de type mégacaryoblastiques. De plus, l'analyse du surfaceome montre un enrichissement des protéines associées à cette voie à la surface membranaire du modèle pdxNTF. Pour leur part, les modèles mCG2 montrent un enrichissement du CSF2RA, le récepteur du GM-CSF pouvant activer JAK2, tant au niveau transcriptomique que de la protéomique de surface.

In vivo, il est intéressant de noter que le modèle mN5A de type AMKL n'arrive pas à proliférer chez la souris NSG. Les transplantations sériées de ce modèle nécessitent des souris SGM3 qui expriment le GM-CSF, Stem cell factor (SCF) et l'IL3 humains.

De plus, le modèle pdxNTF semble avoir acquis la mutation JAK2-V617F lors des transplantations sériées en souris et nous avons aussi dénoté une dépendance à la THPO de ce modèle placé en culture *in vitro* (résultats non présentés).

Finalement, pour tous nos modèles de types AMKL, nous avons constaté une perte de viabilité importante en présence d'inhibiteurs de la voie de JAK-STAT. En résumé, nos travaux et ceux de d'autres groupes ^{162,166} ont démontré l'importance de cette voie signalétique chez les AMKL.

6.3.2 Les expériences de protéomique ont permis d'identifier de nouveaux biomarqueurs potentiels pour les leucémies AMKL.

La grande quantité de cellules produites par nos modèles a permis d'entreprendre l'étude du protéome de la surface cellulaire (surfaceome) par LC-MS. Puisque la technique du surfaceome nécessite une large biomasse, nous avons d'abord élaboré une expérience visant à comparer nos modèles leucémiques induites par NUP98r et CG2 entre eux. Suivant cette première expérience et désirant avoir une population normale avec laquelle comparer nos résultats, nous avons fait l'analyse du surfaceome des cellules CD34+ normales.

Suivant une analyse exhaustive du profil transcriptionnel des leucémies CG2 positives, que nous avons recoupées avec les données du surfaceome, nous avons identifié 26 protéines différentes comme étant caractéristiques aux leucémies CG2. De ce nombre, plusieurs sont identifiées comme étant prédictives d'un état leucémique initié par CG2 tel que PCDH19, FOLR1, NCAM1 et MEGF10. FOLR1 ainsi que NCAM1 ont été évalués comme étant de potentielles cibles immunothérapeutiques par d'autres équipes cependant, PCDH19 semble être la cible la plus spécifique^{169,416,487,488}. L'expression de *PCDH19* a été confirmée par analyse transcriptomique ainsi que par cytométrie en flux sur tous nos modèles leucémiques mCG2 AMKL. PCDH19 fut aussi retrouvé chez le modèle mCG2-6 qui présente un immunophénotype plutôt érythroblastique, ce qui n'est pas le cas de FOLR1 ou de NCAM1.

Contrairement à *FOLR1* qui est exprimé au niveau de l'épithélium de la tubulure rénale et de l'épithélium pulmonaire¹⁶⁹, l'expression de *PCDH19* est restreinte au niveau cérébral ce qui en fait une cible relativement spécifique pour la leucémie^{488,489}.

En plus de PCDH19, plusieurs autres protéines dont TGM2 et MEGF10 ont été identifiées par les analyses de transcriptomique et de protéomique comme étant spécifiques à la leucémie initiée par CG2. Cependant, il n'y a pas d'anticorps disponibles sur le marché présentement afin de valider leur présence à la surface de nos modèles ainsi que chez les patients. Néanmoins, notre approche non biaisée aura permis de mettre en lumière une multitude de protéines ayant le potentiel d'être utilisées comme biomarqueurs, seules ou en combinaison, afin d'identifier rapidement une leucémie CG2 positive. De plus, nos analyses du protéome de surface des AMKL initiés par NUP98r ainsi que CG2 comparativement aux cellules normales CD34+ isolées du sang

de cordon nous ont permis d'identifier certaines protéines exprimées chez nos leucémies et qui seraient faiblement ou non-exprimées chez les cellules normales. Puisque ces protéines ne sont pas présentes à la surface des cellules normales, ces protéines de surface pourraient servir de potentielles cibles immunothérapeutiques pour des anticorps conjugués à un composé pharmacologique ou pour des cellules CAR-T (Chimeric antigen receptor T-Cells) ^{169,416} .

6.4 La thérapie ciblée des AMKL

Contrairement aux chimiothérapies classiques, la thérapie ciblée a pour but de n'affecter que les cellules leucémiques. L'identification de vulnérabilités thérapeutiques potentielles nécessite une bonne compréhension des mécanismes leucémogéniques.

6.4.1 Identification de cibles thérapeutiques potentielles

Bien comprendre les mécanismes qui sont à l'origine de la leucémie ou soutenant l'état leucémique est primordial afin d'identifier des avenues thérapeutiques ciblant les cellules leucémiques de manière plus spécifique que la chimiothérapie conventionnelle.

Dans le contexte des AML pédiatriques, les protéines chimériques émanant des gènes de fusions sont considérées comme étant elles-mêmes des cibles thérapeutiques potentielles. Comme preuve de concept, l'utilisation d'arsenic trioxyde ainsi que d'acide rétinoïque, afin de traiter les leucémies promyélocyaires initiées par la fusion PML::RARA, entraîne la dégradation de la fusion par le protéasome et a permis d'augmenter le taux de survie à plus de 90% ⁴⁹⁰. Cibler le complexe protéique avec lequel la protéine chimérique interagit, comme dans le cas des inhibiteurs de MEN1 avec KMT2A, est un autre exemple de thérapie ciblée visant les mécanismes soutenant l'état leucémique ⁴⁹¹. Les inhibiteurs de MEN1 sont aussi évalués afin de traiter les leucémies initiées par les fusions de *NUP98* puisque NUP98 interagit avec KMT2A ²⁵¹.

Les modèles de leucémies induites par N5A et NTF que nous avons développés sont d'excellentes plateformes pouvant être utilisées afin de valider une approche ciblant l'interaction de NUP98 avec KMT2A. Le fait d'avoir généré deux modèles présentant une fusion semblable, mais tout de même différente, est un atout de taille afin de trouver une approche thérapeutique affectant les fusions de *NUP98* dans leur ensemble.

Une autre méthode pouvant être utilisées afin d'identifier une cible thérapeutique potentielle est d'identifier des dépendances fonctionnelles chez ces leucémies. Dans notre contexte, l'identification de mutations donnant lieu à une activation constitutive d'une voie signalétique présente l'opportunité de cibler préférentiellement les cellules leucémiques comparativement aux cellules normales. Le fait que certaines mutations soient retrouvées de manières récurrentes chez les leucémies AMKL est aussi un indicateur de l'importance de ces mutations dans le maintien du phénotype leucémique ainsi que la prolifération rapide des cellules blastiques.

6.4.1.1 La comparaison de nos modèles aux cellules normales

Lors de la recherche de cibles thérapeutiques potentielles, il est important de prendre en compte les points de référence auxquels la population cellulaire leucémique sera comparée. Lors de l'analyse de l'expression différentielle entre nos modèles et les cellules normales, nous avons choisi un groupe d'échantillons de cellules CD34+ isolées d'unités de sang de cordon comme point de comparaison. Ces cellules sont tout adaptées afin de représenter un groupe de cellules contrôles dans notre contexte. Premièrement, nos modèles leucémiques sont dérivés de cette population cellulaire et représentent donc un point de référence pertinent pour nos modèles. De plus, ces cellules représentent la population souche et progénitrice normale du système hématopoïétique. Puisque ce sont des cellules que nous voulons préserver, il est donc important de les utiliser comme référence ainsi que comme contrôle lors d'essais pharmacologiques.

Lors de nos analyses comparatives entre les cellules CD34+ isolées de sang de cordon et des modèles leucémiques, plusieurs gènes caractéristiques des cellules mégacaryocytaires ont été identifiés comme des cibles potentielles. L'ajout de cellules mégacaryocytaires normales à différentes étapes de maturation comme contrôles, en plus des cellules CD34+ isolées de sang de cordon, nous permettrait de mieux discriminer les gènes associés au phénotype leucémique de ceux associés à l'identité mégacaryocytaire.

L'intégration de cellules mégacaryocytaires normales à nos expériences devrait idéalement avoir lieu tant au niveau de la caractérisation transcriptomique et protéomique que lors d'essais *in vitro*, par exemple lors de courbes doses-réponses.

6.4.2 L'évaluation de la sensibilité lors des essais de courbes doses-réponses.

Lors de nos courbes doses-réponses, nous avons utilisé le Cell-Titer Glo afin de mesurer quantitativement l'ATP par luminescence. Cette ATP est relative au nombre absolu de cellules présentes dans le puits lors de l'essai. La concentration inhibitrice 50% (IC50) est définie comme la concentration où la quantité d'ATP pour le composé testé est la moitié de la quantité retrouvée chez la condition contrôle. Or cette mesure est imparfaite puisqu'elle est grandement influencée par la vitesse proliférative des cellules en culture tout comme la durée de l'essai ⁴⁹². Certains inhibiteurs, tels que ceux de la voie PI3K-AKT-mTOR, peuvent avoir un effet cytotatique plutôt que cytolytique. Dans ce contexte, ces courbes doses-réponses ne nous permettent pas d'en faire la distinction ⁴⁹³.

De plus, les essais ne comportant qu'un seul point temporel ne permettent pas d'évaluer adéquatement l'apparition de cellules résistantes (la cellule a muté et est devenue résistante) ou persistantes⁴⁵⁸ (la cellule s'est adaptée à l'effet du composé sans développer de mutation) tout comme la perte de l'effet du composé causé par une instabilité de la molécule en milieu aqueux.

Au chapitre 5, nous avons présenté deux situations où la valeur d'IC50 mesurée au jour six ne reflète pas une perte de viabilité engendrée par le composé. Dans le premier cas, les cellules mCG2 ont été exposées à trois inhibiteurs de la voie JAK-STAT à leur concentration IC50 respective. Cependant, ces cellules présentent une très forte viabilité et n'entrent pas en apoptose. Dans le cas des inhibiteurs de l'axe PI3K-ATK-mTOR, ces inhibiteurs induisent majoritairement un effet cytotatique des cellules mCG2 ainsi qu'une faible apoptose de nos modèles NUP98r lors d'une exposition sur trois jours. Ici aussi, la survie des cellules leucémiques n'est pas significativement affectée.

Nos résultats démontrent une forte sensibilité de nos modèles leucémiques aux inhibiteurs de la voie de JAK-STAT. Dans le contexte des inhibiteurs de la voie JAK-STAT, l'inhibition de la prolifération cellulaire ainsi que l'induction de l'apoptose semblent être spécifiques aux modèles d'AMKL comparativement au AML non-AMKL (ML-2). De plus, les cellules CD34+ normaux sont très peu sensibles à l'inhibition de la voie JAK-STAT, ce qui en fait une cible thérapeutique potentiellement intéressante.

6.4.3 L'interprétation des résultats de synergies.

Nous avons effectué un premier essai ayant pour objectif de démontrer une synergie entre les inhibiteurs de la voie JAK-STAT ainsi que de l'axe PI3K-AKT-mTOR par une mesure directe de l'apoptose par cytométrie en flux au jour trois. Cet essai a pu démontrer que, lorsque ces composés sont utilisés en combinaison, ils induisent l'apoptose de manière synergique de nos modèles AMKL.

La lignée cellulaire ML-2, une AML non-AMKL présentant une fusion du gène KMT2A et fortement résistante à l'action du ruxolitinib, a été utilisée comme contrôle. Bien que cette lignée cellulaire présente une faible valeur d'IC50 aux inhibiteurs de l'axe PI3K-AKT-mTOR, elle n'entre pas en apoptose lorsqu'elle se trouve en présence d'une combinaison d'inhibiteurs de la voie JAK-STAT et de l'axe PI3K-AKT-mTOR.

Des essais utilisant des cellules CD34+ isolées de sang de cordon sont nécessaires avant la tenue d'essais *in vivo* afin d'évaluer les effets de cette combinaison chez les cellules hématopoïétiques normales. De plus, il serait intéressant de reprendre ces essais sur une matrice étendue afin de bien évaluer l'effet synergique entre ces composés.

7 Conclusions

Pour conclure, bien que la génération de modèles leucémiques soit très demandante en ressources pour un laboratoire de recherche, les retours suivant la génération d'un tel modèle sont très grands. La génération de modèles synthétiques, tout comme ceux dérivés de patients, est primordiale afin d'initier des projets de recherche d'envergure nécessitant une large biomasse.

Dans cette optique, il est primordial d'étendre les collaborations et les infrastructures nécessaires à la préservation des échantillons de patient lors du diagnostic ainsi que lors d'une rechute. Chacun des échantillons de cellules leucémiques préservés adéquatement représente une opportunité pour la recherche, au grand bénéfice des patients.

Grâce à ces modèles, nous avons pu identifier de nouvelles avenues thérapeutiques potentielles. Ces modèles permettent aussi la tenue d'essais précliniques robustes. De plus, la connaissance fine des protéines présentes à la surface des leucémies à haut risque ouvre la voie à la génération et à l'évaluation de traitements immunothérapeutiques innovants

VIII. Articles annexes

Received: 18 August 2019 | Revised: 23 January 2020 | Accepted: 25 January 2020
DOI: 10.1002/pbc.28215

LETTER TO THE EDITOR

New *MECOM* variant in a child with spontaneously resolving

To the Editor:

Constitutional (germline) heterozygous variants in *MECOM* gene have been described in a total of 27 patients to date.¹⁻⁶ Thrombocytopenia is the main hematological manifestation, reported in all cases (Table S1). A progressive deterioration toward bone marrow failure occurred in 21 of 27 patients, all except two of whom underwent hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) at a median age (range) of 0.9 years (0.25-48). Here, we report a child carrying a previously undescribed *MECOM* variant and presenting an unusual phenotype characterized by a severe neonatal pancytopenia that spontaneously resolved.

The proband was born at term with mild perinatal asphyxia. He presented numerous petechiae, a platelet count inferior to $10 \times 10^9/L$ and a hemoglobin level of 69 g/L, both requiring transfusions. The platelet count only temporarily improved and three more transfusions were required within the first 3 weeks of life (Figure 1A). A thrombocytopenia of $25-30 \times 10^9/L$ lasted until 6 weeks of life, then increased spontaneously, and has surpassed $100 \times 10^9/L$ since the age of 5 months. After the initial red blood cell transfusion, the patient developed a normocytic aregenerative anemia without evidence of hemolysis. An additional red blood cell transfusion at 37 days of life was required (Figure 1B). Hemoglobin counts progressively normalized since. No significant neutropenia was observed (Figure S1). Other cell lines and peripheral blood smear were unremarkable.

Initial workup ruled out infectious and alloimmune contributions. A bone marrow aspiration (performed at 20 days of life) revealed low levels of megakaryocytes with mild dystrophic elements without anomalies of other lineages (Figure S2). Erythroid precursors were normal with regard to proportion (16%) and aspect. Bone marrow karyotype and comparative genomic hybridization were normal. Diepoxybutane-induced chromosome breaking test was negative. A panel-based next-generation sequencing, which covers the entire sequence of 26 genes associated with constitutional thrombocytopenia, was subsequently performed by Connective Tissue Gene Tests (Allentown, PA) on peripheral blood using an Illumina MiSeq sequencer (San Diego, CA). A heterozygote nonsense transversion in exon 12 (c.2376T>A, p.Cys792Term) of the *MECOM* gene was identified (nucleotide sequence depth: 338 reads, 54% showing A allele, Figure 1C) and confirmed by Sanger sequencing. This variant has never been reported in any publication or database. Parental genetic testing revealed a wild-type *MECOM* sequence in both. Full medical evaluation revealed small bilateral clinodactyly of the fifth finger, laryngomalacia, and spiral fracture of the right humerus of unknown etiology. No

card

defic

linen

deve

Tl

EV11

N-te

factc

of h

The

with

diagi

patie

norm

one

The

and:

thro

It co

the l

repo

the j

distii

pote

out

of o

cyto

D

ture

freq

(n =

MEC

ants,

are t

ant i

of th

varia

dom

thesi

locus

acuti

the j

lved

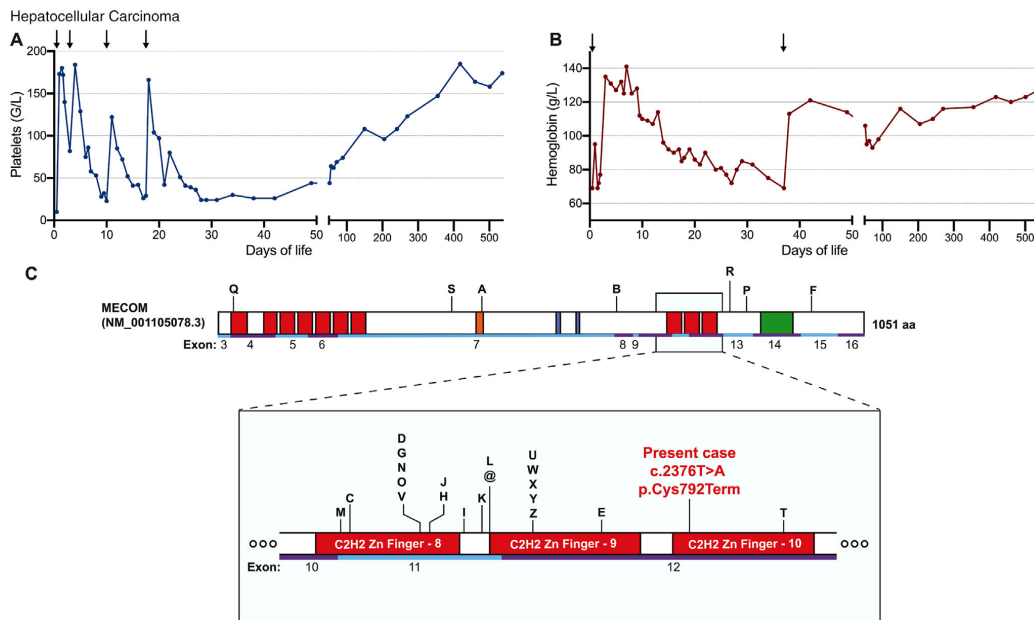


FIGURE 1 A, Evolution of platelets count. Arrows represent the platelets transfusions. The patient received three injections of immunoglobulins without significant impact. The maximum observed platelet counts posttransfusion was $120\text{--}180 \times 10^9/\text{L}$, consistent with a thrombocytopenia of central origin. B, Evolution of hemoglobin level. Arrows represent the red blood cell transfusions. C, Scaled representation of MECCOM coding sequence (NM_001105078.3). Exons are represented in alternation of light blue and purple underscoring the coding sequence. The different protein domains (UniProtKB: Q03112) are presented in color: C2H2 zinc fingers (1–10) in red, nuclear localization signal in orange, CTBP-binding motif in blue and aspartate/glutamate-rich acidic region in green. Previously reported mutations have been shown, the details are described in Table S1. The present case is shown in red overhanging the 10th C2H2 zinc finger

date, two patients have developed a myelodysplasia, requiring HSCT.⁵ No incidence of acute leukemia has been reported.

In conclusion, our report suggests that MECCOM variants may be associated with severe neonatal cytopenias followed by secondary improvement and should thus be searched in cases of unusual presentation. Long-term follow-up and additional case reports will allow to better define the phenotype and the significance of these alterations.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

ORCID

Danna Weizmann <https://orcid.org/0000-0002-6011-3328>

Thomas Pincez <https://orcid.org/0000-0002-9412-333X>

Danna Weizmann^{1,2}

Thomas Pincez^{1,2}

Mathieu Roussy^{1,2}

Nathalie Vaillancourt^{1,2}

Josette Champagne^{1,2}

Caroline Laverdière^{1,2}

¹Division of Pediatric Hematology-Oncology, Charles-Bruneau Cancer Center, CHU Sainte-Justine, Montreal, Quebec, Canada

²Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada

Correspondence

Caroline Laverdière, Division of Pediatric Hematology-Oncology, Charles-Bruneau Cancer Center, CHU Sainte-Justine, 3175 Côte Sainte-Catherine, Montreal, QC H3T 1C5, Canada.
Email: caroline.laverdiere@umontreal.ca

REFERENCES

- Bluteau O, Sebert M, Leblanc T, et al. A landscape of germline mutations in a cohort of inherited bone marrow failure patients. *Blood*. 2017;131:717-732.
- Niihori T, Ouchi-Uchiyama M, Sasahara Y, et al. Mutations in MECCOM, encoding oncoprotein EVI1, cause radioulnar synostosis with amegakaryocytic thrombocytopenia. *Am J Hum Genet*. 2015;97(6):848-854.
- Germeshausen M, Ancliff P, Estrada J, et al. MECCOM-associated syndrome: a heterogeneous inherited bone marrow failure syndrome with amegakaryocytic thrombocytopenia. *Blood Adv*. 2018;2(6):586-596.
- Loganathan A, Munirathnam D, Ravikumar T. A novel mutation in the MECCOM gene causing radioulnar synostosis with amegakary-

- ocytic thrombocytopenia (RUSAT-2) in an infant. *Pediatr Blood Cancer*. 2019;66(4):e27574.
5. Ripperger T, Hofmann W, Koch JC, et al. MDS1 and EVI1 complex locus (MECOM): a novel candidate gene for hereditary hematological malignancies. *Haematologica*. 2018;103(2):e55-e58.
 6. Lord SV, Jimenez JE, Kroeger ZA, et al. A MECOM variant in an African American child with radioulnar synostosis and thrombocytopenia. *Clin Dysmorphol*. 2018;27(1):9-11.
 7. Glass C, Wilson M, Gonzalez R, Zhang Y, Perkins AS. The role of EVI1 in myeloid malignancies. *Blood Cells Mol Dis*. 2014;53(1):67-76.
 8. Kataoka K, Kurokawa M. Ecotropic viral integration site 1, stem cell self-renewal and leukemogenesis. *Cancer Sci*. 2012;103(8):1371-1377.
 9. Kustikova OS, Schwarzer A, Stahlhut M, et al. Activation of Evi1 inhibits cell cycle progression and differentiation of hematopoietic progenitor cells. *Leukemia*. 2013;27(5):1127-1138.
 10. Steinleitner K, Rampetsreiter P, Köffel R, et al. EVI1 and MDS1/EVI1 expression during primary human hematopoietic progenitor cell



IDH1 as a Cooperating Mutation in AML Arising in the Context of Shwachman-Diamond Syndrome

Stéphanie Mourad^{1,2†}, Mélanie Bilodeau^{1†}, Mathieu Roussy^{1,3,4}, Louise Laramée¹, Luc Boulianne⁵, Alexandre Rouette⁶, Loubna Jouan⁶, Patrick Gendron⁷, Michel Duval^{1,3}, Pierre Teira^{1,3}, Josée Hébert^{3,8,9,10}, Henrique Bittencourt^{1,3}, Yves Pastore^{1,3*}, Josette-Renée Landry^{1,3,11*} and Sonia Cellot^{1,3,9*}

¹ Pediatric Hematology-Oncology Division, Charles-Bruneau Cancer Center, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, Montreal, QC, Canada, ² Division of Hematology-Oncology, Montreal Children's Hospital, McGill University, Montreal, QC, Canada, ³ Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada, ⁴ Department of Biomedical Sciences, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada, ⁵ Department of Pathology, McGill University, Montreal, QC, Canada, ⁶ Integrated Centre for Pediatric Clinical Genomics, CHU Sainte-Justine, Montreal, QC, Canada, ⁷ Bioinformatics Core Facility, Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada, ⁸ Division of Hematology, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, QC, Canada, ⁹ Quebec Leukemia Cell Bank, Maisonneuve-Rosemont Hospital, Montreal, QC, Canada, ¹⁰ Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada, ¹¹ Streamline Genomics, Montreal, QC, Canada

OPEN ACCESS

Edited by:

Cyrus Khandanpour,
University Hospital Münster, Germany

Reviewed by:

Michael Alexander Morgan,
Hannover Medical School, Germany
Guru Prasad Maiti,
Oklahoma Medical
Research Foundation, United States

*Correspondence:

Yves Pastore
yves.pastore@umontreal.ca
Josette-Renée Landry
josette@streamlinegenomics.com
Sonia Cellot
sonia.cellot@umontreal.ca

[†] These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Hematologic Malignancies,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

Received: 02 June 2019

Accepted: 30 July 2019

Published: 14 August 2019

Citation:

Mourad S, Bilodeau M, Roussy M, Laramée L, Boulianne L, Rouette A, Jouan L, Gendron P, Duval M, Teira P, Hébert J, Bittencourt H, Pastore Y, Landry J-R and Cellot S (2019) IDH1 as a Cooperating Mutation in AML Arising in the Context of Shwachman-Diamond Syndrome. *Front. Oncol.* 9:772. doi: 10.3389/fonc.2019.00772

Shwachman-Diamond syndrome (SDS) is a rare and systemic disease mostly caused by mutations in the *SBDS* gene and characterized by pancreatic insufficiency, skeletal abnormalities, and a bone marrow dysfunction. In addition, SDS patients are predisposed to develop myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myeloid leukemia (AML), typically during adulthood and associated with *TP53* mutations. Although most SDS diagnoses are established in childhood, the nature and frequency of serial bone marrow cell investigations during the patients' lifetime remain a debatable topic. The precise molecular mechanisms leading to AML progression in SDS patients have not been fully elucidated because the patient cohorts are small and most disease monitoring is conducted using standard histological and cytogenetic approaches. Here we report a rare case of a patient with SDS who was diagnosed with AML at 5 years of age and survived. Intermittent neutropenia preceded the AML diagnostic but serial bone marrow monitoring according to the standard of care revealed no cytogenetic anomalies nor signs of clonal hematopoiesis. Using next generation sequencing approaches to find cytogenetically cryptic pathogenic mutations, we identified the cancer hotspot mutation c.394C>T/p.Arg132Cys in *IDH1* with high variant allelic frequency in bone marrow cells, suggesting clonal expansion of a major leukemic clone karyotypically normal, in the SDS-associated AML. The mutation was somatic and likely occurred at the leukemic transformation stage, as it was not detected in a matched normal tissue nor in bone marrow smear prior to AML diagnosis. Gain-of-function mutations in *IDH1*, such as c.394C>T/p.Arg132Cys, create a neo-activity of isocitrate dehydrogenase 1 converting α -ketoglutarate into the oncometabolite D-2-hydroxyglutarate, inhibiting α -ketoglutarate-dependent enzymes, such as histone and DNA demethylases. Overall, our results suggest that along with previously described abnormalities such as *TP53* mutations or

monosomy7, 7q-, which are all absent in this patient, additional mechanisms including *IDH1* mutations drive SDS-related AML and are likely associated with variable outcomes. Sensitive techniques complementary to standard cytogenetics, such as unbiased or targeted panel-based next generation sequencing approaches, warrant testing for monitoring of myelodysplasia, clonal hematopoiesis, and leukemia in the context SDS. Such analyses would also assist treatment decisions and allow to gain insight into the disease biology.

Keywords: Shwachman-Diamond syndrome, predisposition syndrome, pediatric patient, leukemia, molecular profiling, cooperating mutation

BACKGROUND

Shwachman-Diamond syndrome (SDS) is a rare autosomal recessive bone marrow failure syndrome characterized by exocrine pancreatic insufficiency, bone abnormalities, progressive cytopenia, and predispositions to myelodysplastic syndrome (MDS) and acute myeloid leukemia (AML). The risk of worsening cytopenia(s), clonal myeloid evolution or AML is estimated at 20% by age 18 (1). The Severe Chronic Neutropenia International Registry reported a 1% per year progression rate to MDS/AML in patients with SDS, with a cumulative risk of MDS/AML reaching 36% by 30 years of age (2).

As the median age at diagnosis of SDS-associated AML is reported to be between 18 and 20 years and as the risk of AML increases with age (3), there are very few pediatric cases reported in the literature (<10 to our knowledge in the last 25 years, **Table 1**). As such, the molecular events driving malignant transformation in SDS are poorly described, and recent evidence points to a leukemia promoting bone marrow niche in SDS (6). The scant reported pediatric cases of SDS-related AML in the literature are mostly characterized by patient age, cytogenetic profile, and outcome. To our knowledge, all pediatric reported cases of SDS-associated AML occurred between 2.5 and 13 years of age (2, 4, 5) and had cytogenetic abnormalities discernable on karyotype, with frequent chromosome seven involvement (2, 4, 5). Furthermore, these patients had exceedingly poor outcome with only one reported case of survival in a 13-year-old child with SDS following hematopoietic stem cell transplant for AML [(5); **Table 1**].

In addition to the paucity of pediatric cases of SDS-related AML, limited molecular profiling data are available. A recent report suggests that acquisition of *TP53* mutations are initiating events contributing to the development of MDS/AML in SDS and may confer a poor prognosis (7). However, no other alteration is known to have any prognostic value.

Here we report a unique case of SDS-associated AML in a young pediatric patient, in absence of cytogenetic abnormalities. Using next-generation sequencing approaches to identify cytogenetically cryptic pathogenic mutations, we reveal an acquired somatic mutation in the Isocitrate Dehydrogenase 1 gene (*IDH1*), which is a rare cooperating event in pediatric AML and has never been reported in conjunction with SDS. Gain-of-function mutations in Isocitrate Dehydrogenase 1, an enzyme involved in cell metabolism, are known to modify the epigenetic landscape and to promote cancer progression (8). We propose

that besides *TP53* mutations, additional cytogenetically silent mechanisms drive SDS-related myelodysplastic syndrome or AML, such as *IDH1* mutations, and next generation sequencing approaches may benefit the hematological evaluation and risk classification of patients.

CASE PRESENTATION

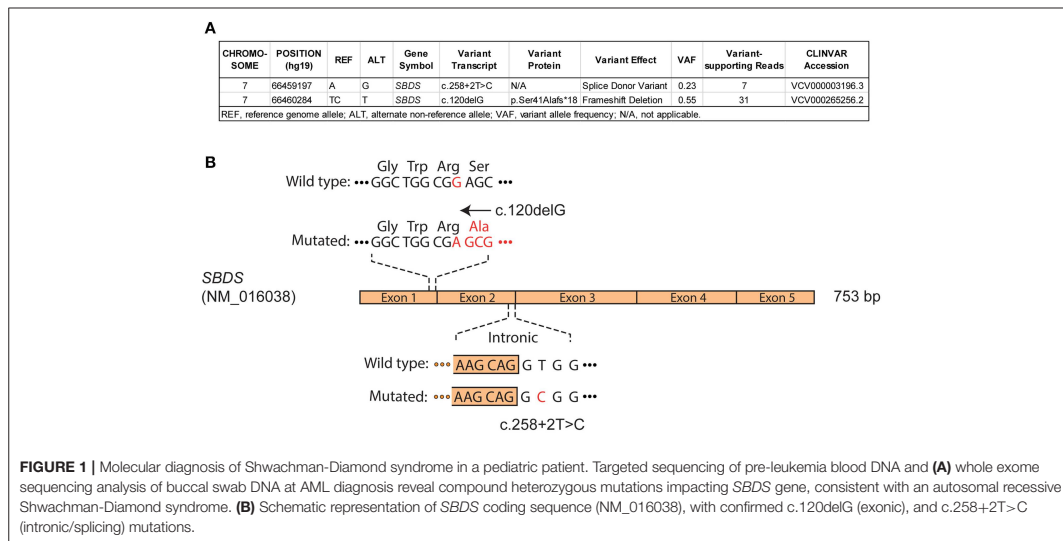
A male infant was investigated at 7 months of life with failure to thrive secondary to exocrine pancreatic insufficiency, hypotonia, musculoskeletal congenital anomalies (syndactyly of toes, abnormally short ribs) and intermittent neutropenia with an absolute neutrophil count fluctuating between $0.8 \times 10^9/L$ and $4.2 \times 10^9/L$, suggesting a diagnosis of SDS. The patient had an unremarkable medical family history and was referred to genetic counseling at the age of 1 year. The genetic basis of SDS was confirmed by sequencing of blood/buccal swab-derived DNA revealing two compound heterozygous mutations of the *SBDS* gene (intron 2 c.258+2T>C and exon 1 c.120delG (p.Ser41fs) (**Figures 1A,B**). He was followed with serial bone marrow aspirations, biopsies, and cytogenetic analysis, until the age of 5.5 years when he developed worsening cytopenia and his bone marrow evaluation revealed infiltration by 47.4% myeloblasts with underlying multilineage dysplasia (**Figure 2A**). These changes were compatible with a diagnosis of AML (M0, per FAB classification), with blasts expressing CD45^{dim}, CD34⁺, CD33⁺, CD117⁺, DR⁺, MPO⁺, CD15⁺, CD13^{partial} on flow cytometry and with a normal karyotype (46,XY) on cytogenetic analysis (**Figures 2B,C**).

He was treated with a first cycle of induction chemotherapy (cytarabine, daunorubicin, etoposide), but minimal residual disease (MRD) remained positive at 0.4%, as assessed by flow cytometry at the end of the cycle. He pursued treatment with a second cycle consisting of high-dose cytarabine and etoposide, after which he achieved MRD negativity and proceeded to hematopoietic stem cell transplant. A first attempt with intra-osseous cord blood transplant following busulfan, fludarabine, and anti-thymocyte globulin (ATG) was unsuccessful with persistent aplasia. A second attempt with an alternate cord blood unit also failed to engraft after conditioning with total body irradiation, cyclophosphamide and fludarabine. Finally, the patient underwent a matched unrelated donor bone marrow transplant following conditioning with cyclophosphamide, fludarabine, and ATG. Hematopoietic

TABLE 1 | Reported cases of pediatric SDS-related AML in the literature between 1994 and 2019.

Reference	Case	Age at diagnosis of AML (year)	AML FAB classification	Cytogenetics	Outcome
Donadieu et al. (2)	1	2.5	AML with MDS-related changes FAB M2	Monosomy 7 (no further details)	Death, no HSCT
	2	7.3	AML with MDS-related changes FAB M6	45,XY,del(5)(q?q?),add(9)(q?), +11,add(17)(p?), -20,+22	Death, HSCT complicated by viral infections
	3	6	AML with preceding MDS FAB M4	46,XY,add(7)(q31)[15]/46,XY [1].ish der(7)t(1;7)(q32;q31)	Death, no HSCT
Smith et al. (4)	4	11	AML with preceding MDS FAB M5	47,XY, 1,del(9)(q22)	Death
	5	4.5	AML with preceding MDS FAB M5	47, XY, der(7)t(4;7)(q31;q11),+21 [13]	Death
	6	8	AML with preceding MDS FAB M2	46,XY,add(11)(p?), -15, -22, +mar1, +mar2	Death
	7	6	AML with preceding MDS FAB M6	Not assessed	Death
Valli et al. (5)	8	13	AML with preceding MDS FAB NA	46,XY,der(6)t(3;6)(q26.3;q16.1)[13]	Alive, post HSCT
	9	9	AML with preceding MDS FAB NA	45,XX,der(7)t(7;18)(p11;?),-18 [7]/43,XX,der(5)t(5;6)(q?28;q?13),der(6)t(6;13)(q21;q?13),der(7)t(7;18)(p11;?),-13,der(15)t((del(15)(q22);22)(p11.2;p11.2),-18 [14]	Death

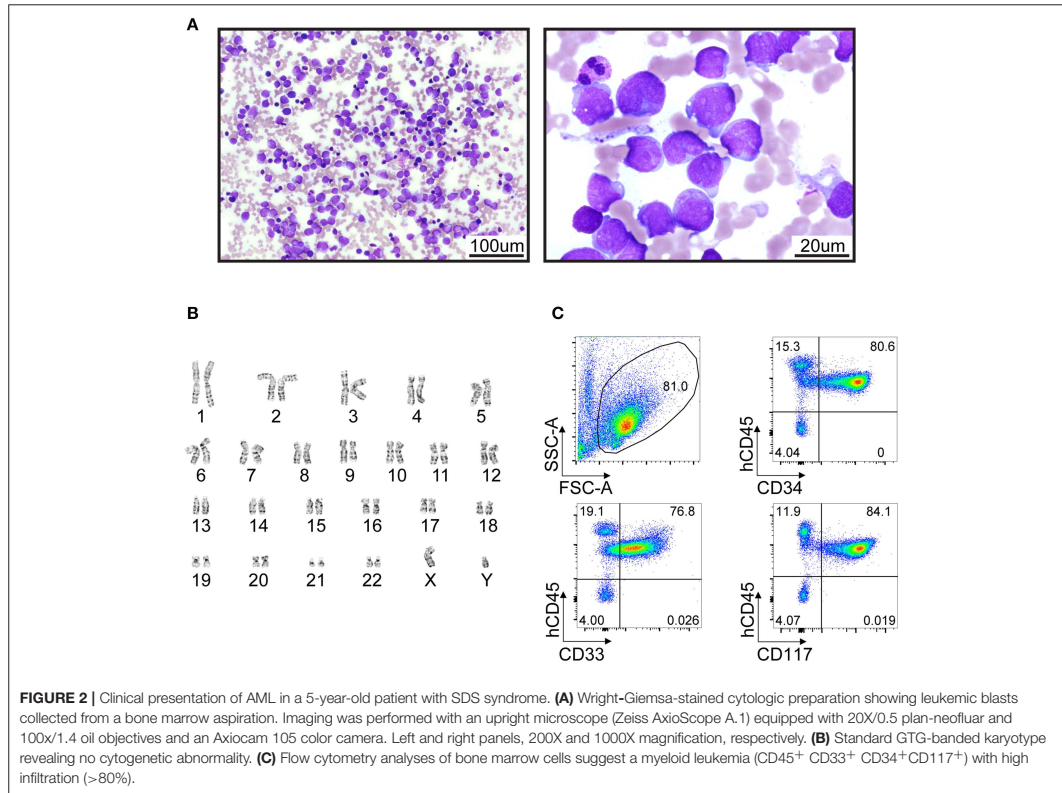
SDS, Shwachman-Diamond; AML, acute myeloid leukemia; MDS, myelodysplastic syndrome; HSCT, hematopoietic stem cell transplant; FAB, French-American-British classification of AML; NA, not available; ?, questionable identification of a chromosome or chromosome structure.



engraftment was successful and the patient remains in first complete remission 5.5 years post-transplant (11-year-old).

Given his young age at diagnosis of SDS-associated AML and the lack of clonal cytogenetic anomalies, we searched for

discrete oncogenic alterations such as indels and point mutations. First, array-based comparative genomic hybridization (aCGH) analysis did not reveal chromosomal copy-number abnormalities (data not shown) in leukemic cells, consistent with a normal

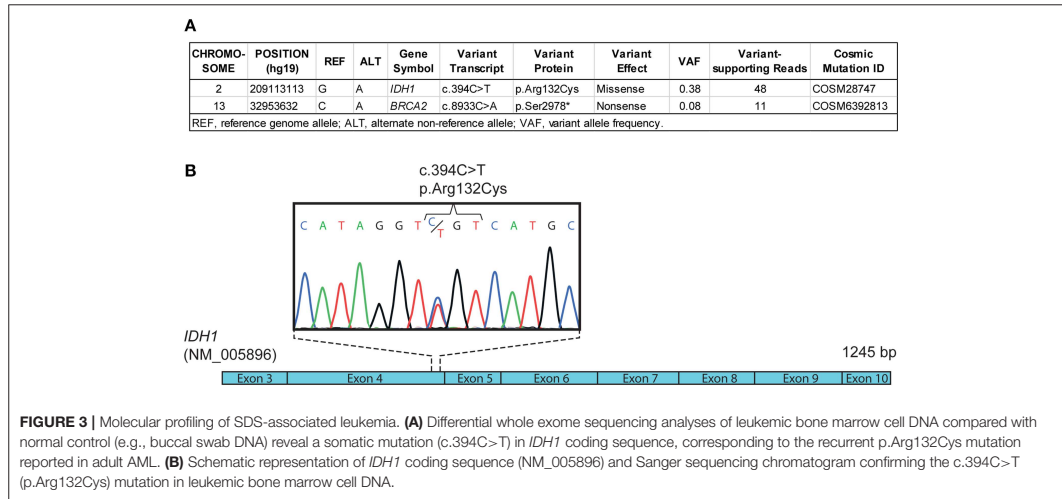


karyotype. Then, whole exome and transcriptome sequencing were performed using bone marrow cells at diagnosis. A point mutation in *IDH1* (c.394C>T/p.Arg132Cys), reported to be pathogenic and recurrent in adult AML and other cancer types (8), was identified both by exome and transcriptome sequencing, with both wild-type and mutant alleles expressed at 45 and 55%, respectively (Figure 3A, Figure S1 and data not shown). The mutation was confirmed by Sanger sequencing (Figure 3B). Whole exome sequencing of buccal swab DNA confirmed that the *IDH1* mutation was somatic in origin as it was not found in a matched normal tissue (Figure S1). Somatic mutation of *IDH1* defined a major leukemic clone (variant allele fraction of 0.38 for a specimen with ~80% leukemic infiltration) while a minor clone with a mutation in *BRCA2* (variant allele fraction of 0.08) was also detected (Figure 3A). No fusion transcripts were identified from RNA sequencing reads using two different fusion detection tools (data not shown). The *TP53* gene was devoid of somatic alterations according to whole exome sequencing analysis (420X and 70X average coverage for leukemic bone marrow sample and buccal swab DNA, respectively, not shown). To estimate the timing of *IDH1* mutation appearance, we performed NGS on DNA material

obtained from scraping fixed bone-marrow smears, archived 6 months prior to AML diagnosis. *IDH1* c.394C>T (p.Arg132Cys) mutation was not detected in any of the 44 sequencing reads obtained spanning that position, indicating that the mutation was not present or below our detection threshold 6 months prior to AML diagnosis (Figure S1). These results suggest a cooperative role of *IDH1* somatic mutation in SDS-related AML progression, and warrant further mechanistic and multicenter clinical studies. Overall, these molecular analyses suggest that next-generation sequencing may reveal clonal evolution in cytogenetically normal SDS-associated myelodysplasia/leukemia as well as cooperating mutations.

DISCUSSION

SDS is a ribosomopathy characterized by genomic instability contributing to the occurrence of chromosomal abnormalities and therefore to the risk of malignant transformation to MDS/AML. Characterization of high-risk clonal chromosomal abnormalities remains a challenge, as some patients only develop transient genetic alterations devoid of malignant potential. The most commonly encountered chromosomal anomalies in



SDS comprise isochromosome 7 (i(7)(q10)), resulting in a gain of long arm of chromosome 7 (7q), and deletion 20q (del(20)(q)) (5), not typically associated with initiating events in leukemogenesis. Deletion 20q has not yet been reported to have malignant transformation potential, unless associated with other cytogenetic changes (9). Overall, the risk of MDS/AML in patients with SDS increases with age and varies considerably according to the acquired cytogenetic abnormalities, with complex karyotypes seemingly conferring an increased risk of malignant transformation (2).

SDS being a rare disorder, thorough understanding of SDS-related AML has remained limited due to the small number of patients, especially in pediatrics. Given the heterogeneity of MDS/AML progression in patients with SDS, we postulated that acquired cooperating somatic mutations must contribute to malignant transformation. This should be especially true for pediatric patients in whom the risk of SDS-related MDS/AML is considerably lower than in adults, prompting our investigations for this case. The unique presentation of an SDS-associated AML in a young pediatric patient lacking chromosomal rearrangements and any pathogenic *TP53* mutation confirmed this hypothesis and revealed a cooperating genetic mutation in the Isocitrate Dehydrogenase 1 gene (*IDH1*), associated with promoting leukemia.

IDH1 encodes a key cytoplasmic and peroxisomal enzyme of the Krebs cycle responsible for the catalyzation of isocitrate to α -ketoglutarate while reducing NADP to NADPH and liberating CO₂ (8). The mutant *IDH1* enzyme acquires a novel molecular function by which it converts α -ketoglutarate to the oncometabolite D-2-hydroxyglutarate (8). D-2-hydroxyglutarate inhibits the α -ketoglutarate-dependent enzymes that regulate epigenetic modeling, collagen synthesis and cell signaling (10). *IDH1* mutations have been found to be rare in pediatric AML (~1–2%) (11–13), but to be present at a higher frequency

in pediatric AML with a normal karyotype (~5%) (11). They have also been reported at the leukemic transformation of myeloproliferative diseases (14, 15) and, combined with *IDH2* mutations, to be present in ~5% of MDS patients (16). Somatic mosaic mutations of *IDH1* have been detected in hematologic malignancies (BCP-ALL and AML) of children with Maffucci syndrome, a non-hereditary disorder characterized by multiple enchondromas and hemangiomas (17, 18). In adult, detection of somatic mutations in *IDH1* in peripheral blood DNA is highly predictive of a future leukemia development (19).

To the best of our knowledge, we present the first case of oncogenic *IDH1* mutation identified in SDS-associated AML. Pediatric AML associated with *IDH1* mutations present a favorable overall survival (13) compared with adult AML with *TP53* alterations (20), but large multicentric cohort of patients will be necessary to better stratify the genetic subsets and outcomes of SDS-associated leukemia. This study reports one of the only cases of pediatric SDS-related AMLs who achieved complete remission and survived, raising the interesting hypothesis that it is ultimately the genetic makeup of the leukemia that impacts prognosis in the context of SDS, and not the underlying cancer predisposition syndrome in itself.

CONCLUSIONS

The discovery of a cooperating *IDH1* mutation in SDS-associated AML illustrates the necessity to refine surveillance for malignant transformation in this condition. Standard cytogenetic analyses may fail to detect single nucleotide genetic alterations driving clonal hematopoiesis and leukemic progression. Additional sensitive techniques, such as unbiased or targeted panel-based next generation sequencing approaches, would benefit

the monitoring of myelodysplasia, clonal hematopoiesis, and leukemia in the context SDS. The genetic landscape of SDS-related AML should be evaluated to establish the disease-risk stratification, to assist treatment decisions and ultimately to gain insight into the biology of a rare malignancy.

DATA AVAILABILITY

This manuscript contains previously unpublished data. The name of the repository and accession number(s) are not available at the time of publication but will be available upon request.

ETHICS STATEMENT

The Institutional Review Board of CHU Sainte-Justine approved the study and informed consent was obtained from the parents.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SM, J-RL, MB, AR, and SC wrote the manuscript. SM, J-RL, MB, MR, LL, and AR generated the figures and table. SM, J-RL, MB, MR, LL, LB, AR, LJ, and PG contributed to experiments and analyses. YP, MD, PT, HB, and SC were in charge of the patient. JH and SC supervised the biobanking resource. All authors revised and approved the manuscript.

FUNDING

This work was supported through a CCSRI impact grant (#705047) (SC) and a CCS-Cole Foundation Grant (#705474) (SC, JH). SC was recipient of a Charles Bruneau Foundation

REFERENCES

- Hashmi SK, Allen C, Klaassen R, Fernandez CV, Yanofsky R, Shreck E, et al. Comparative analysis of Shwachman-Diamond syndrome to other inherited bone marrow failure syndromes and genotype-phenotype correlation. *Clin Genet.* (2011) 79:448–58. doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01468.x
- Donadieu J, Fenneteau O, Beaupain B, Beauflis S, Bellanger F, Mahlaoui N, et al. Classification of and risk factors for hematologic complications in a French national cohort of 102 patients with Shwachman-Diamond syndrome. *Haematologica.* (2012) 97:1312–9. doi: 10.3324/haematol.2011.057489
- Myers KC, Davies SM, Shimamura A. Clinical and molecular pathophysiology of Shwachman-Diamond syndrome: an update. *Hematol Oncol Clin North Am.* (2013) 27:117–28. doi: 10.1016/j.hoc.2012.10.003
- Smith OP, Hann IM, Chessells JM, Reeves BR, Milla P. Haematological abnormalities in Shwachman-Diamond syndrome. *Br J Haematol.* (1996) 94:279–84. doi: 10.1046/j.1365-2141.1996.d01-1788.x
- Valli R, De Paoli E, Nacci L, Frattini A, Pasquali F, Maserati E. Novel recurrent chromosome anomalies in Shwachman-Diamond syndrome. *Pediatr Blood Cancer.* (2017) 64:e26454. doi: 10.1002/pbc.26454
- Zambetti NA, Ping Z, Chen S, Kenswil KJG, Mylona MA, Sanders MA, et al. Mesenchymal inflammation drives genotoxic stress in hematopoietic stem cells and predicts disease evolution in human pre-leukemia. *Cell Stem Cell.* (2016) 19:613–27. doi: 10.1016/j.stem.2016.08.021
- Xia J, Miller CA, Baty J, Ramesh A, Jotte MRM, Fulton RS, et al. Somatic mutations and clonal hematopoiesis in congenital neutropenia. *Blood.* (2018) 131:408–16. doi: 10.1182/blood-2017-08-801985
- Raineri S, Mellor J. IDH1: linking metabolism and epigenetics. *Front Genet.* (2018) 9:493. doi: 10.3389/fgene.2018.00493
- Maserati E, Pressato B, Valli R, Minelli A, Sainati L, Patitucci F, et al. The route to development of myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukaemia in Shwachman-Diamond syndrome: the role of ageing, karyotype instability, and acquired chromosome anomalies. *Br J Haematol.* (2009) 145:190–7. doi: 10.1111/j.1365-2141.2009.07611.x
- Cairns RA, Mak TW. Oncogenic isocitrate dehydrogenase mutations: mechanisms, models, and clinical opportunities. *Cancer Discov.* (2013) 3:730–41. doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0083
- Andersson AK, Miller DW, Lynch JA, Lemoff AS, Cai Z, Pounds SB, et al. IDH1 and IDH2 mutations in pediatric acute leukemia. *Leukemia.* (2011) 25:1570–7. doi: 10.1038/leu.2011.133
- Bolouri H, Farrar JE, Triche T Jr, Ries RE, Lim EL, Alonzo TA, et al. The molecular landscape of pediatric acute myeloid leukemia reveals recurrent structural alterations and age-specific mutational interactions. *Nat Med.* (2018) 24:103–12. doi: 10.1038/nm.4439
- Damm F, Thol F, Hollink I, Zimmermann M, Reinhardt K, van den Heuvel-Eibrink MM, et al. Prevalence and prognostic value of IDH1 and IDH2 mutations in childhood AML: a study of the AML-BFM and DCOG study groups. *Leukemia.* (2011) 25:1704–10. doi: 10.1038/leu.2011.142
- Tefferi A, Lasho TL, Abdel-Wahab O, Guglielmelli P, Patel J, Caramazza D, et al. IDH1 and IDH2 mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis. *Leukemia.* (2010) 24:1302–9. doi: 10.1038/leu.2010.113

ACKNOWLEDGMENTS

We are sincerely grateful for the support received from the patients and their families, as well as from the members of the pediatric hematology-oncology team of CHU Sainte-Justine. We thank Virginie Saillour, Charles Privé, and René Allard of the Integrated Center for Pediatric Clinical Genomics at CHU Sainte-Justine for their contribution with whole exome sequencing and Jennifer Huber at IRIC (Institute for Research in Immunology and Cancer) for her appreciated assistance with RNA sequencing. We are grateful to colleagues of the hematology-oncology division of CHU Sainte-Justine and members of the BCLQ (Banque de cellules leucémiques du Québec) for their contribution to biobanking initiative. We thank Dr. Emmanuelle Lemyre and France Léveillé for the clinical cytogenetics and the team of genetic counseling at CHU Sainte-Justine.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2019.00772/full#supplementary-material>

15. Green A, Beer P. Somatic mutations of IDH1 and IDH2 in the leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med.* (2010) 362:369–70. doi: 10.1056/NEJMc0910063
16. Sperling AS, Gibson CJ, Ebert BL. The genetics of myelodysplastic syndrome: from clonal haematopoiesis to secondary leukaemia. *Nat Rev Cancer.* (2017) 17:5–19. doi: 10.1038/nrc.2016.112
17. Akiyama M, Yamaoka M, Mikami-Terao Y, Ohyama W, Yokoi K, Arakawa Y, et al. Somatic mosaic mutations of IDH1 and NPM1 associated with cup-like acute myeloid leukemia in a patient with Maffucci syndrome. *Int J Hematol.* (2015) 102:723–8. doi: 10.1007/s12185-015-1892-z
18. Hirabayashi S, Seki M, Hasegawa D, Kato M, Hyakuna N, Shuo T, et al. Constitutional abnormalities of IDH1 combined with secondary mutations predispose a patient with Maffucci syndrome to acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* (2017) 64:e26647. doi: 10.1002/pbc.26647
19. Desai P, Mencia-Trinchant N, Savenkov O, Simon MS, Cheang G, Lee S, et al. Somatic mutations precede acute myeloid leukemia years before diagnosis. *Nat Med.* (2018) 24:1015–23. doi: 10.1038/s41591-018-0081-z
20. Hou HA, Chou WC, Kuo YY, Liu CY, Lin LI, Tseng MH et al. TP53 mutations in *de novo* acute myeloid leukemia patients: longitudinal follow-ups show the mutation is stable during disease evolution. *Blood Cancer J.* (2015) 5:e331. doi: 10.1038/bcj.2015.59

Conflict of Interest Statement: J-RL is a founder and has ownership stake in Streamline Genomics.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Mourad, Bilodeau, Roussy, Laramée, Boulianne, Rouette, Jouan, Gendron, Duval, Teira, Hébert, Bittencourt, Pastore, Landry and Cellot. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Gray Zone Lymphoma Arising in the Neck of a Teenager With a Germline Mutation in *TP53*

Sophie Gatineau-Sailliant, MD,* Karine Turcotte, MD, PhD,†
Marie-Claude Quintal, MD,‡ Sophie Turpin, MD,§ Josette Champagne, MD,*
Tony Petrella, MD,|| Mathieu Roussy, BSc,¶ Sonia Cellot, MD, PhD,¶
and Dorothée Bouron-Dal Soglio, MD, PhD†

Summary: Gray zone lymphoma is an aggressive disease for which appropriate management is still debated. We report a 15-year-old girl with a cervical mass, an enlarged ipsilateral tonsil, and anemia. Both sites showed hypermetabolism on F18-FG positron emission tomography/CT. Surgical resection was diagnostic of Epstein-Barr virus–negative gray zone lymphoma cervical and tonsillar involvement. No abnormality was found in cytogenetic analysis on tumor cells. However, exome sequencing in peripheral blood DNA revealed a germline mutation in *TP53*. Complete response was achieved after surgery and 6 cycles of rituximab with dose-adjusted etoposide, prednisone, vincristine, cyclophosphamide, and doxorubicin regimen.

Key Words: gray zone lymphoma, pediatric, Li-Fraumeni syndrome (*J Pediatr Hematol Oncol* 2019;41:e405–e408)

Gray zone lymphoma (GZL) is an unclassified B-cell lymphoma, unclassified, which has features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) and classical Hodgkin lymphoma (CHL). GZL was initially added as a provisional entity in the World Health Organization¹ (WHO) classification in 2008 and is currently formally part of the 2017 WHO classification. It shows overlapping clinical and histopathologic characteristics between DLBCL and CHL. Affected patients are usually between 20 and 40 years of age, with a male predominance in younger adults. In total, 20% of reported cases have been associated with Epstein-Barr virus (EBV). A mediastinal mass with associated involvement of supraclavicular lymph nodes is a frequent presentation. GZL involving extramediastinal sites is more often observed in older patients.¹ Tonsillar infiltration, as reported in the current case, has never been described^{2,3} in GZL. The diagnosis of GZL is based on the dichotomy between the morphology and the

immunophenotype. It may present the morphology of: (1) nodular sclerosis type CHL with preserved B-cell immunomarkers and loss of CD15 expression; or (2) DLBCL with diffuse proliferation of large B cells expressing B-cell markers in addition to strong and homogenous CD30 positivity accompanied by CD15 positivity.

The similarities between DLBCL, CHL, and GZL are also shown at the molecular level. Breaks in *CH11A* (16p13.13), amplification of *REL* (2p15), *JAK2* (9p24), and *PDL2* (9p24.1), are frequent molecular alterations found in all 3 of these entities. In addition, the methylation profile of GZL is intermediate between CHL and DLBCL.^{1,4}

The distinction between DLBCL, CHL, and GZL is very important to make as the latter has a poorer clinical outcome than either DLBCL or CHL.¹ We present a challenging case of GZL in a teenage girl with an atypical tonsillar and cervical presentation. The rarity of this pathology in pediatrics and the lack of consensus for the management of patients with GZL prompted us to present this case.

CLINICAL CASE

A 15-year-old white girl, with no previous personal or family medical history, was seen in the oncology outpatient clinic of our institution for progressively enlarging right cervical adenopathy over a period of 4 months, associated with an enlarged right tonsil. No improvement was noted after antibiotic treatment for group A beta-hemolytic *Streptococcus*. EBV peripheral serology was negative and clinical investigation showed a microcytic anemia (persistent microcytosis still in investigation). LDH levels in the blood were normal. The patient did not present any B symptoms. Subsequent neck ultrasound and computed tomography (CT) scan showed a 3.0×1.8 cm right cervical lymph node with enlarged right tonsil. Both sites showed significant hypermetabolism at F18-FDG-PET/CT scan (Fig. 1) with no other abnormalities. The patient underwent a lymph node resection with bilateral tonsillectomy.

Histopathologic examination revealed a cervical lymph node increased in size with total effacement of the normal architecture by lymphoid nodules of various size surrounded by fibrous bands (Fig. 2A). Numerous atypical cells of increased size were identified in high density within the lymphoid nodules. These cells had either the morphology of immunoblasts, Hodgkin cells, or Reed-Sternberg cells (Fig. 2B). There were no lacunar cells. The background was composed of small lymphocytes with sparse epithelioid histiocytes. Plasmacytes and eosinophils were rare, and no necrosis foci were observed. Morphologic analysis of the right tonsil revealed a partial effacement of the architecture by a lesion identical to the one observed in the cervical lymph node. The left tonsil was normal. Immunohistochemical analysis revealed that all pleomorphic cells strongly expressed CD20 and CD79a (Fig. 3A). The majority of them, especially the Reed-Sternberg-like cells, expressed CD30 (Fig. 3B). Most of the atypical cells were positive for BCL-6, Ki-67, MUM-1, and PAX-5, whereas PAX-5 showed variable intensity. However, the atypical cells were negative for CD15, ALK-1, and CD3. The lymphocytic background was composed essentially of small T

Received for publication March 7, 2018; accepted June 1, 2018.

From the Departments of *Haematology-Oncology; †Anatomical Pathology; ‡Pediatric Surgery; §Nuclear Medicine; ¶Charles Bruneau Cancer Center, University Hospital Center Ste-Justine, Research Center Montreal University; and ||Department of Anatomical Pathology, Maisonneuve Hospital, Montréal, QC, Canada.

The authors declare no conflict of interest.

Reprints: Dorothée Bouron-Dal Soglio, MD, PhD, Department of Anatomical Pathology, University Hospital Center Ste-Justine, 3175 Chemin de la Côte-Sainte-Catherine, Montréal, QC, Canada, H3T 1C4 (e-mail: dorothée.dal_soglio.hs@ssss.gouv.qc.ca).

Supplemental Digital Content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's website, www.jp-online.com.

Copyright © 2018 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

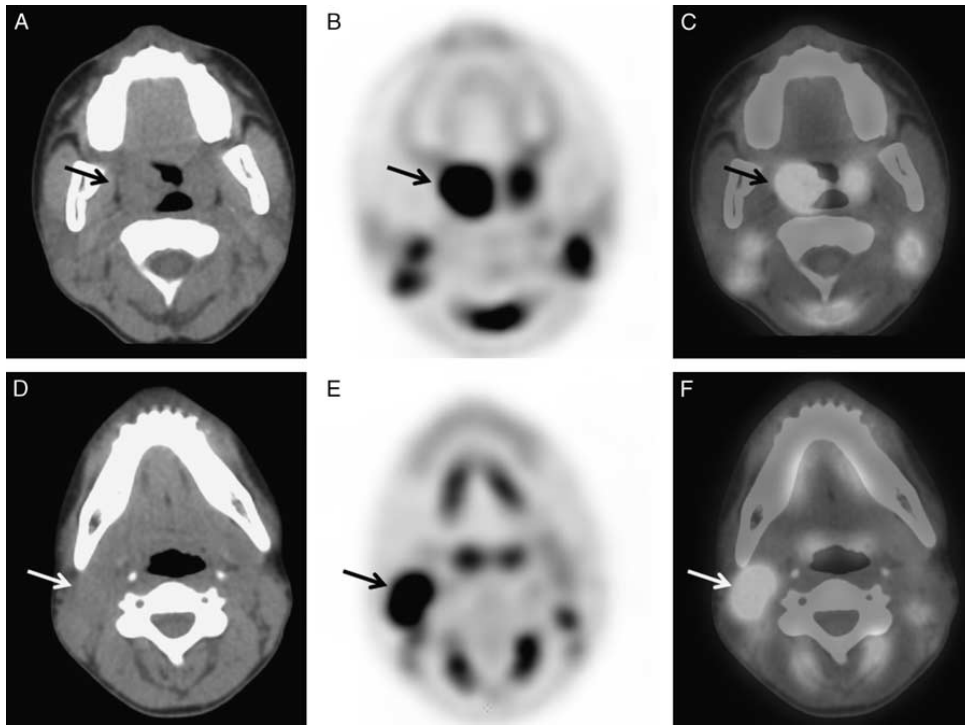


FIGURE 1. F18-FDG-PET/CT showing an enlarged right tonsil (arrow) measuring 25×25 mm with SUV max of 17.3 (A: CT; B: PET; C: fused PET/CT) and right station II-A adenopathy (arrow) measuring 17×26 mm with SUV max of 14.5 (D: CT; E: PET; F: fused PET/C). The remaining whole-body PET/CT (not shown) was normal. CT indicates computed tomography; FDG, fluorodeoxyglucose; max, maximum; PET, positron emission tomography; SUV, standard uptake value.

lymphocytes that were mostly CD3+, CD4+ with only a minority of CD8+ cells. A few isolated cells expressed CD56 and CD57. In situ hybridization with EBV probe was negative. Cytogenetic analysis of the tumor cells did not identify any abnormality. However, a germline *TP53* mutation was identified in exome sequencing of DNA isolated from peripheral blood. Heterozygous mutation c.638G>A (p. Arg213Gln) in exon 6, which encode the core DNA-binding domain of *TP53* gene,⁵ was confirmed using Sanger sequencing (Fig., Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/JPHO/A267>). A complementary immunohistochemical analysis with an anti-p53 antibody was performed on the lymph node specimen but was not contributive with only a small amount of positive atypical cells, including Reed-Sternberg-like cells. There was no infiltration of lymphoma cells in bone marrow aspirate and biopsy specimens.

On the basis of these findings, the patient was diagnosed with stage II unclassified cervical B-cell lymphoma, with intermediate features between CHL and DLBCL associated with Li-Fraumeni syndrome. She received 6 cycles of rituximab, etoposide, prednisone, vincristine, cyclophosphamide, and doxorubicin regimen (DA-EPOCH-R), from March to June 2017. Complete metabolic response was obtained after surgery and 2 chemotherapy cycles. At the time of the last follow-up in February 2018, the patient was still in remission. Verbal consent was obtained from the patient and her father for the case report publication.

DISCUSSION

GZL is a rare type of lymphoma in the adult population, and even less frequent in children and adolescents. In fact, only rare case reports of GZL have been reported in

the literature and among these, only 1 case of extramediastinal GZL in a 17-year-old patient has been published in 2015.^{6,7}

The term GZL was first used in 1998 to describe lymphomas borderline between CHL and other types of lymphomas.⁸ In 2008, mediastinal GZL was first included in the WHO classification as a provisional entity named B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and CHL. Even though the mediastinal form of GZL was the first to be described, extramediastinal GZL is also now a well-recognized presentation.⁹ The extramediastinal GZL seems to be associated with older age at diagnosis, more frequent bone marrow involvement, >1 extranodal site, and advanced disease at diagnosis. EBV is detected in 20% of GZL in adult patients.¹⁰ Lymphoma is one of the most common childhood malignancies but with tonsillar involvement being rare^{2,11} especially in GZL. In addition, GZL has never been reported in association with LFS. This syndrome is generally associated with an increased risk of various solid malignancies, including sarcoma, carcinoma, melanoma, and glioma. An increased risk of leukemia and lymphoma is also reported but with a lower prevalence (3% of lymphomas in children carrying *TP53* mutation¹²). Lymphoma subtypes in patients with LFS are poorly documented. Unlike the case of our patient, the Arg213Gln *TP53* germline mutation was previously associated with a relative late-onset of the disease in a family carrying this mutation.¹³

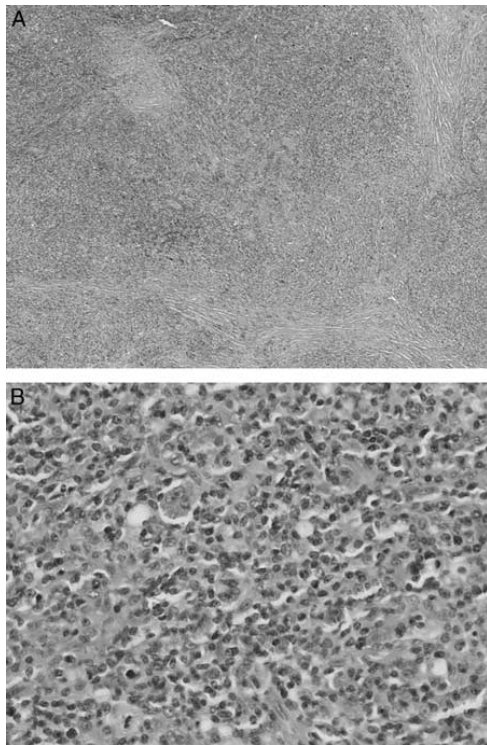


FIGURE 2. Cervical lymph node. A, Effacement of architecture by lymphoid nodules surrounded by fibrous bands (HES, $\times 50$). B, Numerous atypical cells with morphology of immunoblasts, Hodgkin cells, or Reed-Sternberg cells (HES, $\times 400$). HES indicates hematoxylin eosin safran.

Because of the rarity of GZL and its heterogeneity, there are no management guidelines. Among the 112 adults with GZL treated across 19 North American centers, between 2001 and 2012, common front-line treatment were rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone (R-CHOP) 46%; doxorubicin, bleomycin, vinblastine, dacarbazine (ABVD) 30%; and DA-EPOCH-R 10%. Approximately two thirds of these patients received rituximab as part of front-line therapy. The use of radiotherapy was recommended in cases of localized disease, bulky disease, or refractory/relapsed mediastinal GZL.¹⁴ Refractory/relapsed GZL patients seemed to be successfully salvaged by hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), usually autologous.^{9,14} The use of targeted therapy was limited, but brentuximab vedotin could have some efficacy in CD30+ relapsed/refractory GZL, as it does in CD30+ relapsed/refractory DLBCL.¹⁵

In the study by Evens et al,⁹ a 2-year progression-free survival and overall survival were 40% and 88%, respectively. Outcomes were similar in mediastinal and extramediastinal presentations. In total, 33% of these patients had primary refractory disease. Outcomes were better with a DLBCL chemotherapy regimen (DA-EPOCH-R or R-CHOP) than with a CHL chemotherapy regimen (ABVD), with a 2-year progression-free survival of 52% versus 22%, respectively. Good performance status and low stage were highly prognostic for better survival.

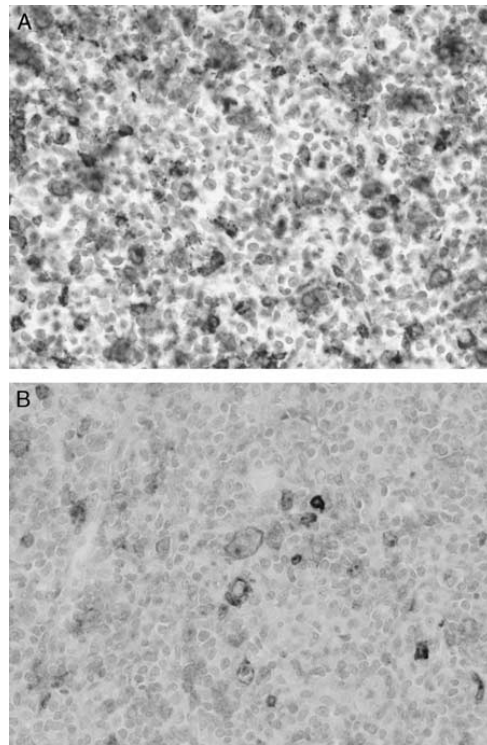


FIGURE 3. A, The tumor cells are strongly CD20 positive (CD20, $\times 400$). B, The tumor cells (Reed-Sternberg-like) express CD30 (CD30, $\times 400$).

Other independent good prognostic factors were the presence of CD20 and the use of rituximab. Relapse rates were relatively high but patients with relapsed/refractory GZL seemed to be successfully salvaged by second-line therapy, including HSCT. HSCT, usually autologous, was associated with an improved outcome, with 2-year overall survival of 88% for patients who underwent HSCT compared with 67% for patients who did not.

Sarkozy et al¹⁶ presented a retrospective series of 99 patients with mediastinal GZL. They showed that patients treated with a standard regimen (R-CHOP/ABVD) had a worse prognosis than those treated with a more intensive regimen (high-dose R-CHOP/escalated BEACOPP with bleomycin, etoposide, doxorubicin, cyclophosphamide, vincristine, procarbazine). They also demonstrated that for patients in complete remission, radiotherapy did not have an impact on prognosis.

Because of the rarity of this lymphoma, it is difficult to establish the optimal treatment. Moreover, it is not clear that any of these treatments could induce a long-term remission. Longer follow-up is warranted to detect later relapses and to determine patient-related quality of life issues.

In our case, the GZL was localized, extramediastinal, and the surgical resection was complete, with a complete metabolic remission postsurgery and chemotherapy. Radiotherapy was not used as front-line treatment in this case because of the satisfactory surgical local control, the early normalization of fluorodeoxyglucose positron emission tomography/CT scan,

and because of the additional potential risk from a large cervical irradiation field as well as the risk of a secondary tumor associated with TP53 germline mutation. Close follow-up of this patient is warranted to detect a potential relapse or any other cancer associated with LFS.

In conclusion, when a case of B-cell lymphoma presents with asynchrony between the morphology and the immunophenotype, with characteristics of both CHL and DLBCL, the pathologist should be alerted to the fact that it might be a GZL even if this diagnosis is exceptional in pediatrics, as this entity requires more aggressive treatment and confers a worse prognosis than for CHL and DLBCL.

REFERENCES

1. Swerdlow SH. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues Revised*, 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017.
2. Guimaraes AC, de Carvalho GM, Bento LR, et al. Clinical manifestations in children with tonsillar lymphoma: a systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2014;90:146–151.
3. Niemiec M, Stryjewska-Makuch G, Janik M, et al. Head and neck lymphomas—a retrospective ten-year observation. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2017;21:66–69.
4. Jaffe ES. *Hematopathology*, 2nd ed. Philadelphia, PA: Elsevier; 2017.
5. Malkin D. Li-fraumeni syndrome. *Genes Cancer*. 2011;2:475–484.
6. Oschlies I, Burkhardt B, Salaverria I, et al. Clinical, pathological and genetic features of primary mediastinal large B-cell lymphomas and mediastinal gray zone lymphomas in children. *Haematologica*. 2011;96:262–268.
7. Magyari F, Barna S, Miltenyi Z, et al. Histopathological difficulties in an adolescent lymphoma patient. *Pathol Oncol Res*. 2015;21:213–217.
8. Rudiger T, Jaffe ES, Delsol G, et al. Workshop report on Hodgkin's disease and related diseases ("grey zone" lymphoma). *Ann Oncol*. 1998;9:S31–S38.
9. Evens AM, Kanakry JA, Sehn LH, et al. Gray zone lymphoma with features intermediate between classical Hodgkin lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma: characteristics, outcomes, and prognostication among a large multicenter cohort. *Am J Hematol*. 2015;90:778–783.
10. Elsayed AA, Satou A, Eladl AE, et al. Grey zone lymphoma with features intermediate between diffuse large B-cell lymphoma and classical Hodgkin lymphoma: a clinicopathological study of 14 Epstein-Barr virus-positive cases. *Histopathology*. 2017;70:579–594.
11. Sayed K, Van Savell H Jr, Hutchison RE, et al. Review of tonsillar lymphoma in pediatric patients from the pediatric oncology group: what can be learned about some indications for microscopic examination? *Pediatr Dev Pathol*. 2005;8:533–540.
12. Bougeard G, Renaux-Petel M, Flaman JM, et al. Revisiting Li-Fraumeni Syndrome from TP53 mutation carriers. *J Clin Oncol*. 2015;33:2345–2352.
13. Ruijs MW, Verhoef S, Wigbout G, et al. Late-onset common cancers in a kindred with an Arg213Gln TP53 germline mutation. *Fam Cancer*. 2006;5:169–174.
14. Kritharis A, Pilichowska M, Evens AM. How I manage patients with grey zone lymphoma. *Br J Haematol*. 2016;174:345–350.
15. Jacobsen E, Pozdnyakova O, Redd R, et al. Imatinib mesylate lacks efficacy in relapsed/refractory peripheral T cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2015;56:993–998.
16. Sarkozy C, Molina T, Ghesquieres H, et al. Mediastinal gray zone lymphoma: clinico-pathological characteristics and outcomes of 99 patients from the Lymphoma Study Association. *Haematologica*. 2017;102:150–159.

IX. Références bibliographiques

1. Till JE, Mc CE. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res.* Feb 1961;14:213-22.
2. Wu AM, Till JE, Siminovitch L, McCulloch EA. Cytological evidence for a relationship between normal hemopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid system. *J Exp Med.* Mar 1 1968;127(3):455-64. doi:10.1084/jem.127.3.455
3. Lepault F, Ezine S, Gagnerault MC. T- and B-lymphocyte differentiation potentials of spleen colony-forming cells. *Blood.* 1993;81(4):950-955. doi:10.1182/blood.V81.4.950.950
4. Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies. *J Cell Comp Physiol.* Dec 1963;62:327-36. doi:10.1002/jcp.1030620313
5. Becker AJ, Mc CE, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature.* Feb 2 1963;197:452-4. doi:10.1038/197452a0
6. Bowie MB, McKnight KD, Kent DG, McCaffrey L, Hoodless PA, Eaves CJ. Hematopoietic stem cells proliferate until after birth and show a reversible phase-specific engraftment defect. *J Clin Invest.* Oct 2006;116(10):2808-16. doi:10.1172/JCI28310
7. Cheng Y, Luo H, Izzo F, et al. m(6)A RNA Methylation Maintains Hematopoietic Stem Cell Identity and Symmetric Commitment. *Cell Rep.* Aug 13 2019;28(7):1703-1716 e6. doi:10.1016/j.celrep.2019.07.032
8. Park SM, Deering RP, Lu Y, et al. Musashi-2 controls cell fate, lineage bias, and TGF-beta signaling in HSCs. *J Exp Med.* Jan 13 2014;211(1):71-87. doi:10.1084/jem.20130736
9. Catlin SN, Busque L, Gale RE, Guttero P, Abkowitz JL. The replication rate of human hematopoietic stem cells in vivo. *Blood.* Apr 28 2011;117(17):4460-6. doi:10.1182/blood-2010-08-303537
10. Orford KW, Scadden DT. Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nat Rev Genet.* Feb 2008;9(2):115-28. doi:10.1038/nrg2269
11. Essers MA, Offner S, Blanco-Bose WE, et al. IFNalpha activates dormant haematopoietic stem cells in vivo. *Nature.* Apr 16 2009;458(7240):904-8. doi:10.1038/nature07815
12. Murray LJ, Young JC, Osborne LJ, Luens KM, Scollay R, Hill BL. Thrombopoietin, flt3, and kit ligands together suppress apoptosis of human mobilized CD34+ cells and recruit primitive CD34+ Thy-1+ cells into rapid division. *Exp Hematol.* Jun 1999;27(6):1019-28. doi:10.1016/s0301-472x(99)00031-4
13. Boitano AE, Wang J, Romeo R, et al. Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. *Science.* Sep 10 2010;329(5997):1345-8. doi:10.1126/science.1191536
14. Pabst C, Kros J, Fares I, et al. Identification of small molecules that support human leukemia stem cell activity ex vivo. *Nat Methods.* Apr 2014;11(4):436-42. doi:10.1038/nmeth.2847
15. Majeti R, Park CY, Weissman IL. Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. *Cell Stem Cell.* Dec 13 2007;1(6):635-45. doi:10.1016/j.stem.2007.10.001
16. Fares I, Chagraoui J, Gareau Y, et al. Pyrimidoindole derivatives are agonists of human hematopoietic stem cell self-renewal. *Science.* Sep 19 2014;345(6203):1509-12. doi:10.1126/science.1256337
17. Chagraoui J, Girard S, Spinella JF, et al. UM171 Preserves Epigenetic Marks that Are Reduced in Ex Vivo Culture of Human HSCs via Potentiation of the CLR3-KBTBD4 Complex. *Cell Stem Cell.* Jan 7 2021;28(1):48-62 e6. doi:10.1016/j.stem.2020.12.002

18. Subramaniam A, Zemaitis K, Talkhonchek MS, et al. Lysine-specific demethylase 1A restricts ex vivo propagation of human HSCs and is a target of UM171. *Blood*. Nov 5 2020;136(19):2151-2161. doi:10.1182/blood.2020005827
19. Cellot S, Hope KJ, Chagraoui J, et al. RNAi screen identifies Jarid1b as a major regulator of mouse HSC activity. *Blood*. Aug 29 2013;122(9):1545-55. doi:10.1182/blood-2013-04-496281
20. Pelham-Webb B, Polyzos A, Wojenski L, et al. H3K27ac bookmarking promotes rapid post-mitotic activation of the pluripotent stem cell program without impacting 3D chromatin reorganization. *Mol Cell*. Apr 15 2021;81(8):1732-1748 e8. doi:10.1016/j.molcel.2021.02.032
21. Eaves CJ. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood*. Apr 23 2015;125(17):2605-13. doi:10.1182/blood-2014-12-570200
22. Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell*. Feb 3 2012;10(2):120-36. doi:10.1016/j.stem.2012.01.006
23. Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol*. Jan 2007;7(1):19-30. doi:10.1038/nri1996
24. Ash P, Loutit JF, Townsend KM. Osteoclasts derived from haematopoietic stem cells. *Nature*. Feb 14 1980;283(5748):669-70. doi:10.1038/283669a0
25. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. Mar 9 2000;404(6774):193-7. doi:10.1038/35004599
26. Kondo M, Weissman IL, Akashi K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*. Nov 28 1997;91(5):661-72. doi:10.1016/s0092-8674(00)80453-5
27. Cheung AM, Nguyen LV, Carles A, et al. Analysis of the clonal growth and differentiation dynamics of primitive barcoded human cord blood cells in NSG mice. *Blood*. Oct 31 2013;122(18):3129-37. doi:10.1182/blood-2013-06-508432
28. Miller PH, Knapp DJ, Eaves CJ. Heterogeneity in hematopoietic stem cell populations: implications for transplantation. *Curr Opin Hematol*. Jul 2013;20(4):257-64. doi:10.1097/MOH.0b013e328360aaf6
29. Velten L, Haas SF, Raffel S, et al. Human haematopoietic stem cell lineage commitment is a continuous process. *Nat Cell Biol*. Apr 2017;19(4):271-281. doi:10.1038/ncb3493
30. Laurenti E, Gottgens B. From haematopoietic stem cells to complex differentiation landscapes. *Nature*. Jan 24 2018;553(7689):418-426. doi:10.1038/nature25022
31. Notta F, Zandi S, Takayama N, et al. Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science*. Jan 8 2016;351(6269):aab2116. doi:10.1126/science.aab2116
32. Perie L, Duffy KR, Kok L, de Boer RJ, Schumacher TN. The Branching Point in Erythro-Myeloid Differentiation. *Cell*. Dec 17 2015;163(7):1655-62. doi:10.1016/j.cell.2015.11.059
33. Tober J, Koniski A, McGrath KE, et al. The megakaryocyte lineage originates from hemangioblast precursors and is an integral component both of primitive and of definitive hematopoiesis. *Blood*. Feb 15 2007;109(4):1433-41. doi:10.1182/blood-2006-06-031898
34. Xu MJ, Matsuoka S, Yang FC, et al. Evidence for the presence of murine primitive megakaryocytopoiesis in the early yolk sac. *Blood*. Apr 1 2001;97(7):2016-22.
35. Calvanese V, Capellera-Garcia S, Ma F, et al. Mapping human haematopoietic stem cells from haemogenic endothelium to birth. *Nature*. Apr 2022;604(7906):534-540. doi:10.1038/s41586-022-04571-x
36. Potts KS, Sargeant TJ, Markham JF, et al. A lineage of diploid platelet-forming cells precedes polyploid megakaryocyte formation in the mouse

- embryo. *Blood*. Oct 23 2014;124(17):2725-9. doi:10.1182/blood-2014-02-559468
37. Vitrat N, Cohen-Solal K, Pique C, et al. Endomitosis of Human Megakaryocytes Are Due to Abortive Mitosis. *Blood*. 1998;91(10):3711-3723. doi:10.1182/blood.V91.10.3711
38. Wright JH. The Origin and Nature of the Blood Plates. *The Boston Medical and Surgical Journal*. 1906;154(23):643-645. doi:10.1056/nejm190606071542301
39. Popescu DM, Botting RA, Stephenson E, et al. Decoding human fetal liver haematopoiesis. *Nature*. Oct 2019;574(7778):365-371. doi:10.1038/s41586-019-1652-y
40. Cortegano I, Serrano N, Ruiz C, et al. CD45 expression discriminates waves of embryonic megakaryocytes in the mouse. *Haematologica*. Sep 2019;104(9):1853-1865. doi:10.3324/haematol.2018.192559
41. Aylon Y, Michael D, Shmueli A, Yabuta N, Nojima H, Oren M. A positive feedback loop between the p53 and Lats2 tumor suppressors prevents tetraploidization. *Genes Dev*. Oct 1 2006;20(19):2687-700. doi:10.1101/gad.1447006
42. Ganem NJ, Cornils H, Chiu SY, et al. Cytokinesis failure triggers hippo tumor suppressor pathway activation. *Cell*. Aug 14 2014;158(4):833-848. doi:10.1016/j.cell.2014.06.029
43. Roy A, Lordier L, Pioche-Durieu C, et al. Uncoupling of the Hippo and Rho pathways allows megakaryocytes to escape the tetraploid checkpoint. *Haematologica*. Dec 2016;101(12):1469-1478. doi:10.3324/haematol.2016.149914
44. Abe-Suzuki S, Kurata M, Abe S, et al. CXCL12+ stromal cells as bone marrow niche for CD34+ hematopoietic cells and their association with disease progression in myelodysplastic syndromes. *Lab Invest*. Nov 2014;94(11):1212-23. doi:10.1038/labinvest.2014.110
45. Scurfield G, Radley JM. Aspects of platelet formation and release. *Am J Hematol*. 1981;10(3):285-96. doi:10.1002/ajh.2830100308
46. Wagner N, Mott K, Upcin B, Stegner D, Schulze H, Ergun S. CXCL12-Abundant Reticular (CAR) Cells Direct Megakaryocyte Protrusions across the Bone Marrow Sinusoid Wall. *Cells*. Mar 24 2021;10(4)doi:10.3390/cells10040722
47. de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, et al. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature*. Jun 16 1994;369(6481):533-8. doi:10.1038/369533a0
48. Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, et al. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med*. Jan 2004;10(1):64-71. doi:10.1038/nm973
49. Lockett WP. Origin and differentiation of the yolk sac and extraembryonic mesoderm in presomite human and rhesus monkey embryos. *Am J Anat*. May 1978;152(1):59-97. doi:10.1002/aja.1001520106
50. Ivanovs A, Rybtsov S, Welch L, Anderson RA, Turner ML, Medvinsky A. Highly potent human hematopoietic stem cells first emerge in the intraembryonic aorta-gonad-mesonephros region. *J Exp Med*. Nov 21 2011;208(12):2417-27. doi:10.1084/jem.20111688
51. Lehnertz B, Chagraoui J, MacRae T, et al. HLF expression defines the human hematopoietic stem cell state. *Blood*. Dec 23 2021;138(25):2642-2654. doi:10.1182/blood.2021010745
52. Mikkola HK, Orkin SH. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development*. Oct 2006;133(19):3733-44. doi:10.1242/dev.02568
53. Charbord P, Tavian M, Humeau L, Peault B. Early ontogeny of the human marrow from long bones: an immunohistochemical study of hematopoiesis and its microenvironment [see comments]. *Blood*. 1996;87(10):4109-4119. doi:10.1182/blood.V87.10.4109.bloodjournal87104109

54. O'Byrne S, Elliott N, Rice S, et al. Discovery of a CD10-negative B-progenitor in human fetal life identifies unique ontogeny-related developmental programs. *Blood*. Sep 26 2019;134(13):1059-1071. doi:10.1182/blood.2019001289
55. Ivanovs A, Rybtsov S, Ng ES, Stanley EG, Elefanty AG, Medvinsky A. Human haematopoietic stem cell development: from the embryo to the dish. *Development*. Jul 1 2017;144(13):2323-2337. doi:10.1242/dev.134866
56. Muench MO, Kapidzic M, Gormley M, et al. The human chorion contains definitive hematopoietic stem cells from the fifteenth week of gestation. *Development*. Apr 15 2017;144(8):1399-1411. doi:10.1242/dev.138438
57. Palis J. Ontogeny of erythropoiesis. *Curr Opin Hematol*. May 2008;15(3):155-61. doi:10.1097/MOH.0b013e3282f97ae1
58. Sankaran VG, Orkin SH. The switch from fetal to adult hemoglobin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. Jan 1 2013;3(1):a011643. doi:10.1101/cshperspect.a011643
59. Copley MR, Babovic S, Benz C, et al. The Lin28b-let-7-Hmga2 axis determines the higher self-renewal potential of fetal haematopoietic stem cells. *Nat Cell Biol*. Aug 2013;15(8):916-25. doi:10.1038/ncb2783
60. Amoah A, Keller A, Emini R, et al. Aging of human hematopoietic stem cells is linked to changes in Cdc42 activity. *Haematologica*. Feb 1 2022;107(2):393-402. doi:10.3324/haematol.2020.269670
61. Pang WW, Price EA, Sahoo D, et al. Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 13 2011;108(50):20012-7. doi:10.1073/pnas.1116110108
62. Pearce DJ, Anjos-Afonso F, Ridler CM, Eddaoudi A, Bonnet D. Age-dependent increase in side population distribution within hematopoiesis: implications for our understanding of the mechanism of aging. *Stem Cells*. Apr 2007;25(4):828-35. doi:10.1634/stemcells.2006-0405
63. Bernitz JM, Kim HS, MacArthur B, Sieburg H, Moore K. Hematopoietic Stem Cells Count and Remember Self-Renewal Divisions. *Cell*. Nov 17 2016;167(5):1296-1309 e10. doi:10.1016/j.cell.2016.10.022
64. Notta F, Doulatov S, Laurenti E, Poepl A, Jurisica I, Dick JE. Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science*. Jul 8 2011;333(6039):218-21. doi:10.1126/science.1201219
65. Szilvassy SJ, Humphries RK, Lansdorp PM, Eaves AC, Eaves CJ. Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 1990;87(22):8736-40. doi:10.1073/pnas.87.22.8736
66. Jones RJ, Celano P, Sharkis SJ, Sensenbrenner LL. Two phases of engraftment established by serial bone marrow transplantation in mice. *Blood*. 1989;73(2):397-401. doi:10.1182/blood.V73.2.397.397
67. Woo CJ, Kharchenko PV, Daheron L, Park PJ, Kingston RE. A region of the human HOXD cluster that confers polycomb-group responsiveness. *Cell*. Jan 8 2010;140(1):99-110. doi:10.1016/j.cell.2009.12.022
68. Milne TA, Briggs SD, Brock HW, et al. MLL Targets SET Domain Methyltransferase Activity to Hox Gene Promoters. *Molecular Cell*. 2002;10(5):1107-1117. doi:10.1016/s1097-2765(02)00741-4
69. Lewis EB. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature*. Dec 7 1978;276(5688):565-70.
70. Schwartz YB, Kahn TG, Nix DA, et al. Genome-wide analysis of Polycomb targets in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet*. Jun 2006;38(6):700-5. doi:10.1038/ng1817
71. Sauvageau M, Sauvageau G. Polycomb group proteins: multi-faceted regulators of somatic stem cells and cancer. *Cell Stem Cell*. Sep 03 2010;7(3):299-313. doi:10.1016/j.stem.2010.08.002
72. Cao R, Tsukada Y, Zhang Y. Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and Hox gene silencing. *Mol*

- Cell*. Dec 22 2005;20(6):845-54. doi:10.1016/j.molcel.2005.12.002
73. Lessard J, Baban S, Sauvageau G. Stage-specific expression of polycomb group genes in human bone marrow cells. *Blood*. Feb 15 1998;91(4):1216-24.
74. Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ, et al. Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 6 1994;91(25):12223-7. doi:10.1073/pnas.91.25.12223
75. Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, et al. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*. Sep 26 2002;419(6905):407-11. doi:10.1038/nature01080
76. Schneider R, Bannister AJ, Myers FA, Thorne AW, Crane-Robinson C, Kouzarides T. Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nat Cell Biol*. Jan 2004;6(1):73-7. doi:10.1038/ncb1076
77. Wysocka J, Swigut T, Xiao H, et al. A PHD finger of NURF couples histone H3 lysine 4 trimethylation with chromatin remodelling. Research Support, N.I.H., Intramural Research Support, Non-U.S. Gov't. *Nature*. Jul 06 2006;442(7098):86-90. doi:10.1038/nature04815
78. Hess JL, Yu BD, Li B, Hanson R, Korsmeyer SJ. Defects in Yolk Sac Hematopoiesis in Mll-Null Embryos. *Blood*. 1997;90(5):1799-1806. doi:10.1182/blood.V90.5.1799
79. Jude CD, Climer L, Xu D, Artinger E, Fisher JK, Ernst P. Unique and independent roles for MLL in adult hematopoietic stem cells and progenitors. *Cell Stem Cell*. Sep 13 2007;1(3):324-37. doi:10.1016/j.stem.2007.05.019
80. Gan T, Jude CD, Zaffuto K, Ernst P. Developmentally induced Mll1 loss reveals defects in postnatal haematopoiesis. *Leukemia*. Oct 2010;24(10):1732-41. doi:10.1038/leu.2010.171
81. Krumlauf R. Hox genes in vertebrate development. *Cell*. Jul 29 1994;78(2):191-201. doi:10.1016/0092-8674(94)90290-9
82. Ekker SC, Jackson DG, von Kessler DP, Sun BI, Young KE, Beachy PA. The degree of variation in DNA sequence recognition among four Drosophila homeotic proteins. *EMBO J*. Aug 1 1994;13(15):3551-60. doi:10.1002/j.1460-2075.1994.tb06662.x
83. Pineault N, Helgason CD, Lawrence HJ, Humphries RK. Differential expression of Hox, Meis1, and Pbx1 genes in primitive cells throughout murine hematopoietic ontogeny. *Experimental Hematology*. 2002;30(1):49-57. doi:10.1016/S0301-472X(01)00757-3
84. Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, Hough MR, et al. Overexpression of HOXA10 in murine hematopoietic cells perturbs both myeloid and lymphoid differentiation and leads to acute myeloid leukemia. *Mol Cell Biol*. Jan 1997;17(1):495-505. doi:10.1128/MCB.17.1.495
85. Thorsteinsdottir U, Mamo A, Kroon E, et al. Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. *Blood*. Jan 1 2002;99(1):121-9. doi:10.1182/blood.v99.1.121
86. Lawrence HJ, Christensen J, Fong S, et al. Loss of expression of the Hoxa-9 homeobox gene impairs the proliferation and repopulating ability of hematopoietic stem cells. *Blood*. Dec 1 2005;106(12):3988-94. doi:10.1182/blood-2005-05-2003
87. Bijl J, Thompson A, Ramirez-Solis R, et al. Analysis of HSC activity and compensatory Hox gene expression profile in Hoxb cluster mutant fetal liver cells. *Blood*. Jul 1 2006;108(1):116-22. doi:10.1182/blood-2005-06-2245
88. Lawrence HJ, Helgason CD, Sauvageau G, et al. Mice Bearing a Targeted Interruption of the Homeobox Gene HOXA9 Have Defects in Myeloid, Erythroid, and Lymphoid Hematopoiesis. *Blood*. 1997;89(6):1922-1930. doi:10.1182/blood.V89.6.1922
89. Yamamoto M, Ko LJ, Leonard MW, Beug H, Orkin SH, Engel JD. Activity and tissue-specific expression of the transcription factor NF-E1 multigene family. *Genes Dev*. Oct 1990;4(10):1650-62. doi:10.1101/gad.4.10.1650

90. Trainor CD, Omichinski JG, Vandergon TL, Gronenborn AM, Clore GM, Felsenfeld G. A palindromic regulatory site within vertebrate GATA-1 promoters requires both zinc fingers of the GATA-1 DNA-binding domain for high-affinity interaction. *Mol Cell Biol.* May 1996;16(5):2238-47. doi:10.1128/MCB.16.5.2238
91. Tsang AP, Visvader JE, Turner CA, et al. FOG, a multitype zinc finger protein, acts as a cofactor for transcription factor GATA-1 in erythroid and megakaryocytic differentiation. *Cell.* Jul 11 1997;90(1):109-19. doi:10.1016/s0092-8674(00)80318-9
92. Newton A, Mackay J, Crossley M. The N-terminal zinc finger of the erythroid transcription factor GATA-1 binds GATC motifs in DNA. *J Biol Chem.* Sep 21 2001;276(38):35794-801. doi:10.1074/jbc.M106256200
93. Shimizu R, Yamamoto M. Gene expression regulation and domain function of hematopoietic GATA factors. *Semin Cell Dev Biol.* Feb 2005;16(1):129-36. doi:10.1016/j.semcdb.2004.11.001
94. Tsai FY, Keller G, Kuo FC, et al. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature.* Sep 15 1994;371(6494):221-6. doi:10.1038/371221a0
95. Fujiwara Y, Browne CP, Cunniff K, Goff SC, Orkin SH. Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Oct 29 1996;93(22):12355-8. doi:10.1073/pnas.93.22.12355
96. Minegishi N, Ohta J, Yamagiwa H, et al. The Mouse GATA-2 Gene is Expressed in the Para-Aortic Splanchnopleura and Aorta-Gonads and Mesonephros Region. *Blood.* 1999;93(12):4196-4207. doi:10.1182/blood.V93.12.4196
97. Pal S, Cantor AB, Johnson KD, et al. Coregulator-dependent facilitation of chromatin occupancy by GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 27 2004;101(4):980-5. doi:10.1073/pnas.0307612100
98. Grass JA, Boyer ME, Pal S, Wu J, Weiss MJ, Bresnick EH. GATA-1-dependent transcriptional repression of GATA-2 via disruption of positive autoregulation and domain-wide chromatin remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 22 2003;100(15):8811-6. doi:10.1073/pnas.1432147100
99. Bresnick EH, Lee HY, Fujiwara T, Johnson KD, Keles S. GATA switches as developmental drivers. *J Biol Chem.* Oct 8 2010;285(41):31087-93. doi:10.1074/jbc.R110.159079
100. Tsang AP, Fujiwara Y, Hom DB, Orkin SH. Failure of megakaryopoiesis and arrested erythropoiesis in mice lacking the GATA-1 transcriptional cofactor FOG. *Genes Dev.* Apr 15 1998;12(8):1176-88. doi:10.1101/gad.12.8.1176
101. Heyworth C, Pearson S, May G, Enver T. Transcription factor-mediated lineage switching reveals plasticity in primary committed progenitor cells. *EMBO J.* Jul 15 2002;21(14):3770-81. doi:10.1093/emboj/cdf368
102. Iwasaki H, Mizuno S-i, Wells RA, Cantor AB, Watanabe S, Akashi K. GATA-1 Converts Lymphoid and Myelomonocytic Progenitors into the Megakaryocyte/Erythrocyte Lineages. *Immunity.* 2003;19(3):451-462. doi:10.1016/s1074-7613(03)00242-5
103. Shivdasani RA, Fujiwara Y, McDevitt MA, Orkin SH. A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *EMBO J.* Jul 1 1997;16(13):3965-73. doi:10.1093/emboj/16.13.3965
104. Dong Y, Shi O, Zeng Q, et al. Leukemia incidence trends at the global, regional, and national level between 1990 and 2017. *Exp Hematol Oncol.* 2020;9:14. doi:10.1186/s40164-020-00170-6
105. Nowell PC. The minute chromosome (Ph1) in chronic granulocytic leukemia. *Blut.* Apr 1962;8:65-6. doi:10.1007/BF01630378
106. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management. *Am J Hematol.* May 2014;89(5):547-56. doi:10.1002/ajh.23691
107. Hijiya N, Schultz KR, Metzler M, Millot F, Suttorp M. Pediatric chronic myeloid leukemia is a unique disease

- that requires a different approach. *Blood*. Jan 28 2016;127(4):392-9. doi:10.1182/blood-2015-06-648667
108. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. Aug 1976;33(4):451-8. doi:10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x
109. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *Br J Haematol*. Jul 1991;78(3):325-9. doi:10.1111/j.1365-2141.1991.tb04444.x
110. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med*. Sep 1985;103(3):460-2. doi:10.7326/0003-4819-103-3-460
111. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. May 19 2016;127(20):2391-405. doi:10.1182/blood-2016-03-643544
112. Rowley JD, de la Chapelle A. General report on the First International Workshop on Chromosomes in Leukemia. *Int J Cancer*. Mar 15 1978;21(3):307-8. doi:10.1002/ijc.2910210309
113. Rowley JD, Golomb HM, Dougherty C. 15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukaemia. *Lancet*. Mar 5 1977;1(8010):549-50. doi:10.1016/s0140-6736(77)91415-5
114. Meyer C, Burmeister T, Groger D, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia*. Feb 2018;32(2):273-284. doi:10.1038/leu.2017.213
115. Gough SM, Slape CI, Aplan PD. NUP98 gene fusions and hematopoietic malignancies: common themes and new biologic insights. Research Support, N.I.H., Intramural Research Support, Non-U.S. Gov't Review. *Blood*. Dec 08 2011;118(24):6247-57. doi:10.1182/blood-2011-07-328880
116. Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. *Science*. Feb 16 2001;291(5507):1304-51. doi:10.1126/science.1058040
117. Lilljebjorn H, Orsmark-Pietras C, Mitelman F, Hagstrom-Andersson A, Fioretos T. Transcriptomics paving the way for improved diagnostics and precision medicine of acute leukemia. *Semin Cancer Biol*. Sep 2022;84:40-49. doi:10.1016/j.semcancer.2021.09.013
118. Mertens F, Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. The emerging complexity of gene fusions in cancer. Research Support, Non-U.S. Gov't Review. *Nat Rev Cancer*. Jun 2015;15(6):371-81. doi:10.1038/nrc3947
119. Balgobind BV, Raimondi SC, Harbott J, et al. Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study. *Blood*. Sep 17 2009;114(12):2489-96. doi:10.1182/blood-2009-04-215152
120. Boveri T. Über mehrpolige Mitosen als Mittel zur Analyse des Zellkerns. [Concerning multipolar mitoses as a means of analysing the cell nucleus.] 1902;C. Kabitzch, Würzburg and Verh. d. phys. med. Ges. zu Würzburg. N.F., Bd. 35
121. Boveri T. Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. . *Gustav Fischer Jena, Germany* 64 pp. 1914;
122. Boveri T. Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. *J Cell Sci*. Jan 2008;121 Suppl 1:1-84. doi:10.1242/jcs.025742
123. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood*. Jul 2 2015;126(1):9-16. doi:10.1182/blood-2015-03-631747
124. Ries L, MA S, JG G, et al. Cancer Incidence and Survival among Children and Adolescents: United States

- SEER Program 1975-1995. *National Cancer Institute, SEER Program NIH Pub No 99-4649 Bethesda, MD*. 1999;
125. Smith SM, Lee A, Tong S, et al. Detection of a GLIS3 fusion in an infant with AML refractory to chemotherapy. *Cold Spring Harb Mol Case Stud*. Aug 4 2022;doi:10.1101/mcs.a006220
126. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N Engl J Med*. Oct 15 2015;373(16):1541-52. doi:10.1056/NEJMra1400972
127. Paulsson K, Lilljebjorn H, Biloglav A, et al. The genomic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. Jun 2015;47(6):672-6. doi:10.1038/ng.3301
128. Tasian SK, Loh ML, Hunger SP. Childhood acute lymphoblastic leukemia: Integrating genomics into therapy. *Cancer*. Oct 15 2015;121(20):3577-90. doi:10.1002/cncr.29573
129. Akasaka T, Balasas T, Russell LJ, et al. Five members of the CEBP transcription factor family are targeted by recurrent IGH translocations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL). *Blood*. Apr 15 2007;109(8):3451-61. doi:10.1182/blood-2006-08-041012
130. Russell LJ, Capasso M, Vater I, et al. Deregulated expression of cytokine receptor gene, CRLF2, is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. Sep 24 2009;114(13):2688-98. doi:10.1182/blood-2009-03-208397
131. Russell LJ, De Castro DG, Griffiths M, et al. A novel translocation, t(14;19)(q32;p13), involving IGH@ and the cytokine receptor for erythropoietin. *Leukemia*. Mar 2009;23(3):614-7. doi:10.1038/leu.2008.250
132. Yan Y, Park SS, Janz S, Eckhardt LA. In a model of immunoglobulin heavy-chain (IGH)/MYC translocation, the Igh 3' regulatory region induces MYC expression at the immature stage of B cell development. *Genes Chromosomes Cancer*. Oct 2007;46(10):950-9. doi:10.1002/gcc.20480
133. de Rooij JD, Zwaan CM, van den Heuvel-Eibrink M. Pediatric AML: From Biology to Clinical Management. *J Clin Med*. Jan 9 2015;4(1):127-49. doi:10.3390/jcm4010127
134. Bolouri H, Farrar JE, Triche T, Jr., et al. The molecular landscape of pediatric acute myeloid leukemia reveals recurrent structural alterations and age-specific mutational interactions. *Nat Med*. Jan 2018;24(1):103-112. doi:10.1038/nm.4439
135. Shiba N, Yoshida K, Hara Y, et al. Transcriptome analysis offers a comprehensive illustration of the genetic background of pediatric acute myeloid leukemia. *Blood Adv*. Oct 22 2019;3(20):3157-3169. doi:10.1182/bloodadvances.2019000404
136. Lawrence MS, Stojanov P, Mermel CH, et al. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature*. Jan 23 2014;505(7484):495-501. doi:10.1038/nature12912
137. de Rooij JD, Hollink IH, Arentsen-Peters ST, et al. NUP98/JARID1A is a novel recurrent abnormality in pediatric acute megakaryoblastic leukemia with a distinct HOX gene expression pattern. *Leukemia*. Dec 2013;27(12):2280-8. doi:10.1038/leu.2013.87
138. Pagano L, Pulsoni A, Vignetti M, et al. Acute megakaryoblastic leukemia: experience of GIMEMA trials. *Clinical Trial. Leukemia*. Sep 2002;16(9):1622-6. doi:10.1038/sj.leu.2402618
139. Mundschau G, Gurbuxani S, Gamis AS, Greene ME, Arceci RJ, Crispino JD. Mutagenesis of GATA1 is an initiating event in Down syndrome leukemogenesis. *Blood*. Jun 1 2003;101(11):4298-300. doi:10.1182/blood-2002-12-3904
140. Wechsler J, Greene M, McDevitt MA, et al. Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Nat Genet*. Sep 2002;32(1):148-52. doi:10.1038/ng955
141. Li Z, Godinho FJ, Klusmann JH, Garriga-Canut M, Yu C, Orkin SH. Developmental stage-selective effect of somatically mutated leukemogenic transcription factor GATA1. *Nat Genet*. Jun 2005;37(6):613-9. doi:10.1038/ng1566

142. Muntean AG, Crispino JD. Differential requirements for the activation domain and FOG-interaction surface of GATA-1 in megakaryocyte gene expression and development. *Blood*. Aug 15 2005;106(4):1223-31. doi:10.1182/blood-2005-02-0551
143. Gruber TA, Downing JR. The biology of pediatric acute megakaryoblastic leukemia. *Blood*. Aug 20 2015;126(8):943-9. doi:10.1182/blood-2015-05-567859
144. Hitzler JK, Cheung J, Li Y, Scherer SW, Zipursky A. GATA1 mutations in transient leukemia and acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Blood*. Jun 1 2003;101(11):4301-4. doi:10.1182/blood-2003-01-0013
145. Massey GV, Zipursky A, Chang MN, et al. A prospective study of the natural history of transient leukemia (TL) in neonates with Down syndrome (DS): Children's Oncology Group (COG) study POG-9481. *Blood*. Jun 15 2006;107(12):4606-13. doi:10.1182/blood-2005-06-2448
146. Amano K, Takasugi N, Kubota Y, et al. CBFA2T3-GLIS2-positive acute megakaryoblastic leukemia in a patient with Down syndrome. *Pediatr Blood Cancer*. Feb 2020;67(2):e28055. doi:10.1002/pbc.28055
147. Athale UH, Razzouk BI, Raimondi SC, et al. Biology and outcome of childhood acute megakaryoblastic leukemia: a single institution's experience. *Blood*. Jun 15 2001;97(12):3727-32.
148. de Rooij JD, Branstetter C, Ma J, et al. Pediatric non-Down syndrome acute megakaryoblastic leukemia is characterized by distinct genomic subsets with varying outcomes. *Nat Genet*. Mar 2017;49(3):451-456. doi:10.1038/ng.3772
149. de Rooij JD, Masetti R, van den Heuvel-Eibrink MM, et al. Recurrent abnormalities can be used for risk group stratification in pediatric AMKL: a retrospective intergroup study. *Blood*. Jun 30 2016;127(26):3424-30. doi:10.1182/blood-2016-01-695551
150. Hara Y, Shiba N, Ohki K, et al. Prognostic impact of specific molecular profiles in pediatric acute megakaryoblastic leukemia in non-Down syndrome. *Genes Chromosomes Cancer*. May 2017;56(5):394-404. doi:10.1002/gcc.22444
151. Radtke I, Mullighan CG, Ishii M, et al. Genomic analysis reveals few genetic alterations in pediatric acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 4 2009;106(31):12944-9. doi:10.1073/pnas.0903142106
152. Mayani H, Flores-Figueroa E, Chavez-Gonzalez A. In vitro biology of human myeloid leukemia. *Leuk Res*. May 2009;33(5):624-37. doi:10.1016/j.leukres.2008.11.011
153. Montesinos JJ, Sanchez-Valle E, Flores-Figueroa E, et al. Deficient proliferation and expansion in vitro of two bone marrow cell populations from patients with acute myeloid leukemia in response to hematopoietic cytokines. *Leuk Lymphoma*. Jul 2006;47(7):1379-86. doi:10.1080/10428190500465424
154. Wang GG, Cai L, Pasillas MP, Kamps MP. NUP98-NSD1 links H3K36 methylation to Hox-A gene activation and leukaemogenesis. Research Support, N.I.H., Extramural. *Nature cell biology*. Jul 2007;9(7):804-12. doi:10.1038/ncb1608
155. Thanasopoulou A, Tzankov A, Schwaller J. Potent co-operation between the NUP98-NSD1 fusion and the FLT3-ITD mutation in acute myeloid leukemia induction. *Haematologica*. Sep 2014;99(9):1465-71. doi:10.3324/haematol.2013.100917
156. Milne TA. Mouse models of MLL leukemia: recapitulating the human disease. *Blood*. Apr 20 2017;129(16):2217-2223. doi:10.1182/blood-2016-10-691428
157. Mercher T, Schwaller J. Pediatric Acute Myeloid Leukemia (AML): From Genes to Models Toward Targeted Therapeutic Intervention. *Front Pediatr*. 2019;7:401. doi:10.3389/fped.2019.00401
158. Milan T, Canaj H, Villeneuve C, et al. Pediatric leukemia: Moving toward more accurate models. *Exp Hematol*. Jun 2019;74:1-12. doi:10.1016/j.exphem.2019.05.003

159. Wang GG, Song J, Wang Z, et al. Haematopoietic malignancies caused by dysregulation of a chromatin-binding PHD finger. *Nature*. Jun 11 2009;459(7248):847-51. doi:nature08036 [pii] 10.1038/nature08036
160. Thiollier C, Lopez CK, Gerby B, et al. Characterization of novel genomic alterations and therapeutic approaches using acute megakaryoblastic leukemia xenograft models. *The Journal of experimental medicine*. Oct 22 2012;209(11):2017-31. doi:10.1084/jem.20121343
161. Cardin S, Bilodeau M, Roussy M, et al. Human models of NUP98-KDM5A megakaryocytic leukemia in mice contribute to uncovering new biomarkers and therapeutic vulnerabilities. *Blood Adv*. Nov 12 2019;3(21):3307-3321. doi:10.1182/bloodadvances.2019030981
162. Gruber TA, Larson Gedman A, Zhang J, et al. An Inv(16)(p13.3q24.3)-encoded CBFA2T3-GLIS2 fusion protein defines an aggressive subtype of pediatric acute megakaryoblastic leukemia. Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't. *Cancer Cell*. Nov 13 2012;22(5):683-97. doi:10.1016/j.ccr.2012.10.007
163. Thirant C, Ignacimouttou C, Lopez CK, et al. ETO2-GLIS2 Hijacks Transcriptional Complexes to Drive Cellular Identity and Self-Renewal in Pediatric Acute Megakaryoblastic Leukemia. *Cancer Cell*. Mar 13 2017;31(3):452-465. doi:10.1016/j.ccell.2017.02.006
164. Dang J, Nance S, Ma J, et al. AMKL chimeric transcription factors are potent inducers of leukemia. *Leukemia*. Oct 2017;31(10):2228-2234. doi:10.1038/leu.2017.51
165. Neault M, Lebert-Ghali C-É, Fournier M, et al. CBFA2T3-GLIS2-dependent pediatric acute megakaryoblastic leukemia is driven by GLIS2 and sensitive to Navitoclax. *bioRxiv*. 2022:2022.12.16.520129. doi:10.1101/2022.12.16.520129
166. Drenberg CD, Shelat A, Dang J, et al. A high-throughput screen indicates gemcitabine and JAK inhibitors may be useful for treating pediatric AML. *Nat Commun*. May 16 2019;10(1):2189. doi:10.1038/s41467-019-09917-0
167. Bertuccio SN, Boudia F, Cambot M, et al. The Pediatric Acute Leukemia Fusion Oncogene ETO2-GLIS2 Increases Self-Renewal and Alters Differentiation in a Human Induced Pluripotent Stem Cells-Derived Model. *Hemasphere*. Feb 2020;4(1):e319. doi:10.1097/HS9.0000000000000319
168. Gress V, Roussy M, Boulianne L, et al. CBFA2T3::GLIS2 Pediatric Acute Megakaryoblastic Leukemia is Sensitive to BCL-XL Inhibition by Navitoclax and DT2216. *Blood Adv*. Sep 20 2023;doi:10.1182/bloodadvances.2022008899
169. Le Q, Hadland B, Smith JL, et al. CBFA2T3-GLIS2 model of pediatric acute megakaryoblastic leukemia identifies FOLR1 as a CAR T cell target. *J Clin Invest*. Sep 22 2022;doi:10.1172/JCI157101
170. Hogenbirk MA, Heideman MR, de Rink I, et al. Defining chromosomal translocation risks in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 28 2016;113(26):E3649-56. doi:10.1073/pnas.1602025113
171. Felix CA. Secondary leukemias induced by topoisomerase-targeted drugs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*. 1998;1400(1-3):233-255. doi:10.1016/s0167-4781(98)00139-0
172. Roukos V, Voss TC, Schmidt CK, Lee S, Wangsa D, Misteli T. Spatial dynamics of chromosome translocations in living cells. *Science*. Aug 9 2013;341(6146):660-4. doi:10.1126/science.1237150
173. Vilenchik MM, Knudson AG. Endogenous DNA double-strand breaks: production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 28 2003;100(22):12871-6. doi:10.1073/pnas.2135498100
174. Tsai AG, Lieber MR. Mechanisms of chromosomal rearrangement in the human genome. *BMC Genomics*. Feb 10 2010;11 Suppl 1:S1. doi:10.1186/1471-2164-11-S1-S1
175. Ploski JE, Aplan PD. Characterization of DNA fragmentation events caused by genotoxic and non-

- genotoxic agents. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2001;473(2):169-180. doi:10.1016/s0027-5107(00)00147-0
176. Stanulla M, Wang J, Chervinsky DS, Thandla S, Aplan PD. DNA cleavage within the MLL breakpoint cluster region is a specific event which occurs as part of higher-order chromatin fragmentation during the initial stages of apoptosis. *Mol Cell Biol*. Jul 1997;17(7):4070-9. doi:10.1128/MCB.17.7.4070
177. Janssen A, van der Burg M, Suzhai K, Kops GJ, Medema RH. Chromosome segregation errors as a cause of DNA damage and structural chromosome aberrations. *Science*. Sep 30 2011;333(6051):1895-8. doi:10.1126/science.1210214
178. Langer T, Metzler M, Reinhardt D, et al. Analysis of t(9;11) chromosomal breakpoint sequences in childhood acute leukemia: almost identical MLL breakpoints in therapy-related AML after treatment without etoposides. *Genes Chromosomes Cancer*. Apr 2003;36(4):393-401. doi:10.1002/gcc.10167
179. Zhang JG, Goldman JM, Cross NC. Characterization of genomic BCR-ABL breakpoints in chronic myeloid leukaemia by PCR. *Br J Haematol*. May 1995;90(1):138-46. doi:10.1111/j.1365-2141.1995.tb03392.x
180. Lieber MR. Mechanisms of human lymphoid chromosomal translocations. *Nat Rev Cancer*. May 25 2016;16(6):387-98. doi:10.1038/nrc.2016.40
181. Tsujimoto Y, Gorham J, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science*. Sep 27 1985;229(4720):1390-3. doi:10.1126/science.3929382
182. Finger LR, Harvey RC, Moore RC, Showe LC, Croce CM. A common mechanism of chromosomal translocation in T- and B-cell neoplasia. *Science*. Nov 21 1986;234(4779):982-5. doi:10.1126/science.3490692
183. Tsai AG, Lu H, Raghavan SC, Muschen M, Hsieh CL, Lieber MR. Human chromosomal translocations at CpG sites and a theoretical basis for their lineage and stage specificity. *Cell*. Dec 12 2008;135(6):1130-42. doi:10.1016/j.cell.2008.10.035
184. Maher CA, Kumar-Sinha C, Cao X, et al. Transcriptome sequencing to detect gene fusions in cancer. *Nature*. Mar 5 2009;458(7234):97-101. doi:10.1038/nature07638
185. Masetti R, Togni M, Astolfi A, et al. DHH-RHEBL1 fusion transcript: a novel recurrent feature in the new landscape of pediatric CBFA2T3-GLIS2-positive acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. Oct 2013;4(10):1712-20. doi:10.18632/oncotarget.1280
186. Sansone R, Negri D. Cytogenetic features of neonatal leukemias. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 1992;63(1):56-61. doi:10.1016/0165-4608(92)90065-g
187. Ziemin-van der Poel S, McCabe NR, Gill HJ, et al. Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 1 1991;88(23):10735-9. doi:10.1073/pnas.88.23.10735
188. Chan AKN, Chen CW. Rewiring the Epigenetic Networks in MLL-Rearranged Leukemias: Epigenetic Dysregulation and Pharmacological Interventions. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7:81. doi:10.3389/fcell.2019.00081
189. Yokoyama A, Cleary ML. Menin critically links MLL proteins with LEDGF on cancer-associated target genes. *Cancer Cell*. Jul 8 2008;14(1):36-46. doi:10.1016/j.ccr.2008.05.003
190. Yokoyama A, Somervaille TC, Smith KS, Rozenblatt-Rosen O, Meyerson M, Cleary ML. The menin tumor suppressor protein is an essential oncogenic cofactor for MLL-associated leukemogenesis. *Cell*. Oct 21 2005;123(2):207-18. doi:10.1016/j.cell.2005.09.025
191. Zeisig BB, Milne T, Garcia-Cuellar MP, et al. Hoxa9 and Meis1 are key targets for MLL-ENL-mediated cellular immortalization. *Mol Cell Biol*. Jan 2004;24(2):617-28. doi:10.1128/MCB.24.2.617-628.2004
192. Eidahl JO, Crowe BL, North JA, et al. Structural basis for high-affinity binding of LEDGF PWWP to

- mononucleosomes. *Nucleic Acids Res.* Apr 1 2013;41(6):3924-36. doi:10.1093/nar/gkt074
193. Caslini C, Yang Z, El-Osta M, Milne TA, Slany RK, Hess JL. Interaction of MLL amino terminal sequences with menin is required for transformation. *Cancer Res.* Aug 1 2007;67(15):7275-83. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2369
194. Smith E, Lin C, Shilatifard A. The super elongation complex (SEC) and MLL in development and disease. *Genes Dev.* Apr 1 2011;25(7):661-72. doi:10.1101/gad.2015411
195. Wu M, Wang PF, Lee JS, et al. Molecular regulation of H3K4 trimethylation by Wdr82, a component of human Set1/COMPASS. *Mol Cell Biol.* Dec 2008;28(24):7337-44. doi:10.1128/MCB.00976-08
196. Dou Y, Milne TA, Ruthenburg AJ, et al. Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components. *Nat Struct Mol Biol.* Aug 2006;13(8):713-9. doi:10.1038/nsmb1128
197. Ruthenburg AJ, Wang W, Graybosch DM, et al. Histone H3 recognition and presentation by the WDR5 module of the MLL1 complex. *Nat Struct Mol Biol.* Aug 2006;13(8):704-12. doi:10.1038/nsmb1119
198. Dou Y, Milne TA, Tackett AJ, et al. Physical association and coordinate function of the H3 K4 methyltransferase MLL1 and the H4 K16 acetyltransferase MOF. *Cell.* Jun 17 2005;121(6):873-85. doi:10.1016/j.cell.2005.04.031
199. Lux V, Brouns T, Cermakova K, et al. Molecular Mechanism of LEDGF/p75 Dimerization. *Structure.* Dec 1 2020;28(12):1288-1299 e7. doi:10.1016/j.str.2020.08.012
200. Milne TA, Kim J, Wang GG, et al. Multiple interactions recruit MLL1 and MLL1 fusion proteins to the HOXA9 locus in leukemogenesis. *Mol Cell.* Jun 25 2010;38(6):853-63. doi:10.1016/j.molcel.2010.05.011
201. Thiel AT, Blessington P, Zou T, et al. MLL-AF9-induced leukemogenesis requires coexpression of the wild-type Mll allele. *Cancer Cell.* Feb 17 2010;17(2):148-59. doi:10.1016/j.ccr.2009.12.034
202. Beck M, Hurt E. The nuclear pore complex: understanding its function through structural insight. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Feb 2017;18(2):73-89. doi:10.1038/nrm.2016.147
203. Radu A, Moore MS, Blobel G. The peptide repeat domain of nucleoporin Nup98 functions as a docking site in transport across the nuclear pore complex. *Cell.* Apr 21 1995;81(2):215-22.
204. Johnson AW, Lund E, Dahlberg J. Nuclear export of ribosomal subunits. *Trends Biochem Sci.* Nov 2002;27(11):580-5. doi:10.1016/s0968-0004(02)02208-9
205. Capelson M, Liang Y, Schulte R, Mair W, Wagner U, Hetzer MW. Chromatin-bound nuclear pore components regulate gene expression in higher eukaryotes. *Cell.* Feb 5 2010;140(3):372-83. doi:10.1016/j.cell.2009.12.054
206. Kalverda B, Pickersgill H, Shloma VV, Fornerod M. Nucleoporins directly stimulate expression of developmental and cell-cycle genes inside the nucleoplasm. *Cell.* Feb 5 2010;140(3):360-71. doi:10.1016/j.cell.2010.01.011
207. Griffis ER, Altan N, Lippincott-Schwartz J, Powers MA. Nup98 is a mobile nucleoporin with transcription-dependent dynamics. *Mol Biol Cell.* Apr 2002;13(4):1282-97. doi:10.1091/mbc.01-11-0538
208. Gough SM, Lee F, Yang F, et al. NUP98-PHF23 is a chromatin-modifying oncoprotein that causes a wide array of leukemias sensitive to inhibition of PHD histone reader function. *Cancer Discov.* May 2014;4(5):564-77. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0419
209. Noort S, Gerbing RB, Alonzo TA, et al. NUP98-KDM5A Fusion Gene Is Not Exclusive to Acute Megakaryoblastic Leukemia and Is an Independent Predictor of Poor Prognosis. *Blood.* 2017;130(Suppl 1):3934-3934.

210. Liu H. NUP98 rearrangement in B lymphoblastic leukemia with hyperdiploidy. *Blood*. Aug 20 2020;136(8):1011. doi:10.1182/blood.2020006652
211. Michmerhuizen NL, Klco JM, Mullighan CG. Mechanistic insights and potential therapeutic approaches for NUP98-rearranged hematologic malignancies. *Blood*. Nov 12 2020;136(20):2275-2289. doi:10.1182/blood.2020007093
212. Hussey DJ, Dobrovic A. Recurrent coiled-coil motifs in NUP98 fusion partners provide a clue to leukemogenesis. *Blood*. Feb 1 2002;99(3):1097-8. doi:10.1182/blood.v99.3.1097
213. Franks TM, McCloskey A, Shokirev MN, Benner C, Rathore A, Hetzer MW. Nup98 recruits the Wdr82-Set1A/COMPASS complex to promoters to regulate H3K4 trimethylation in hematopoietic progenitor cells. *Genes Dev*. Nov 15 2017;31(22):2222-2234. doi:10.1101/gad.306753.117
214. Takeda A, Goolsby C, Yaseen NR. NUP98-HOXA9 induces long-term proliferation and blocks differentiation of primary human CD34+ hematopoietic cells. *Cancer Res*. Jul 1 2006;66(13):6628-37. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0458
215. Pascual-Garcia P, Jeong J, Capelson M. Nucleoporin Nup98 associates with Trx/MLL and NSL histone-modifying complexes and regulates Hox gene expression. *Cell Rep*. Oct 23 2014;9(2):433-42. doi:10.1016/j.celrep.2014.09.002
216. Xu H, Valerio DG, Eisold ME, et al. NUP98 Fusion Proteins Interact with the NSL and MLL1 Complexes to Drive Leukemogenesis. *Cancer Cell*. Dec 12 2016;30(6):863-878. doi:10.1016/j.ccell.2016.10.019
217. Hollink IH, van den Heuvel-Eibrink MM, Arentsen-Peters ST, et al. NUP98/NSD1 characterizes a novel poor prognostic group in acute myeloid leukemia with a distinct HOX gene expression pattern. Research Support, Non-U.S. Gov't. *Blood*. Sep 29 2011;118(13):3645-56. doi:10.1182/blood-2011-04-346643
218. Gamou T, Kitamura E, Hosoda F, et al. The Partner Gene of AML1 in t(16;21) Myeloid Malignancies Is a Novel Member of the MTG8(ETO) Family. *Blood*. 1998;91(11):4028-4037. doi:10.1182/blood.V91.11.4028
219. Hamlett I, Draper J, Strouboulis J, Iborra F, Porcher C, Vyas P. Characterization of megakaryocyte GATA1-interacting proteins: the corepressor ETO2 and GATA1 interact to regulate terminal megakaryocyte maturation. *Blood*. Oct 1 2008;112(7):2738-49. doi:10.1182/blood-2008-03-146605
220. Leung A, Ciau-Uitz A, Pinheiro P, et al. Uncoupling VEGFA functions in arteriogenesis and hematopoietic stem cell specification. *Dev Cell*. Jan 28 2013;24(2):144-58. doi:10.1016/j.devcel.2012.12.004
221. Wilson NK, Foster SD, Wang X, et al. Combinatorial transcriptional control in blood stem/progenitor cells: genome-wide analysis of ten major transcriptional regulators. *Cell Stem Cell*. Oct 08 2010;7(4):532-44. doi:10.1016/j.stem.2010.07.016
222. Schuh AH, Tipping AJ, Clark AJ, et al. ETO-2 associates with SCL in erythroid cells and megakaryocytes and provides repressor functions in erythropoiesis. *Mol Cell Biol*. Dec 2005;25(23):10235-50. doi:10.1128/MCB.25.23.10235-10250.2005
223. Davis JN, McGhee L, Meyers S. The ETO (MTG8) gene family. *Gene*. 2003;303:1-10. doi:10.1016/s0378-1119(02)01172-1
224. Attanasio M, Uhlenhaut NH, Sousa VH, et al. Loss of GLIS2 causes nephronophthisis in humans and mice by increased apoptosis and fibrosis. *Nat Genet*. Aug 2007;39(8):1018-24. doi:10.1038/ng2072
225. Jetten AM. GLIS1-3 transcription factors: critical roles in the regulation of multiple physiological processes and diseases. *Cell Mol Life Sci*. Oct 2018;75(19):3473-3494. doi:10.1007/s00018-018-2841-9
226. Chen J, Yang X, Liu R, et al. Circular RNA GLIS2 promotes colorectal cancer cell motility via activation of the NF-kappaB pathway. *Cell Death Dis*. Sep 23 2020;11(9):788. doi:10.1038/s41419-020-02989-7
227. Masetti R, Pigazzi M, Togni M, et al. CBFA2T3-GLIS2 fusion transcript is a novel common feature in

- pediatric, cytogenetically normal AML, not restricted to FAB M7 subtype. *Blood*. Apr 25 2013;121(17):3469-72. doi:10.1182/blood-2012-11-469825
228. Eidenschink Brodersen L, Alonzo TA, Menssen AJ, et al. A recurrent immunophenotype at diagnosis independently identifies high-risk pediatric acute myeloid leukemia: a report from Children's Oncology Group. *Leukemia*. Oct 2016;30(10):2077-2080. doi:10.1038/leu.2016.119
229. Zangrando A, Cavagnero F, Scarparo P, et al. CD56, HLA-DR, and CD45 recognize a subtype of childhood AML harboring CBFA2T3-GLIS2 fusion transcript. *Cytometry A*. Aug 2021;99(8):844-850. doi:10.1002/cyto.a.24339
230. Wetzler M, McElwain BK, Stewart CC, et al. HLA-DR antigen-negative acute myeloid leukemia. *Leukemia*. Apr 2003;17(4):707-15. doi:10.1038/sj.leu.2402865
231. Baer MR, Stewart CC, Dodge RK, et al. High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: implications for residual disease detection (Cancer and Leukemia Group B Study 8361). *Blood*. Jun 1 2001;97(11):3574-80. doi:10.1182/blood.v97.11.3574
232. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. Nov 2001;22(11):633-40. doi:10.1016/s1471-4906(01)02060-9
233. Sun XJ, Wang Z, Wang L, et al. A stable transcription factor complex nucleated by oligomeric AML1-ETO controls leukaemogenesis. *Nature*. Aug 1 2013;500(7460):93-7. doi:10.1038/nature12287
234. Liu Y, Cheney MD, Gaudet JJ, et al. The tetramer structure of the Nervy homology two domain, NHR2, is critical for AML1/ETO's activity. *Cancer Cell*. Apr 2006;9(4):249-60. doi:10.1016/j.ccr.2006.03.012
235. Masetti R, Bertuccio SN, Pession A, Locatelli F. CBFA2T3-GLIS2-positive acute myeloid leukaemia. A peculiar paediatric entity. *Br J Haematol*. Feb 2019;184(3):337-347. doi:10.1111/bjh.15725
236. Stankiewicz MJ, Crispino JD. ETS2 and ERG promote megakaryopoiesis and synergize with alterations in GATA-1 to immortalize hematopoietic progenitor cells. *Blood*. Apr 2 2009;113(14):3337-47. doi:10.1182/blood-2008-08-174813
237. Yates JW, Wallace HJ, Jr., Ellison RR, Holland JF. Cytosine arabinoside (NSC-63878) and daunorubicin (NSC-83142) therapy in acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer Chemother Rep*. Nov-Dec 1973;57(4):485-8.
238. Bishop JF, Matthews JP, Young GA, et al. A randomized study of high-dose cytarabine in induction in acute myeloid leukemia [see comments]. *Blood*. 1996;87(5):1710-1717. doi:10.1182/blood.V87.5.1710.1710
239. Fernandez HF, Sun Z, Yao X, et al. Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. Sep 24 2009;361(13):1249-59. doi:10.1056/NEJMoa0904544
240. Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood*. Mar 1 2008;111(5):2505-15. doi:10.1182/blood-2007-07-102798
241. Sachs L. Control of normal cell differentiation and the phenotypic reversion of malignancy in myeloid leukaemia. *Nature*. Aug 10 1978;274(5671):535-9. doi:10.1038/274535a0
242. Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature*. May 17 2001;411(6835):355-65. doi:10.1038/35077225
243. Scheijen B, Griffin JD. Tyrosine kinase oncogenes in normal hematopoiesis and hematological disease. *Oncogene*. May 13 2002;21(21):3314-33. doi:10.1038/sj.onc.1205317
244. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med*. Apr 5 2001;344(14):1038-42. doi:10.1056/NEJM200104053441402

245. Fang G, Kim CN, Perkins CL, et al. CGP57148B (STI-571) induces differentiation and apoptosis and sensitizes Bcr-Abl-positive human leukemia cells to apoptosis due to antileukemic drugs. *Blood*. 2000;96(6):2246-2253. doi:10.1182/blood.V96.6.2246
246. Rollig C, Serve H, Huttmann A, et al. Addition of sorafenib versus placebo to standard therapy in patients aged 60 years or younger with newly diagnosed acute myeloid leukaemia (SORAML): a multicentre, phase 2, randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. Dec 2015;16(16):1691-9. doi:10.1016/S1470-2045(15)00362-9
247. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N Engl J Med*. Aug 3 2017;377(5):454-464. doi:10.1056/NEJMoa1614359
248. Smith CC, Wang Q, Chin CS, et al. Validation of ITD mutations in FLT3 as a therapeutic target in human acute myeloid leukaemia. *Nature*. Apr 15 2012;485(7397):260-3. doi:10.1038/nature11016
249. Li BE, Gan T, Meyerson M, Rabbitts TH, Ernst P. Distinct pathways regulated by menin and by MLL1 in hematopoietic stem cells and developing B cells. *Blood*. Sep 19 2013;122(12):2039-46. doi:10.1182/blood-2013-03-486647
250. Issa GC, Ravandi F, DiNardo CD, Jabbour E, Kantarjian HM, Andreeff M. Therapeutic implications of menin inhibition in acute leukemias. *Leukemia*. Sep 2021;35(9):2482-2495. doi:10.1038/s41375-021-01309-y
251. Heikamp EB, Henrich JA, Perner F, et al. The menin-MLL1 interaction is a molecular dependency in NUP98-rearranged AML. *Blood*. Feb 10 2022;139(6):894-906. doi:10.1182/blood.2021012806
252. Ferrao R, Wallweber HJ, Ho H, et al. The Structural Basis for Class II Cytokine Receptor Recognition by JAK1. *Structure*. Jun 7 2016;24(6):897-905. doi:10.1016/j.str.2016.03.023
253. Wallweber HJ, Tam C, Franke Y, Starovasnik MA, Lupardus PJ. Structural basis of recognition of interferon-alpha receptor by tyrosine kinase 2. *Nat Struct Mol Biol*. May 2014;21(5):443-8. doi:10.1038/nsmb.2807
254. Murakami M, Narazaki M, Hibi M, et al. Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 15 1991;88(24):11349-53. doi:10.1073/pnas.88.24.11349
255. Lupardus PJ, Ultsch M, Wallweber H, Bir Kohli P, Johnson AR, Eigenbrot C. Structure of the pseudokinase-kinase domains from protein kinase TYK2 reveals a mechanism for Janus kinase (JAK) autoinhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jun 3 2014;111(22):8025-30. doi:10.1073/pnas.1401180111
256. Shan Y, Gnanasambandan K, Ungureanu D, et al. Molecular basis for pseudokinase-dependent autoinhibition of JAK2 tyrosine kinase. *Nat Struct Mol Biol*. Jul 2014;21(7):579-84. doi:10.1038/nsmb.2849
257. Feng J, Witthuhn BA, Matsuda T, Kohlhuber F, Kerr IM, Ihle JN. Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. *Mol Cell Biol*. May 1997;17(5):2497-501. doi:10.1128/mcb.17.5.2497
258. Wierenga AT, Vellenga E, Schuringa JJ. Maximal STAT5-induced proliferation and self-renewal at intermediate STAT5 activity levels. *Mol Cell Biol*. Nov 2008;28(21):6668-80. doi:10.1128/MCB.01025-08
259. Tripathi SK, Chen Z, Larjo A, et al. Genome-wide Analysis of STAT3-Mediated Transcription during Early Human Th17 Cell Differentiation. *Cell Rep*. May 30 2017;19(9):1888-1901. doi:10.1016/j.celrep.2017.05.013
260. Satoh J, Tabunoki H. A Comprehensive Profile of ChIP-Seq-Based STAT1 Target Genes Suggests the Complexity of STAT1-Mediated Gene Regulatory Mechanisms. *Gene Regul Syst Bio*. 2013;7:41-56. doi:10.4137/GRSB.S11433
261. Chen X, Zhao Y, Darnettl JE, Kuriyan J. Crystal Structure of a Tyrosine Phosphorylated STAT-1 Dimer Bound to DNA. *Cell press*. May 29 1998;93:827-839. doi:10.1016/S0092-8674(00)81443-9
262. Rodig SJ, Meraz MA, White JM, et al. Disruption of the Jak1 Gene Demonstrates Obligatory and Nonredundant Roles of the Jaks in Cytokine-Induced

- Biologic Responses. *Cell*. 1998;93(3):373-383. doi:10.1016/s0092-8674(00)81166-6
263. Kleppe M, Spitzer MH, Li S, et al. Jak1 Integrates Cytokine Sensing to Regulate Hematopoietic Stem Cell Function and Stress Hematopoiesis. *Cell Stem Cell*. Oct 5 2017;21(4):489-501 e7. doi:10.1016/j.stem.2017.08.011
264. Neubauer H, Cumano A, Muller M, Wu H, Huffstadt U, Pfeffer K. Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell*. May 1 1998;93(3):397-409.
265. Akada H, Akada S, Hutchison RE, Sakamoto K, Wagner KU, Mohi G. Critical role of Jak2 in the maintenance and function of adult hematopoietic stem cells. *Stem Cells*. Jul 2014;32(7):1878-89. doi:10.1002/stem.1711
266. Ihle JN, Gilliland DG. Jak2: normal function and role in hematopoietic disorders. *Curr Opin Genet Dev*. Feb 2007;17(1):8-14. doi:10.1016/j.gde.2006.12.009
267. Khwaja A. The role of Janus kinases in haemopoiesis and haematological malignancy. *Br J Haematol*. Aug 2006;134(4):366-84. doi:10.1111/j.1365-2141.2006.06206.x
268. Shuai K, Liu B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol*. Nov 2003;3(11):900-11. doi:10.1038/nri1226
269. Villarino AV, Kanno Y, O'Shea JJ. Mechanisms and consequences of Jak-STAT signaling in the immune system. *Nat Immunol*. Mar 22 2017;18(4):374-384. doi:10.1038/ni.3691
270. Park HJ, Li J, Hannah R, et al. Cytokine-induced megakaryocytic differentiation is regulated by genome-wide loss of a uSTAT transcriptional program. *EMBO J*. Mar 15 2016;35(6):580-94. doi:10.15252/embj.201592383
271. Dawson MA, Bannister AJ, Gottgens B, et al. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. *Nature*. Oct 8 2009;461(7265):819-22. doi:10.1038/nature08448
272. Dawson MA, Foster SD, Bannister AJ, et al. Three distinct patterns of histone H3Y41 phosphorylation mark active genes. *Cell Rep*. Sep 27 2012;2(3):470-7. doi:10.1016/j.celrep.2012.08.016
273. Choudhary C, Brandts C, Schwable J, et al. Activation mechanisms of STAT5 by oncogenic Flt3-ITD. *Blood*. Jul 1 2007;110(1):370-4. doi:10.1182/blood-2006-05-024018
274. Casteran N, De Sepulveda P, Beslu N, et al. Signal transduction by several KIT juxtamembrane domain mutations. *Oncogene*. Jul 24 2003;22(30):4710-22. doi:10.1038/sj.onc.1206587
275. Vainchenker W, Constantinescu SN. JAK/STAT signaling in hematological malignancies. *Oncogene*. May 23 2013;32(21):2601-13. doi:10.1038/ncr.2012.347
276. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. Jul 2006;3(7):e270. doi:10.1371/journal.pmed.0030270
277. Marty C, Chaligne R, Lacout C, Constantinescu SN, Vainchenker W, Villeval JL. Ligand-independent thrombopoietin mutant receptor requires cell surface localization for endogenous activity. *J Biol Chem*. May 1 2009;284(18):11781-91. doi:10.1074/jbc.M808703200
278. Staerk J, Lacout C, Sato T, Smith SO, Vainchenker W, Constantinescu SN. An amphipathic motif at the transmembrane-cytoplasmic junction prevents autonomous activation of the thrombopoietin receptor. *Blood*. Mar 1 2006;107(5):1864-71. doi:10.1182/blood-2005-06-2600
279. Labuhn M, Perkins K, Matzk S, et al. Mechanisms of Progression of Myeloid Preleukemia to Transformed Myeloid Leukemia in Children with Down Syndrome. *Cancer Cell*. Aug 12 2019;36(2):123-138 e10. doi:10.1016/j.ccell.2019.06.007
280. Nikolaev SI, Santoni F, Vannier A, et al. Exome sequencing identifies putative drivers of progression of transient myeloproliferative disorder to AMKL in infants with Down syndrome. *Blood*. Jul 25 2013;122(4):554-61. doi:10.1182/blood-2013-03-491936

281. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. Apr 2005;7(4):387-97. doi:10.1016/j.ccr.2005.03.023
282. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. Mar 19-25 2005;365(9464):1054-61. doi:10.1016/S0140-6736(05)71142-9
283. Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC, Blenis J. Tuberous Sclerosis Complex Gene Products, Tuberin and Hamartin, Control mTOR Signaling by Acting as a GTPase-Activating Protein Complex toward Rheb. *Current Biology*. 2003;13(15):1259-1268. doi:10.1016/s0960-9822(03)00506-2
284. Menon S, Dibble CC, Talbott G, et al. Spatial control of the TSC complex integrates insulin and nutrient regulation of mTORC1 at the lysosome. *Cell*. Feb 13 2014;156(4):771-85. doi:10.1016/j.cell.2013.11.049
285. Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell*. Apr 22 2005;121(2):179-93. doi:10.1016/j.cell.2005.02.031
286. Burnett PE, Barrow RK, Cohen NA, Snyder SH, Sabatini DM. RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Feb 17 1998;95(4):1432-7. doi:10.1073/pnas.95.4.1432
287. Schalm SS, Fingar DC, Sabatini DM, Blenis J. TOS Motif-Mediated Raptor Binding Regulates 4E-BP1 Multisite Phosphorylation and Function. *Current Biology*. 2003;13(10):797-806. doi:10.1016/s0960-9822(03)00329-4
288. Kim D-H, Sarbassov DD, Ali SM, et al. mTOR Interacts with Raptor to Form a Nutrient-Sensitive Complex that Signals to the Cell Growth Machinery. *Cell*. 2002;110(2):163-175. doi:10.1016/s0092-8674(02)00808-5
289. Ebner M, Sinkovics B, Szczygiel M, Ribeiro DW, Yudushkin I. Localization of mTORC2 activity inside cells. *J Cell Biol*. Feb 2017;216(2):343-353. doi:10.1083/jcb.201610060
290. Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, et al. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*. Jul 27 2004;14(14):1296-302. doi:10.1016/j.cub.2004.06.054
291. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. Feb 18 2005;307(5712):1098-101. doi:10.1126/science.1106148
292. Stuttfeld E, Aylett CH, Imseng S, et al. Architecture of the human mTORC2 core complex. *Elife*. Feb 9 2018;7doi:10.7554/eLife.33101
293. Harrington LS, Findlay GM, Gray A, et al. The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J Cell Biol*. Jul 19 2004;166(2):213-23. doi:10.1083/jcb.200403069
294. Um SH, Frigerio F, Watanabe M, et al. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. *Nature*. Sep 9 2004;431(7005):200-5. doi:10.1038/nature02866
295. Rodrik-Outmezguine VS, Chandarlapaty S, Pagano NC, et al. mTOR kinase inhibition causes feedback-dependent biphasic regulation of AKT signaling. *Cancer Discov*. Aug 2011;1(3):248-59. doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0085
296. Tabernero J, Rojo F, Calvo E, et al. Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: a phase I tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol*. Apr 1 2008;26(10):1603-10. doi:10.1200/JCO.2007.14.5482
297. Bertacchini J, Guida M, Accordi B, et al. Feedbacks and adaptive capabilities of the PI3K/Akt/mTOR axis in acute myeloid leukemia revealed by pathway selective inhibition and phosphoproteome analysis. *Leukemia*. Nov 2014;28(11):2197-205. doi:10.1038/leu.2014.123

298. Xu Q, Simpson SE, Scialla TJ, Bagg A, Carroll M. Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation. *Blood*. Aug 1 2003;102(3):972-80. doi:10.1182/blood-2002-11-3429
299. Meshinchi S, Appelbaum FR. Structural and functional alterations of FLT3 in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. Jul 1 2009;15(13):4263-9. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1123
300. Mills JR, Hippo Y, Robert F, et al. mTORC1 promotes survival through translational control of Mcl-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 5 2008;105(31):10853-8. doi:10.1073/pnas.0804821105
301. Wang JM, Chao JR, Chen W, Kuo ML, Yen JJ, Yang-Yen HF. The antiapoptotic gene mcl-1 is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB. *Mol Cell Biol*. Sep 1999;19(9):6195-206. doi:10.1128/MCB.19.9.6195
302. Vachhani P, Bose P, Rahmani M, Grant S. Rational combination of dual PI3K/mTOR blockade and Bcl-2/xL inhibition in AML. *Physiol Genomics*. Jul 1 2014;46(13):448-56. doi:10.1152/physiolgenomics.00173.2013
303. Rahmani M, Aust MM, Attkisson E, Williams DC, Jr., Ferreira-Gonzalez A, Grant S. Dual inhibition of Bcl-2 and Bcl-xL strikingly enhances PI3K inhibition-induced apoptosis in human myeloid leukemia cells through a GSK3- and Bim-dependent mechanism. *Cancer Res*. Feb 15 2013;73(4):1340-51. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1365
304. Rahmani M, Nkwocha J, Hawkins E, et al. Cotargeting BCL-2 and PI3K Induces BAX-Dependent Mitochondrial Apoptosis in AML Cells. *Cancer Res*. Jun 1 2018;78(11):3075-3086. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-3024
305. Perl AE, Kasner MT, Tsai DE, et al. A phase I study of the mammalian target of rapamycin inhibitor sirolimus and MEC chemotherapy in relapsed and refractory acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res*. Nov 1 2009;15(21):6732-9. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0842
306. Yee KW, Zeng Z, Konopleva M, et al. Phase I/II study of the mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus (RAD001) in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies. *Clin Cancer Res*. Sep 1 2006;12(17):5165-73. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0764
307. Park S, Chapuis N, Saint Marcoux F, et al. A phase Ib GOELAMS study of the mTOR inhibitor RAD001 in association with chemotherapy for AML patients in first relapse. *Leukemia*. Jul 2013;27(7):1479-86. doi:10.1038/leu.2013.17
308. Amadori S, Stasi R, Martelli AM, et al. Temsirolimus, an mTOR inhibitor, in combination with lower-dose clofarabine as salvage therapy for older patients with acute myeloid leukaemia: results of a phase II GIMEMA study (AML-1107). *Br J Haematol*. Jan 2012;156(2):205-12. doi:10.1111/j.1365-2141.2011.08940.x
309. Choo AY, Yoon SO, Kim SG, Roux PP, Blenis J. Rapamycin differentially inhibits S6Ks and 4E-BP1 to mediate cell-type-specific repression of mRNA translation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Nov 11 2008;105(45):17414-9. doi:10.1073/pnas.0809136105
310. Thoreen CC, Kang SA, Chang JW, et al. An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem*. Mar 20 2009;284(12):8023-32. doi:10.1074/jbc.M900301200
311. Lorenz MC, Heitman J. TOR mutations confer rapamycin resistance by preventing interaction with FKBP12-rapamycin. *J Biol Chem*. Nov 17 1995;270(46):27531-7. doi:10.1074/jbc.270.46.27531
312. Carlo MI, Molina AM, Lakhman Y, et al. A Phase Ib Study of BEZ235, a Dual Inhibitor of Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) and Mammalian Target of Rapamycin (mTOR), in Patients With Advanced Renal Cell Carcinoma. *Oncologist*. Jul 2016;21(7):787-8. doi:10.1634/theoncologist.2016-0145
313. Khan I, Huang Z, Wen Q, et al. AKT is a therapeutic target in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. Sep 2013;27(9):1882-90. doi:10.1038/leu.2013.167

314. Bogani C, Bartalucci N, Martinelli S, et al. mTOR inhibitors alone and in combination with JAK2 inhibitors effectively inhibit cells of myeloproliferative neoplasms. *PLoS One*. 2013;8(1):e54826. doi:10.1371/journal.pone.0054826
315. Choong ML, Pecquet C, Pendharkar V, et al. Combination treatment for myeloproliferative neoplasms using JAK and pan-class I PI3K inhibitors. *J Cell Mol Med*. Nov 2013;17(11):1397-409. doi:10.1111/jcmm.12156
316. Bartalucci N, Tozzi L, Bogani C, et al. Co-targeting the PI3K/mTOR and JAK2 signalling pathways produces synergistic activity against myeloproliferative neoplasms. *J Cell Mol Med*. Nov 2013;17(11):1385-96. doi:10.1111/jcmm.12162
317. Nogami A, Oshikawa G, Okada K, et al. FLT3-ITD confers resistance to the PI3K/Akt pathway inhibitors by protecting the mTOR/4EBP1/Mcl-1 pathway through STAT5 activation in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. Apr 20 2015;6(11):9189-205. doi:10.18632/oncotarget.3279
318. Lopez CK, Malinge S, Gaudry M, Bernard OA, Mercher T. Pediatric Acute Megakaryoblastic Leukemia: Multitasking Fusion Proteins and Oncogenic Cooperations. *Trends Cancer*. Sep 2017;3(9):631-642. doi:[S2405-8033\(17\)30140-1 \[pii\] 10.1016/j.trecan.2017.07.003](https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.07.003)
319. Saeed AI, Bhagabati NK, Braisted JC, et al. TM4 microarray software suite. Review. *Methods in enzymology*. 2006;411:134-93. doi:10.1016/S0076-6879(06)11009-5
320. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. Research Support, Non-U.S. Gov't. *Bioinformatics*. Nov 1 2007;23(21):2947-8. doi:10.1093/bioinformatics/btm404
321. Finn RD, Coghill P, Eberhardt RY, et al. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. Research Support, Non-U.S. Gov't. *Nucleic Acids Res*. Jan 4 2016;44(D1):D279-85. doi:10.1093/nar/gkv1344
322. Marchler-Bauer A, Bo Y, Han L, et al. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Res*. Jan 4 2017;45(D1):D200-D203. doi:10.1093/nar/gkw1129
323. Psaila B, Barkas N, Iskander D, et al. Single-cell profiling of human megakaryocyte-erythroid progenitors identifies distinct megakaryocyte and erythroid differentiation pathways. *Genome Biol*. May 3 2016;17:83. doi:10.1186/s13059-016-0939-7
324. Fischer M, Muller GA. Cell cycle transcription control: DREAM/MuvB and RB-E2F complexes. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. Dec 2017;52(6):638-662. doi:10.1080/10409238.2017.1360836
325. Alkhatib SG, Landry JW. The nucleosome remodeling factor. Research Support, Non-U.S. Gov't Review. *FEBS letters*. Oct 20 2011;585(20):3197-207. doi:10.1016/j.febslet.2011.09.003
326. Sanchez R, Zhou MM. The PHD finger: a versatile epigenome reader. *Trends Biochem Sci*. Jul 2011;36(7):364-72. doi:10.1016/j.tibs.2011.03.005
327. Shukla N, Kobos R, Renaud T, Steinherz LJ, Steinherz PG. Phase II trial of clofarabine with topotecan, vinorelbine, and thiotepa in pediatric patients with relapsed or refractory acute leukemia. Clinical Trial, Phase II Research Support, Non-U.S. Gov't. *Pediatric blood & cancer*. Mar 2014;61(3):431-5. doi:10.1002/pbc.24789
328. Struski S, Lagarde S, Bories P, et al. NUP98 is rearranged in 3.8% of pediatric AML forming a clinical and molecular homogenous group with a poor prognosis. *Leukemia*. Mar 2017;31(3):565-572. doi:10.1038/leu.2016.267
329. Ostronoff F, Othus M, Gerbing RB, et al. NUP98/NSD1 and FLT3/ITD coexpression is more prevalent in younger AML patients and leads to induction failure: a COG and SWOG report. Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't. *Blood*. Oct 09 2014;124(15):2400-7. doi:10.1182/blood-2014-04-570929

330. Ruthenburg AJ, Li H, Milne TA, et al. Recognition of a mononucleosomal histone modification pattern by BPTF via multivalent interactions. *Research Support, N.I.H., Extramural*
Research Support, Non-U.S. Gov't
Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Cell. May 27 2011;145(5):692-706. doi:10.1016/j.cell.2011.03.053
331. Landry J, Sharov AA, Piao Y, et al. Essential role of chromatin remodeling protein Bptf in early mouse embryos and embryonic stem cells. *Research Support, N.I.H., Extramural*
Research Support, N.I.H., Intramural
Research Support, Non-U.S. Gov't. PLoS Genet. Oct 2008;4(10):e1000241.
doi:10.1371/journal.pgen.1000241
332. Ables ET, Drummond-Barbosa D. The steroid hormone ecdysone functions with intrinsic chromatin remodeling factors to control female germline stem cells in *Drosophila*. *Research Support, N.I.H., Extramural*
Research Support, Non-U.S. Gov't. *Cell Stem Cell.* Nov 05 2010;7(5):581-92. doi:10.1016/j.stem.2010.10.001
333. Frey WD, Chaudhry A, Slepicka PF, et al. BPTF Maintains Chromatin Accessibility and the Self-Renewal Capacity of Mammary Gland Stem Cells. *Stem cell reports.* Jul 11 2017;9(1):23-31.
doi:10.1016/j.stemcr.2017.04.031
334. Richart L, Carrillo-de Santa Pau E, Rio-Machin A, et al. BPTF is required for c-MYC transcriptional activity and in vivo tumorigenesis. *Research Support, Non-U.S. Gov't. Nat Commun.* Jan 05 2016;7:10153.
doi:10.1038/ncomms10153
335. Yasuda T, Tsuzuki S, Kawazu M, et al. Recurrent DUX4 fusions in B cell acute lymphoblastic leukemia of adolescents and young adults. *Nat Genet.* May 2016;48(5):569-74. doi:10.1038/ng.3535
336. Yasuda T, Tsuzuki S, Kawazu M, et al. Corrigendum: Recurrent DUX4 fusions in B cell acute lymphoblastic leukemia of adolescents and young adults. *Nat Genet.* Nov 29 2016;48(12):1591.
doi:10.1038/ng1216-1587a
337. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJ. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Review. Blood.* Jan 7 2016;127(1):29-41. doi:10.1182/blood-2015-07-604496
338. Noone AM HN, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA. SEER Cancer Statistics Review. *Natl Cancer Inst Bethesda MD.* May 2018:1975-2015.
339. Biondi A CG, Pieters R, Pui C-H. . Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. *Blood.* 2000;96(1):24-33.
<http://www.bloodjournal.org/content/96/1/24>.
Accessed January 18, 2019.
340. Pieters R SM, De Lorenzo P, et al. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. *The Lancet.* 2007;370(9583):240-250. doi:10.1016/S0140-6736(07)61126-X.
341. Meyer C BT, Gröger D, et al. . The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia.* 2018;32(2):273-284. doi:10.1038/leu.2017.213.
342. Stam RW SP, Hagelstein JAP, et al. Gene expression profiling-based dissection of MLL translocated and MLL germline acute lymphoblastic leukemia in infants. *Blood.* 2010;115(14):2835-2844.
doi:10.1182/blood-2009-07-233049.
343. Lorenzo PD MA, Pieters R, et al. Cytogenetics and outcome of infants with acute lymphoblastic leukemia and absence of MLL rearrangements. *Leukemia.* 2014;28(2):428-430. doi:10.1038/leu.2013.280.
344. Li J-F DY-T, Lilljebjörn H, et al. . Transcriptional landscape of B cell precursor acute lymphoblastic leukemia based on an international study of 1,223 cases. *Proc Natl Acad Sci.* 2018;115(50):E11711-E11720.
doi:10.1073/pnas.1814397115.
345. Heerema NA SH, SENSEL MG, et al. Abnormalities of chromosome bands 15q13-15 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer.* 2002;94(4):1102-1110.

346. Andersson AK, Ma J, Wang J, et al. The landscape of somatic mutations in infant MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemias. *Nat Genet.* Apr 2015;47(4):330-7. doi:10.1038/ng.3230
347. Roussy M, Bilodeau M, Jouan L, et al. NUP98-BPTF gene fusion identified in primary refractory acute megakaryoblastic leukemia of infancy. *Genes Chromosomes Cancer.* Jun 2018;57(6):311-319. doi:10.1002/gcc.22532
348. Barabe F, Gil L, Celton M, et al. Modeling human MLL-AF9 translocated acute myeloid leukemia from single donors reveals RET as a potential therapeutic target. *Leukemia.* May 2017;31(5):1166-1176. doi:10.1038/leu.2016.302
349. Aravind L KES. A putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization. *Trends Biochem Sci.* 2000;25(3):112-114. doi:10.1016/S0968-0004(99)01537-6.
350. Gu Z CM, Roberts K, et al. Genomic analyses identify recurrent MEF2D fusions in acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun.* 2016;7:13331. doi:10.1038/ncomms13331.
351. Liu Y-F WB-Y, Zhang W-N, et al. Genomic Profiling of Adult and Pediatric B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *EBioMedicine.* 2016;8:173-183. doi:10.1016/j.ebiom.2016.04.038.
352. Liu Y EJ, Shao Y, et al. . The genomic landscape of pediatric and young adult T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2017;49(8):1211-1218. doi:10.1038/ng.3909.
353. Lilljebjörn H HR, Hyrenius-Wittsten A, et al. Identification of ETV6-RUNX1-like and DUX4-rearranged subtypes in paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun.* 2016;7:11790. doi:10.1038/ncomms11790.
354. Qian M ZH, Kham SK-Y, et al. Whole-transcriptome sequencing identifies a distinct subtype of acute lymphoblastic leukemia with predominant genomic abnormalities of EP300 and CREBBP. *Genome Res.* 2017;27(2):185-195. doi:10.1101/gr.209163.116.
355. Haack H JL, Fry CJ, et al. Diagnosis of Nut Midline Carcinoma Using a Nut-specific Monoclonal Antibody. *Am J Surg Pathol.* 2009;33(7):984-991. doi:10.1097/PAS.0b013e318198d666.
356. French CA MI, Kubonishi I, Grier HE, Perez-Atayde AR, Fletcher JA. BRD4-NUT fusion oncogene: a novel mechanism in aggressive carcinoma. *Cancer Res.* 2003;63(2):304-307.
357. Brown P PR, Biondi A. . How I treat infant leukemia. *Blood.* 2019;133(3):205-214. doi:10.1182/blood-2018-04-785980.
358. Gale KB FA, Repp R, et al. Backtracking leukemia to birth: Identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(25):13950-13954. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC28413/. Accessed February 1, 2019.
359. Lemelle L PG, Fréneaux P, et al. NUT carcinoma in children and adults: A multicenter retrospective study. *Pediatr Blood Cancer.* 2017;64(12):e26693. doi:10.1002/pbc.26693.
360. Bauer DE MC, Strait KM, et al. Clinicopathologic Features and Long-term Outcomes of NUT Midline Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2012;18(20):5773-5779. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1153.
361. Schwartz BE HM, Lemieux ME, et al. Differentiation of NUT Midline Carcinoma by Epigenomic Reprogramming. *Cancer Res.* 2011;71(7):2686-2696. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3513.
362. Grayson AR WE, Cameron MJ, et al. MYC, a downstream target of BRD-NUT, is necessary and sufficient for the blockade of differentiation in NUT midline carcinoma. *Oncogene.* 2014;33(13):1736-1742. doi:10.1038/onc.2013.126.
363. Pagano L, Pulsoni A, Vignetti M, et al. Acute megakaryoblastic leukemia: experience of GIMEMA trials. *Leukemia.* Sep 2002;16(9):1622-6. doi:10.1038/sj.leu.2402618

364. Bhatnagar N, Nizery L, Tunstall O, Vyas P, Roberts I. Transient Abnormal Myelopoiesis and AML in Down Syndrome: an Update. Review. *Current hematologic malignancy reports*. Oct 2016;11(5):333-41. doi:10.1007/s11899-016-0338-x
365. Hitzler JK, Zipursky A. Origins of leukaemia in children with Down syndrome. Review. *Nat Rev Cancer*. Jan 2005;5(1):11-20. doi:10.1038/nrc1525
366. Iacobucci I, Wen J, Meggendorfer M, et al. Genomic subtyping and therapeutic targeting of acute erythroleukemia. *Nat Genet*. Apr 2019;51(4):694-704. doi:10.1038/s41588-019-0375-1
367. Iacobucci I, Wen J, Meggendorfer M, et al. The Genomic Landscape of Childhood and Adult Acute Erythroid Leukemia (abstract 39). *Blood*. 2016;128(22):39-39.
368. Franks TM, McCloskey A, Shokirev M, Benner C, Rathore A, Hetzer MW. Nup98 recruits the Wdr82-Set1A/COMPASS complex to promoters to regulate H3K4 trimethylation in hematopoietic progenitor cells. *Genes Dev*. Nov 15 2017;31(22):2222-2234. doi:10.1101/gad.306753.117
369. Kennedy JA, Barabe F. Investigating human leukemogenesis: from cell lines to in vivo models of human leukemia. Research Support, Non-U.S. Gov't Review. *Leukemia*. Nov 2008;22(11):2029-40. doi:10.1038/leu.2008.206
370. Lin S, Luo RT, Ptasinska A, et al. Instructive Role of MLL-Fusion Proteins Revealed by a Model of t(4;11) Pro-B Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell*. Nov 14 2016;30(5):737-749. doi:10.1016/j.ccell.2016.10.008
371. Logan AC, Nightingale SJ, Haas DL, Cho GJ, Pepper KA, Kohn DB. Factors influencing the titer and infectivity of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther*. Oct 2004;15(10):976-88. doi:10.1089/hum.2004.15.976
372. Imren S, Heuser M, Gasparetto M, et al. Modeling de novo leukemogenesis from human cord blood with MN1 and NUP98HOXD13. *Blood*. Dec 4 2014;124(24):3608-12. doi:10.1182/blood-2014-04-564666
373. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. Jan 1 2013;29(1):15-21. doi:10.1093/bioinformatics/bts635
374. Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*. Aug 4 2011;12:323. doi:10.1186/1471-2105-12-323
375. von Bonin M, Wermke M, Cosgun KN, et al. In vivo expansion of co-transplanted T cells impacts on tumor re-initiating activity of human acute myeloid leukemia in NSG mice. *PLoS One*. 2013;8(4):e60680. doi:10.1371/journal.pone.0060680
376. Ross ME, Mahfouz R, Onciu M, et al. Gene expression profiling of pediatric acute myelogenous leukemia. *Blood*. Dec 1 2004;104(12):3679-87. doi:10.1182/blood-2004-03-1154
377. Mullighan CG, Kennedy A, Zhou X, et al. Pediatric acute myeloid leukemia with NPM1 mutations is characterized by a gene expression profile with dysregulated HOX gene expression distinct from MLL-rearranged leukemias. *Leukemia*. Sep 2007;21(9):2000-9. doi:10.1038/sj.leu.2404808
378. Lemieux S, Sargeant T, Laperriere D, et al. MiSTIC, an integrated platform for the analysis of heterogeneity in large tumour transcriptome datasets. *Nucleic Acids Res*. Jul 27 2017;45(13):e122. doi:10.1093/nar/gkx338
379. Gough SM, Goldberg L, Pineda M, et al. Progenitor B-1 B-cell acute lymphoblastic leukemia is associated with collaborative mutations in 3 critical pathways. *Blood Adv*. Sep 12 2017;1(20):1749-1759. doi:10.1182/bloodadvances.2017009837
380. van Galen P, Kreso A, Wienholds E, et al. Reduced lymphoid lineage priming promotes human hematopoietic stem cell expansion. *Cell Stem Cell*. Jan 2 2014;14(1):94-106. doi:10.1016/j.stem.2013.11.021
381. Dykstra B, Kent D, Bowie M, et al. Long-term propagation of distinct hematopoietic differentiation programs in vivo. *Cell Stem Cell*. Aug 16 2007;1(2):218-29. doi:10.1016/j.stem.2007.05.015

382. Vegi NM, Klappacher J, Oswald F, et al. MEIS2 Is an Oncogenic Partner in AML1-ETO-Positive AML. *Cell Rep.* Jul 12 2016;16(2):498-507. doi:10.1016/j.celrep.2016.05.094
383. Lai CK, Norddahl GL, Maetzig T, et al. Meis2 as a critical player in MN1-induced leukemia. *Blood Cancer J.* Sep 29 2017;7(9):e613. doi:10.1038/bcj.2017.86
384. Wilson NH, Key B. Neogenin: one receptor, many functions. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(5):874-8. doi:10.1016/j.biocel.2006.10.023
385. de Haan G, Zwart E, Dethmers-Ausema B, et al. Neogenin-1: A new receptor critical for hematopoietic stem cell function. *Experimental Hematology.* 2017;53:S47. doi:10.1016/j.exphem.2017.06.065
386. Hofmann I, Geer MJ, Vogtle T, et al. Congenital macrothrombocytopenia with focal myelofibrosis due to mutations in human G6b-B is rescued in humanized mice. *Blood.* Sep 27 2018;132(13):1399-1412. doi:10.1182/blood-2017-08-802769
387. Mazharian A, Wang YJ, Mori J, et al. Mice lacking the ITIM-containing receptor G6b-B exhibit macrothrombocytopenia and aberrant platelet function. *Sci Signal.* Oct 30 2012;5(248):ra78. doi:10.1126/scisignal.2002936
388. Melhem M, Abu-Farha M, Antony D, et al. Novel G6B gene variant causes familial autosomal recessive thrombocytopenia and anemia. *Eur J Haematol.* Mar 2017;98(3):218-227. doi:10.1111/ejh.12819
389. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest.* Jul 1989;84(1):92-9. doi:10.1172/JCI114175
390. Rossi DJ, Bryder D, Zahn JM, et al. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 28 2005;102(26):9194-9. doi:10.1073/pnas.0503280102
391. Wunderlich M, Chou FS, Link KA, et al. AML xenograft efficiency is significantly improved in NOD/SCID-IL2RG mice constitutively expressing human SCF, GM-CSF and IL-3. *Leukemia.* Oct 2010;24(10):1785-8. doi:10.1038/leu.2010.158
392. Billerbeck E, Barry WT, Mu K, Dorner M, Rice CM, Ploss A. Development of human CD4+FoxP3+ regulatory T cells in human stem cell factor-, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-, and interleukin-3-expressing NOD-SCID IL2Rgamma(null) humanized mice. *Blood.* Mar 17 2011;117(11):3076-86. doi:10.1182/blood-2010-08-301507
393. Taniguchi T. Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science.* Apr 14 1995;268(5208):251-5. doi:10.1126/science.7716517
394. Quelle FW, SN, Witthuhn BA, et al. JAK2 associates with the bcchain of the receptor for granulocyte-macrophage colony-stimulatingfactor, and its activation requires the mem- brane-proximal region. *Mol Cell Biol.* 1994;14:4335-41doi:10.1128/mcb.14.7.4335-4341.1994
395. Weiler SR, Mou S, DeBerry CS, et al. JAK2 is associated with the c-kit proto-oncogene product and is phosphorylated in response to stem cell factor. *Blood.* 1996;87(9):3688-3693. doi:10.1182/blood.V87.9.3688.bloodjournal8793688
396. Verlinden SF, Mulder AH, de Leeuw JP, van Bekkum DW. T lymphocytes determine the development of xeno GVHD and of human hemopoiesis in NOD/SCID mice following human umbilical cord blood transplantation. *Stem Cells.* 1998;16 Suppl 1:205-17. doi:10.1002/stem.5530160825
397. Gorin NC, Piantadosi S, Stull M, Bonte H, Wingard JR, Civin C. Increased risk of lethal graft-versus-host disease-like syndrome after transplantation into NOD/SCID mice of human mobilized peripheral blood stem cells, as compared to bone marrow or cord blood. *J Hematother Stem Cell Res.* Apr 2002;11(2):277-92. doi:10.1089/152581602753658466
398. Gregoire-Gauthier J, Durrieu L, Duval A, et al. Use of immunoglobulins in the prevention of GvHD in a xenogeneic NOD/SCID/gammac- mouse model. *Bone Marrow Transplant.* Mar 2012;47(3):439-50. doi:10.1038/bmt.2011.93

399. Wunderlich M, Brooks RA, Panchal R, Rhyasen GW, Danet-Desnoyers G, Mulloy JC. OKT3 prevents xenogeneic GVHD and allows reliable xenograft initiation from unfractionated human hematopoietic tissues. *Blood*. Jun 12 2014;123(24):e134-44. doi:10.1182/blood-2014-02-556340
400. Inaba H, Zhou Y, Abla O, et al. Heterogeneous cytogenetic subgroups and outcomes in childhood acute megakaryoblastic leukemia: a retrospective international study. *Blood*. Sep 24 2015;126(13):1575-84. doi:10.1182/blood-2015-02-629204
401. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res*. Jan 4 2018;46(D1):D1062-D1067. doi:10.1093/nar/gkx1153
402. Chen S, Francioli LC, Goodrich JK, et al. 2022;doi:10.1101/2022.03.20.485034
403. Bain BJ, Chakravorty S, Ancliff P. Congenital acute megakaryoblastic leukemia. *Am J Hematol*. Oct 2015;90(10):963. doi:10.1002/ajh.24109
404. Messiaen J, Uyttebroeck A, Michaux L, Vandenberghe P, Boeckx N, Jacobs SA. t(1;7;22)(p13;q21;q13) is a novel 3-way variant of t(1;22)(p13;q13) neonatal acute megakaryoblastic leukemia: A case report. *Mol Clin Oncol*. Mar 2023;18(3):18. doi:10.3892/mco.2023.2614
405. Lopez CK, Noguera E, Stavropoulou V, et al. Ontogenic Changes in Hematopoietic Hierarchy Determine Pediatric Specificity and Disease Phenotype in Fusion Oncogene-Driven Myeloid Leukemia. *Cancer Discov*. Dec 2019;9(12):1736-1753. doi:10.1158/2159-8290.CD-18-1463
406. Masetti R, Guidi V, Ronchini L, Bertuccio NS, Locatelli F, Pession A. The changing scenario of non-Down syndrome acute megakaryoblastic leukemia in children. *Crit Rev Oncol Hematol*. Jun 2019;138:132-138. doi:10.1016/j.critrevonc.2019.04.011
407. Ma Z, Morris SW, Valentine V, et al. Fusion of two novel genes, RBM15 and MKL1, in the t(1;22)(p13;q13) of acute megakaryoblastic leukemia. *Nat Genet*. Jul 2001;28(3):220-1. doi:10.1038/90054
408. Carroll A, Civin C, Schneider N, et al. The t(1;22)(p13;q13) is nonrandom and restricted to infants with acute megakaryoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group Study. *Blood*. Aug 1 1991;78(3):748-52.
409. van Zutven LJ, Onen E, Velthuisen SC, et al. Identification of NUP98 abnormalities in acute leukemia: JARID1A (12p13) as a new partner gene. *Genes Chromosomes Cancer*. May 2006;45(5):437-46. doi:10.1002/gcc.20308
410. Smith JL, Ries RE, Hylkema T, et al. Comprehensive Transcriptome Profiling of Cryptic CBFA2T3-GLIS2 Fusion-Positive AML Defines Novel Therapeutic Options: A COG and TARGET Pediatric AML Study. *Clin Cancer Res*. Feb 1 2020;26(3):726-737. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-1800
411. Le Q, Hadland B, Smith JL, et al. CBFA2T3-GLIS2 model of pediatric acute megakaryoblastic leukemia identifies FOLR1 as a CAR T cell target. *J Clin Invest*. Nov 15 2022;132(22)doi:10.1172/JCI157101
412. Li J, Kalev-Zylinska ML. Advances in molecular characterization of pediatric acute megakaryoblastic leukemia not associated with Down syndrome; impact on therapy development. *Front Cell Dev Biol*. 2023;11:1170622. doi:10.3389/fcell.2023.1170622
413. Chisholm KM, Smith J, Heerema-McKenney AE, et al. Pathologic, cytogenetic, and molecular features of acute myeloid leukemia with megakaryocytic differentiation: A report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer*. Feb 15 2023:e30251. doi:10.1002/pbc.30251
414. Fischer MA, Moreno-Miralles I, Hunt A, Chyla BJ, Hiebert SW. Myeloid translocation gene 16 is required for maintenance of haematopoietic stem cell quiescence. *EMBO J*. Mar 21 2012;31(6):1494-505. doi:10.1038/emboj.2011.500
415. Wen QJ, Yang Q, Goldenson B, et al. Targeting megakaryocytic-induced fibrosis in myeloproliferative neoplasms by AURKA inhibition. *Nat Med*. Dec 2015;21(12):1473-80. doi:10.1038/nm.3995
416. Tang T, Le Q, Castro S, et al. Targeting FOLR1 in high-risk CBF2AT3-GLIS2 pediatric AML with STRO-002

- FOLR1-antibody-drug conjugate. *Blood Adv.* Nov 22 2022;6(22):5933-5937. doi:10.1182/bloodadvances.2022008503
417. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* Mar 4 2011;144(5):646-74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
418. Parry N, Wheadon H, Copland M. The application of BH3 mimetics in myeloid leukemias. *Cell Death Dis.* Feb 26 2021;12(2):222. doi:10.1038/s41419-021-03500-6
419. Merino D, Kelly GL, Lessene G, Wei AH, Roberts AW, Strasser A. BH3-Mimetic Drugs: Blazing the Trail for New Cancer Medicines. *Cancer Cell.* Dec 10 2018;34(6):879-891. doi:10.1016/j.ccell.2018.11.004
420. Delbridge AR, Grabow S, Strasser A, Vaux DL. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies. *Nat Rev Cancer.* Feb 2016;16(2):99-109. doi:10.1038/nrc.2015.17
421. Singh R, Letai A, Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Mar 2019;20(3):175-193. doi:10.1038/s41580-018-0089-8
422. Strasser A, Vaux DL. Cell Death in the Origin and Treatment of Cancer. *Mol Cell.* Jun 18 2020;78(6):1045-1054. doi:10.1016/j.molcel.2020.05.014
423. Pollyea DA, Amaya M, Strati P, Konopleva MY. Venetoclax for AML: changing the treatment paradigm. *Blood Adv.* Dec 23 2019;3(24):4326-4335. doi:10.1182/bloodadvances.2019000937
424. Place AE, Goldsmith K, Bourquin JP, et al. Accelerating drug development in pediatric cancer: a novel Phase I study design of venetoclax in relapsed/refractory malignancies. *Future Oncol.* Sep 2018;14(21):2115-2129. doi:10.2217/fon-2018-0121
425. Pullarkat VA, Lacayo NJ, Jabbour E, et al. Venetoclax and Navitoclax in Combination with Chemotherapy in Patients with Relapsed or Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia and Lymphoblastic Lymphoma. *Cancer Discov.* Jun 2021;11(6):1440-1453. doi:10.1158/2159-8290.CD-20-1465
426. Opferman JT, Kothari A. Anti-apoptotic BCL-2 family members in development. *Cell Death Differ.* Jan 2018;25(1):37-45. doi:10.1038/cdd.2017.170
427. Kuusanmaki H, Leppa AM, Polonen P, et al. Phenotype-based drug screening reveals association between venetoclax response and differentiation stage in acute myeloid leukemia. *Haematologica.* Mar 2020;105(3):708-720. doi:10.3324/haematol.2018.214882
428. Chonghaile TN, Roderick JE, Glenfield C, et al. Maturation stage of T-cell acute lymphoblastic leukemia determines BCL-2 versus BCL-XL dependence and sensitivity to ABT-199. *Cancer Discov.* Sep 2014;4(9):1074-87. doi:10.1158/2159-8290.CD-14-0353
429. Pei S, Pollyea DA, Gustafson A, et al. Monocytic Subclones Confer Resistance to Venetoclax-Based Therapy in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Discov.* Apr 2020;10(4):536-551. doi:10.1158/2159-8290.CD-19-0710
430. Aldoss I, Yang D, Pillai R, et al. Association of leukemia genetics with response to venetoclax and hypomethylating agents in relapsed/refractory acute myeloid leukemia. *Am J Hematol.* Oct 2019;94(10):E253-E255. doi:10.1002/ajh.25567
431. DiNardo CD, Tiong IS, Quaglieri A, et al. Molecular patterns of response and treatment failure after frontline venetoclax combinations in older patients with AML. *Blood.* Mar 12 2020;135(11):791-803. doi:10.1182/blood.2019003988
432. Josefsson EC, James C, Henley KJ, et al. Megakaryocytes possess a functional intrinsic apoptosis pathway that must be restrained to survive and produce platelets. *J Exp Med.* Sep 26 2011;208(10):2017-31. doi:10.1084/jem.20110750
433. Mason KD, Carpinelli MR, Fletcher JJ, et al. Programmed anuclear cell death delimits platelet life span. *Cell.* Mar 23 2007;128(6):1173-86. doi:10.1016/j.cell.2007.01.037
434. Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, et al. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor.

- Cancer Res.* May 1 2008;68(9):3421-8. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-5836
435. Khan S, Zhang X, Lv D, et al. A selective BCL-XL PROTAC degrader achieves safe and potent antitumor activity. *Nat Med.* Dec 2019;25(12):1938-1947. doi:10.1038/s41591-019-0668-z
436. Kuusanmaki H, Dufva O, Vaha-Koskela M, et al. Erythroid/megakaryocytic differentiation confers BCL-XL dependency and venetoclax resistance in acute myeloid leukemia. *Blood.* Dec 12 2022;doi:10.1182/blood.2021011094
437. Ansari U, Tomellini E, Chagraoui J, et al. CEACAM1 is a novel culture-compatible surface marker of expanded long-term reconstituting hematopoietic stem cells. *Blood Adv.* Jun 28 2022;6(12):3626-3631. doi:10.1182/bloodadvances.2021006835
438. Aubert L, Nandagopal N, Steinhart Z, et al. Copper bioavailability is a KRAS-specific vulnerability in colorectal cancer. *Nat Commun.* Jul 24 2020;11(1):3701. doi:10.1038/s41467-020-17549-y
439. Fares I, Chagraoui J, Lehnertz B, et al. EPCR expression marks UM171-expanded CD34(+) cord blood stem cells. *Blood.* Jun 22 2017;129(25):3344-3351. doi:10.1182/blood-2016-11-750729
440. Fitter S, Tetaz TJ, Berndt MC, Ashman LK. Molecular cloning of cDNA encoding a novel platelet-endothelial cell tetra-span antigen, PETA-3. *Blood.* Aug 15 1995;86(4):1348-55.
441. Matsuo Y, Drexler HG, Kaneda K, et al. Megakaryoblastic leukemia cell line MOLM-16 derived from minimally differentiated acute leukemia with myeloid/NK precursor phenotype. *Leuk Res.* Feb 2003;27(2):165-71. doi:10.1016/s0145-2126(02)00081-4
442. Brodersen LE, Gerbing RB, Pardo ML, et al. Morphologic remission status is limited compared to DeltaN flow cytometry: a Children's Oncology Group AAML0531 report. *Blood Adv.* Oct 27 2020;4(20):5050-5061. doi:10.1182/bloodadvances.2020002070
443. Hay SB, Ferchen K, Chetal K, Grimes HL, Salomonis N. The Human Cell Atlas bone marrow single-cell interactive web portal. *Exp Hematol.* Dec 2018;68:51-61. doi:10.1016/j.exphem.2018.09.004
444. van Galen P, Hovestadt V, Wadsworth li MH, et al. Single-Cell RNA-Seq Reveals AML Hierarchies Relevant to Disease Progression and Immunity. *Cell.* Mar 7 2019;176(6):1265-1281 e24. doi:10.1016/j.cell.2019.01.031
445. Afreen S, Bohler S, Muller A, et al. BCL-XL expression is essential for human erythropoiesis and engraftment of hematopoietic stem cells. *Cell Death Dis.* Jan 6 2020;11(1):8. doi:10.1038/s41419-019-2203-z
446. Debrincat MA, Josefsson EC, James C, et al. Mcl-1 and Bcl-x(L) coordinately regulate megakaryocyte survival. *Blood.* Jun 14 2012;119(24):5850-8. doi:10.1182/blood-2011-12-398834
447. Roberts AW. Therapeutic development and current uses of BCL-2 inhibition. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* Dec 4 2020;2020(1):1-9. doi:10.1182/hematology.2020000154
448. Aid Z, Robert E, Lopez CK, et al. High caspase 3 and vulnerability to dual BCL2 family inhibition define ETO2::GLIS2 pediatric leukemia. *Leukemia.* Mar 2023;37(3):571-579. doi:10.1038/s41375-022-01800-0
449. Wunderlich M, Chen J, Sexton C, et al. PDX models of relapsed pediatric AML preserve global gene expression patterns and reveal therapeutic targets. *bioRxiv.* 2022:2022.01.31.478534. doi:10.1101/2022.01.31.478534
450. Mishra AK, Mullanfiroze K, Chiesa R, Vora A. Azacitidine and venetoclax for post-transplant relapse in a case of CBFA2T3/GLIS2 childhood acute myeloid leukaemia. *Pediatr Blood Cancer.* Nov 2021;68(11):e29221. doi:10.1002/psc.29221
451. Karol SE, Alexander TB, Budhreja A, et al. Venetoclax in combination with cytarabine with or without idarubicin in children with relapsed or refractory acute myeloid leukaemia: a phase 1, dose-escalation study. *Lancet Oncol.* Apr 2020;21(4):551-560. doi:10.1016/S1470-2045(20)30060-7

452. Kaefer A, Yang J, Noertersheuser P, et al. Mechanism-based pharmacokinetic/pharmacodynamic meta-analysis of navitoclax (ABT-263) induced thrombocytopenia. *Cancer Chemother Pharmacol*. Sep 2014;74(3):593-602. doi:10.1007/s00280-014-2530-9
453. Wilson WH, O'Connor OA, Czuczman MS, et al. Navitoclax, a targeted high-affinity inhibitor of BCL-2, in lymphoid malignancies: a phase 1 dose-escalation study of safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumour activity. *Lancet Oncol*. Dec 2010;11(12):1149-59. doi:10.1016/S1470-2045(10)70261-8
454. Loh ML, Tasian SK, Rabin KR, et al. A phase 1 dosing study of ruxolitinib in children with relapsed or refractory solid tumors, leukemias, or myeloproliferative neoplasms: A Children's Oncology Group phase 1 consortium study (ADVL1011). *Pediatr Blood Cancer*. Oct 2015;62(10):1717-24. doi:10.1002/pbc.25575
455. Gonzalez Vicent M, Molina B, Gonzalez de Pablo J, Castillo A, Diaz MA. Ruxolitinib treatment for steroid refractory acute and chronic graft vs host disease in children: Clinical and immunological results. *Am J Hematol*. Mar 2019;94(3):319-326. doi:10.1002/ajh.25376
456. Pardanani A, Gotlib JR, Jamieson C, et al. Safety and efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *J Clin Oncol*. Mar 1 2011;29(7):789-96. doi:10.1200/JCO.2010.32.8021
457. Bhagwat N, Koppikar P, Keller M, et al. Improved targeting of JAK2 leads to increased therapeutic efficacy in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. Mar 27 2014;123(13):2075-83. doi:10.1182/blood-2014-01-547760
458. Koppikar P, Bhagwat N, Kilpivaara O, et al. Heterodimeric JAK-STAT activation as a mechanism of persistence to JAK2 inhibitor therapy. *Nature*. Sep 6 2012;489(7414):155-9. doi:10.1038/nature11303
459. James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. Apr 28 2005;434(7037):1144-8. doi:10.1038/nature03546
460. Ianevski A, Giri AK, Aittokallio T. SynergyFinder 2.0: visual analytics of multi-drug combination synergies. *Nucleic Acids Res*. Jul 2 2020;48(W1):W488-W493. doi:10.1093/nar/gkaa216
461. Quintas-Cardama A, Vaddi K, Liu P, et al. Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. Apr 15 2010;115(15):3109-17. doi:10.1182/blood-2009-04-214957
462. Fridman JS, Scherle PA, Collins R, et al. Selective inhibition of JAK1 and JAK2 is efficacious in rodent models of arthritis: preclinical characterization of INCB028050. *J Immunol*. May 1 2010;184(9):5298-307. doi:10.4049/jimmunol.0902819
463. Kudlacz E, Perry B, Sawyer P, et al. The novel JAK-3 inhibitor CP-690550 is a potent immunosuppressive agent in various murine models. *Am J Transplant*. Jan 2004;4(1):51-7. doi:10.1046/j.1600-6143.2003.00281.x
464. Li J, Kim SG, Blenis J. Rapamycin: one drug, many effects. *Cell Metab*. Mar 4 2014;19(3):373-9. doi:10.1016/j.cmet.2014.01.001
465. Chiang GG, Abraham RT. Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase. *J Biol Chem*. Jul 8 2005;280(27):25485-90. doi:10.1074/jbc.M501707200
466. Hara K, Maruki Y, Long X, et al. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*. Jul 26 2002;110(2):177-89. doi:10.1016/s0092-8674(02)00833-4
467. Pike KG, Malagu K, Hummersone MG, et al. Optimization of potent and selective dual mTORC1 and mTORC2 inhibitors: the discovery of AZD8055 and AZD2014. *Bioorg Med Chem Lett*. Mar 1 2013;23(5):1212-6. doi:10.1016/j.bmcl.2013.01.019
468. Liu Q, Xu C, Kirubakaran S, et al. Characterization of Torin2, an ATP-competitive inhibitor of mTOR, ATM, and ATR. *Cancer Res*. Apr 15 2013;73(8):2574-86. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-1702

469. Markman B, Tabernero J, Krop I, et al. Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of the oral phosphatidylinositol-3-kinase and mTOR inhibitor BGT226 in patients with advanced solid tumors. *Ann Oncol.* Sep 2012;23(9):2399-2408. doi:10.1093/annonc/mds011
470. Bliss CI. The calculation of microbial assays. *Bacteriol Rev.* Dec 1956;20(4):243-58. doi:10.1128/br.20.4.243-258.1956
471. Tvorogov D, Thomas D, Liao NPD, et al. Accumulation of JAK activation loop phosphorylation is linked to type I JAK inhibitor withdrawal syndrome in myelofibrosis. *Sci Adv.* Nov 2018;4(11):eaat3834. doi:10.1126/sciadv.aat3834
472. Tefferi A, Pardanani A. Serious adverse events during ruxolitinib treatment discontinuation in patients with myelofibrosis. *Mayo Clin Proc.* Dec 2011;86(12):1188-91. doi:10.4065/mcp.2011.0518
473. Coltro G, Mannelli F, Guglielmelli P, Pacilli A, Bosi A, Vannucchi AM. A life-threatening ruxolitinib discontinuation syndrome. *Am J Hematol.* Aug 2017;92(8):833-838. doi:10.1002/ajh.24775
474. Besancenot R, Roos-Weil D, Tonetti C, et al. JAK2 and MPL protein levels determine TPO-induced megakaryocyte proliferation vs differentiation. *Blood.* Sep 25 2014;124(13):2104-15. doi:10.1182/blood-2014-03-559815
475. Meyer SC, Keller MD, Chiu S, et al. CHZ868, a Type II JAK2 Inhibitor, Reverses Type I JAK Inhibitor Persistence and Demonstrates Efficacy in Myeloproliferative Neoplasms. *Cancer Cell.* Jul 13 2015;28(1):15-28. doi:10.1016/j.ccell.2015.06.006
476. Andraos R, Qian Z, Bonenfant D, et al. Modulation of activation-loop phosphorylation by JAK inhibitors is binding mode dependent. *Cancer Discov.* Jun 2012;2(6):512-523. doi:10.1158/2159-8290.CD-11-0324
477. Boer JM, Valsecchi MG, Hormann FM, et al. Favorable outcome of NUTM1-rearranged infant and pediatric B cell precursor acute lymphoblastic leukemia in a collaborative international study. *Leukemia.* Oct 2021;35(10):2978-2982. doi:10.1038/s41375-021-01333-y
478. Daver N, Schlenk RF, Russell NH, Levis MJ. Targeting FLT3 mutations in AML: review of current knowledge and evidence. *Leukemia.* Feb 2019;33(2):299-312. doi:10.1038/s41375-018-0357-9
479. Minervini CF, Cumbo C, Orsini P, et al. Nanopore Sequencing in Blood Diseases: A Wide Range of Opportunities. *Front Genet.* 2020;11:76. doi:10.3389/fgene.2020.00076
480. Lahnemann D, Koster J, Szczurek E, et al. Eleven grand challenges in single-cell data science. *Genome Biol.* Feb 7 2020;21(1):31. doi:10.1186/s13059-020-1926-6
481. Turajlic S, Sottoriva A, Graham T, Swanton C. Resolving genetic heterogeneity in cancer. *Nat Rev Genet.* Jul 2019;20(7):404-416. doi:10.1038/s41576-019-0114-6
482. Fennell KA, Vassiliadis D, Lam EYN, et al. Non-genetic determinants of malignant clonal fitness at single-cell resolution. *Nature.* Jan 2022;601(7891):125-131. doi:10.1038/s41586-021-04206-7
483. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* Feb 17 1994;367(6464):645-8. doi:10.1038/367645a0
484. Mandoli A, Singh AA, Prange KHM, et al. The Hematopoietic Transcription Factors RUNX1 and ERG Prevent AML1-ETO Oncogene Overexpression and Onset of the Apoptosis Program in t(8;21) AMLs. *Cell Rep.* Nov 15 2016;17(8):2087-2100. doi:10.1016/j.celrep.2016.08.082
485. Lu Y, Xu YB, Yuan TT, et al. Inducible expression of AML1-ETO fusion protein endows leukemic cells with susceptibility to extrinsic and intrinsic apoptosis. *Leukemia.* Jun 2006;20(6):987-93. doi:10.1038/sj.leu.2404218
486. Goardon N, Lambert JA, Rodriguez P, et al. ETO2 coordinates cellular proliferation and differentiation during erythropoiesis. *EMBO J.* Jan 25 2006;25(2):357-66. doi:10.1038/sj.emboj.7600934

487. Sasca D, Szybinski J, Schuler A, et al. NCAM1 (CD56) promotes leukemogenesis and confers drug resistance in AML. *Blood*. May 23 2019;133(21):2305-2319. doi:10.1182/blood-2018-12-889725

488. Cheung A, Bax HJ, Josephs DH, et al. Targeting folate receptor alpha for cancer treatment. *Oncotarget*. Aug 9 2016;7(32):52553-52574. doi:10.18632/oncotarget.9651

489. Rui Y, Green JJ. Overcoming delivery barriers in immunotherapy for glioblastoma. *Drug Deliv Transl Res*. Dec 2021;11(6):2302-2316. doi:10.1007/s13346-021-01008-2

490. de The H, Pandolfi PP, Chen Z. Acute Promyelocytic Leukemia: A Paradigm for Oncoprotein-Targeted Cure. *Cancer Cell*. Nov 13 2017;32(5):552-560. doi:10.1016/j.ccell.2017.10.002

491. Cermakova K, Tesina P, Demeulemeester J, et al. Validation and structural characterization of the LEDGF/p75-MLL interface as a new target for the treatment of MLL-dependent leukemia. *Cancer Res*. Sep 15 2014;74(18):5139-51. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-3602

492. Hafner M, Niepel M, Chung M, Sorger PK. Growth rate inhibition metrics correct for confounders in measuring sensitivity to cancer drugs. *Nat Methods*. Jun 2016;13(6):521-7. doi:10.1038/nmeth.3853

493. Hafner M, Niepel M, Sorger PK. Alternative drug sensitivity metrics improve preclinical cancer pharmacogenomics. *Nat Biotechnol*. Jun 7 2017;35(6):500-502. doi:10.1038/nbt.3882