

Université de Montréal

**Caractérisation cytogénétique et clinique des gènes de fusion impliquant *MLL*
dans les leucémies**

Par
Hend Chaker

Sciences biomédicales
Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise en Sciences (M.Sc.)
en Sciences Biomédicales

Avril 2010

©Hend Chaker, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Caractérisation cytogénétique et clinique des gènes de fusion
impliquant *MLL* dans les leucémies

Présenté par :
Hend Chaker

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Frédérique Tihi, président-rapporteur
Josée Hébert, Directeur de recherche
Dr Julie Bergeron, membre du jury

Résumé

Le gène *MLL* (Mixed-Lineage Leukemia), un homologue du gène trithorax de la Drosophile, localisé à la bande chromosomique 11q23, est fréquemment réarrangé dans plusieurs types de leucémies, essentiellement suite à des translocations chromosomiques. Dans les différentes translocations chromosomiques, la partie N-terminale de *MLL* est fusionnée avec les séquences d'un gène partenaire. Malgré le grand nombre de partenaires de fusion rapportés, peu de fusions *MLL* ont été bien caractérisées sur le plan moléculaire. De plus, l'impact pronostique de plusieurs fusions moins fréquentes n'est pas bien établi. L'objectif de mon projet est de caractériser plusieurs translocations *MLL* qui ont été détectées dans 39 spécimens leucémiques collectés par la Banque de cellules leucémiques du Québec (www.bclq.gouv.qc.ca), et d'établir une corrélation entre les résultats de la cytogénétique et différents paramètres biologiques et cliniques des leucémies respectives. L'identification des gènes partenaires de fusion (GPF) dans notre série (30 échantillons étudiés), a révélé la fusion de *MLL* à un gène partenaire très récurrent dans 26 leucémies: *MLLT3(AF9)*, *AFF1(AF4)*, *MLLT4(AF6)*, *MLLT1(ENL)*, *ELL*; à un GPF modérément commun dans 1 leucémie: *MLLT6(AF17)*; et à un partenaire rare de *MLL* dans 3 leucémies: *GAS7* et *AF15/CASC5* (2 cas). Nous avons poursuivi notre travail avec la caractérisation des points de cassure de deux fusions, soit *MLL-ELL* associée à un syndrome myéloprolifératif (une association rare), et *MLL-GAS7* (une fusion rare de *MLL*), associée à une leucémie aiguë myéloïde. L'analyse des transcrits de fusion par RT-PCR et séquençage a révélé respectivement la fusion de l'exon 9 de *MLL* à l'exon 2 de *ELL* et des exons 7 ou 8 de *MLL* (deux transcrits) à l'exon 2 de *GAS7*. Ce travail permettra d'effectuer des études fonctionnelles et des projets de recherche translationnelle en utilisant ces spécimens de leucémies avec différents réarrangements de *MLL*, bien caractérisés sur le plan clinique et moléculaire.

Mots-clés : *MLL*, leucémie, translocation, cytogénétique, partenaire de fusion.

Abstract

The *MLL* (Mixed-Lineage Leukemia) gene, a human homolog of the *Drosophila trithorax* gene, located at chromosomal band 11q23, is frequently rearranged in several types of leukemia, mostly by chromosomal translocations. In different chromosomal translocations, the N-terminal part of *MLL* is fused to sequences of the partner gene. Despite the large number of fusion partners that have been reported, several gene fusions remain poorly characterized at the molecular level. Moreover, the prognostic impact of less frequent fusions is not well established. The aim of my project is to characterize different *MLL* fusions detected in 39 leukemic samples, collected by the Quebec Leukemia Cell Bank (www.bclq.gouv.qc.ca) and to correlate cytogenetics with the clinical and biological features of the corresponding leukemia. Identification of fusion partner genes in our series (30 samples studied), revealed fusion of *MLL* to one of the most frequent partners in 26 leukemias: *MLLT3(AF9)*, *AFF1(AF4)*, *MLLT4(AF6)*, *MLLT1(ENL)*, *ELL*; to a moderately common *MLL* fusion partner in 1 leukemia: *MLLT6(AF17)*; and to a rare partner in 3 leukemias: *GAS7* and *AF15/CASC5* (2 cases). We have characterized the breakpoints of two fusions, *MLL-ELL* in a myeloproliferative syndrome (a rare association) and *MLL-GAS7* (a rare *MLL* fusion) associated with acute myeloid leukemia. Fusion transcripts analysis by RT-PCR and sequencing revealed respectively, a fusion of *MLL* exon 9 to *ELL* exon 2 and of *MLL* exon 7 or exon 8 (two transcripts) to *GAS7* exon 2. This study is essential to perform functional studies and translational research projects using these well characterized leukemic specimens with different *MLL* rearrangements.

Keywords : *MLL*, leukemia, translocation, cytogenetic, fusion partner.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	iv
Table des matières	v
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations	xii
Remerciements	xiv
Dédicace	xv
<u>Chapitre I : Introduction</u>	1
1. Les leucémies	2
1.1 Hématopoïèse normale	2
1.2 Leucémogenèse	6
1.3 Classification des leucémies aiguës	7
1.3.1 Leucémies aiguës myéloïdes	7
1.3.2 Leucémies aiguës lymphoïdes	9
2. Translocations chromosomiques et gènes de fusion dans les leucémies	11
2.1 Mécanismes responsables des translocations chromosomiques	12
2.2 Translocations chromosomiques récurrentes dans les leucémies	14
2.3 Conséquences moléculaires des translocations chromosomiques	14
2.3.1 Dérégulation de l'expression de gènes normaux	14
2.3.2 Création d'un gène de fusion chimérique	16

3. Le gène <i>MLL</i> (Mixed-Lineage Leukemia)	17
3.1 Les cancers hématologiques impliquant <i>MLL</i>	19
3.2 Rôle de <i>MLL</i> dans le développement embryonnaire et l'expression des gènes <i>Hox</i>	20
3.3 Description de <i>MLL</i>	21
3.4 Les anomalies chromosomiques impliquant <i>MLL</i>	22
3.4.1 Translocation chromosomique	22
3.4.2 Duplication en tandem de <i>MLL</i> (<i>MLL</i> -PTD).....	23
3.4.3 Amplification de <i>MLL</i>	24
3.5 Les partenaires de fusion de <i>MLL</i>	25
3.6 Mécanismes de leucémogénèse des fusions <i>MLL</i>	26
3.7 Mécanisme de leucémogénèse de <i>MLL</i> -PTD	28
4. Objectifs spécifiques du projet de Maîtrise	30
<u>Chapitre II : Matériel et Méthodes</u>	31
1. Approche expérimentale	32
2. Lignées cellulaires et spécimens étudiés	33
3. Obtention des chromosomes	35
3.1 Décongélation des cellules	35

3.2 Culture Cellulaire	35
3.3 Préparation des métaphases	36
3.3.1 Récolte cellulaire.....	36
3.3.2 Marquage des chromosomes	38
4. Hybridation in Situ en Fluorescence (FISH) utilisant des BACs	38
5. Séquençage des gènes de fusion <i>MLL</i>	42
6. Établissement du caryotype spectral	44
<u>Chapitre III : Résultats obtenus</u>.....	45
1. Caractéristiques cliniques des patients présentant l'anomalie 11q23 et incidence des différentes translocations impliquant cette anomalie dans notre échantillonnage.....	46
2. Identification des partenaires de fusion communs de <i>MLL</i>	50
2.1 Translocations t(9;11)(p22;q23), t(6;11)(q27;q23) et t(4;11)(q21;q23).....	50
2.2 Translocation t(11;19)(q23;p13)	53
3. Identification des partenaires de fusion rares de <i>MLL</i>	62
3.1 Translocation t(11;17)(q23;p13)	62
3.2 Translocation t(11;15)(q23;q14)	64
3.3 Patient 08H139.....	66
<u>Chapitre IV : Discussion et Conclusion</u>	69
Bibliographie	80

Liste des tableaux

Tableau I: Les spécimens de leucémies avec réarrangements de <i>MLL</i>	34
Tableau II: BACs utilisés pour l'identification des gènes partenaires de fusion de <i>MLL</i> ...	42
Tableau III: Amorces utilisées pour le séquençage des cas cités	43
Tableau IV: Incidence des translocations impliquant le gène <i>MLL</i> dans notre cohorte	49
Tableau V : Les partenaires de fusion de <i>MLL</i> identifiés et techniques utilisées.....	64

Liste des figures

Figure 1: Modèle hiérarchique de l'hématopoïèse et sa régulation par les facteurs de transcription.....	5
Figure 2: Conséquences d'une translocation chromosomique réciproque.....	15
Figure 3: Schématisation du chromosome 11 avec localisation du gène <i>MLL</i>	18
Figure 4: Représentation schématique de la protéine MLL.....	22
Figure 5: Protéine de fusion MLL.....	23
Figure 6: Approche expérimentale du projet de recherche.....	32
Figure 7: Exemple de la sélection d'un BAC pour étudier un locus ou un gène.....	39
Figure 8: Caryotype et analyse FISH du patient 07H041 présentant la t(9;11)(p22;q23)...	46
Figure 9: Caryotype et analyse FISH du patient 01H001 présentant la t(6;11)(q27;q23)....	52
Figure 10: Caryotype et FISH du patient 08H110 présentant la t(4;11)(q21;q23).....	52
Figure 11: Analyse FISH des patients 07H003 et 07H073 avec le BAC RP11-908B10 ...	54
Figure 12: Caryotype en bandes G du patient 04H121 présentant la t(11;19)(q23;p13)	55
Figure 13 : Analyse FISH du patient 04H121 avec le BAC RP11-908B10	56

Figure 14: Analyse FISH du patient 04H121 avec autres BACs	56
Figure 15: Transcrits chimériques <i>MLL-ELL</i> du patient 04H121	57
Figure 16: Caryotype en bandes G du patient 06H057	58
Figure 17: Caryotype spectral du patient 06H057.....	58
Figure 18: Analyse FISH du patient 06H057et Séquençage de la fusion <i>MLL-ELL</i>	59
Figure 19: Analyse FISH du patient 02H017	60
Figure 20: Caryotype en bandes G du patient 07H045	61
Figure 21: Analyse FISH du patient 07H045	61
Figure 22: Caryotype en bandes G des cellules leucémiques du patient 06H152	63
Figure 23: Analyse FISH des cellules leucémiques du patient 06H152	63
Figure 24: Les transcrits chimériques <i>MLL-GAS7</i> du patient 06H152	64
Figure 25: Caryotype en bandes G des patients 06H066 et 08-1385	65
Figure 26: Analyse FISH des cellules leucémiques des patients 06H066 et 08-1385.....	66
Figure 27: Schéma représentatif illustrant les BACs utilisés pour délimiter la région de cassure au niveau du chromosome 19 pour le patient 08H139.....	67

Figure 28: Protéine putative codée par la fusion *MLL-GAS7*75

Liste des abréviations :

ADN: acide désoxyribonucléique

BACs: bacterial artificial chromosomes

BCLQ: Banque de Cellules Leucémiques du Québec

CALGB: Cancer And Leukemia Group B

CSL: cellule souche leucémique

CLP: common lymphoid progenitor

CMP: common myeloid progenitor

CSH: cellule souche hématopoïétique

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

DMSO : diméthyl sulfoxyde

EPO: érythropoïétine

ECOG: Eastern Cooperative Oncology Group

FISH: fluorescence in situ hybridization

G-CSF: granulocyte-colony stimulating factor

GF: gène de fusion

GPF: gène partenaire de fusion

HDAC: histone désacétylase

HMT: histone méthyl transférase

HSR: homogeneous staining region

IL1: interleukine 1

IL6: Interleukine 6

KDM: histone lysine déméthylase

KMT: histone lysine méthyltransférase

LA: leucémie aiguë

LAL: leucémie aiguë lymphoïde

LAM: leucémie aiguë myéloïde

LMC: leucémie myéloïde chronique

M-CSF: myeloid-colony stimulating factor
MPPs: multipotent primitive progenitor
MRC: Medical Research Council
NHEJ: non homologous end joining
POG: Pediatric Oncology Group
PTD: partial tandem duplication
RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction
SCF: stem cell factor
SKY: spectral karyotype
SMD: syndrome myélodysplasique
SMP: syndrome myéloprolifératif
SWOG: Southwest Oncology Group
TD: transactivation domain
TK: tyrosine kinase
t-LAM: leucémie aiguë myéloïde secondaire à un traitement
t-LAL: leucémie aiguë lymphoïde secondaire à un traitement
t-SMD: syndrome myélodysplasique secondaire à un traitement

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Dr Josée Hébert, pour m'avoir confié ce projet, pour toute la motivation qu'elle m'a procurée et les précieux conseils qu'elle m'a donnés tout au long de ma maîtrise.

J'aimerais aussi remercier toute l'équipe de cytogénétique de la Banque de cellules leucémiques du Québec pour ce qu'ils m'ont appris et pour leur contribution dans la réalisation de mon projet.

Enfin, j'aimerais remercier les étudiantes, Sawcène Hazourli, Amélie Giguère et Marie Noëlle Séguin-Grignon, pour les conseils et la compagnie agréable qu'elles m'ont offerts pendant ma maîtrise.

À Tarek et Kenza.

Chapitre I

-Introduction-

1. Les leucémies

Les leucémies aiguës sont définies comme un groupe hétérogène d'hémopathies malignes caractérisées par l'expansion clonale, au niveau de la moelle osseuse, de cellules immatures (blastes), appartenant à la lignée myéloïde en cas de leucémie aiguë myéloïde (LAM), et à la lignée lymphoïde en cas de leucémie aiguë lymphoïde (LAL). Cette prolifération entraîne une inhibition de l'hématopoïèse normale liée à l'importance de la masse leucémique.

La leucémie est l'un des cancers dont l'incidence et surtout la mortalité sont les plus élevées (le cancer de la prostate, des poumons, du sein, du côlon et rectum et les lymphomes non hodgkiniens étant parmi les plus fréquents), selon les statistiques de la Société Canadienne du cancer, 2009. Son incidence est estimée à 4700 nouveaux cas pour l'année 2009, avec un nombre de décès de 2500. Chez les enfants (entre 0 à 14 ans), la leucémie devient le cancer le plus fréquent et le plus malin, avec une incidence de 1345 nouveaux cas (principalement la leucémie aiguë lymphoïde) entre 2001 et 2005, et un nombre de décès de 184 cas entre 2000 et 2004.

1.1 Hématopoïèse normale

L'hématopoïèse se définit comme un ensemble de mécanismes assurant la production continue et régulée des cellules sanguines matures, ayant une durée de vie limitée et incapables de se renouveler. Le sang contient différents types de cellules, ayant des caractéristiques et fonctions biologiques différentes; un rôle dans le transport de l'oxygène pour les globules rouges, dans l'inflammation et la phagocytose pour les granulocytes et les monocytes, dans l'hémostase pour les plaquettes et dans l'immunité spécifique pour les lymphocytes. Cette large panoplie cellulaire dérive d'une cellule souche hématopoïétique (CSH), dotée d'un potentiel d'autorenouvellement (la capacité de donner naissance, en se divisant, à des cellules filles qui lui sont identiques) et une capacité d'engagement en différenciation (orientation progressive vers une lignée spécialisée).¹ Au niveau de la moelle osseuse, site de l'hématopoïèse pendant la vie post-

utérine, la CSH perd graduellement son potentiel d'autorenouvellement, et se différencie progressivement en progéniteurs. Les progéniteurs primitifs multipotents (MPPs) se différencient à leur tour en progéniteurs communs de cellules myéloïdes (CMPs) ou en progéniteurs communs de cellules lymphoïdes (CLPs). Après l'engagement de différenciation en une lignée spécifique, ces progéniteurs aboutissent, par différenciation et maturité, en cellules terminales retrouvées dans le sang : les granulocytes/monocytes, les plaquettes et les érythrocytes pour les CMPs et les lymphocytes B et T pour les CLPs.²

En résumé, l'hématopoïèse comprend l'autorenouvellement des cellules souches, l'engagement de ces cellules, progressivement, dans des lignées spécifiques, et la différenciation et maturation des progéniteurs engagés en cellules sanguines fonctionnelles.

La régulation de l'hématopoïèse est complexe. Elle dépend essentiellement de facteurs de croissance et de l'existence d'un micro-environnement médullaire (matrice extracellulaire et cellules stromales : fibroblastes, cellules endothéliales, adipocytes). Plusieurs facteurs de croissance sont impliqués dans la régulation de toute l'hématopoïèse, en agissant principalement au niveau des progéniteurs primitifs, comme l'IL1 (interleukine 1), l'IL6 (interleukine 6) et le SCF (stem cell factor). D'autres sont plutôt spécifiques à une lignée, en agissant sur des progéniteurs plus tardifs, comme l'EPO (érythropoïétine), le M-CSF (myeloid-colony stimulating factor) et le G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor).³ Cette régulation spécifique est importante étant donné la différence de durée de vie et la diversité de fonctions des cellules sanguines. Le rôle de ces cytokines et de l'environnement de la cellule dans son engagement de différenciation n'est pas encore bien élucidé. Ces signaux pourraient être déterminants dans l'engagement en différenciation de la cellule ou autoriseraient uniquement la survie, la prolifération et la différenciation de la cellule, en offrant un environnement permissif et sélectif, n'ayant pas ainsi de responsabilité dans le destin de la cellule (renouvellement versus détermination).⁴ Cette décision est probablement dictée par des

facteurs de transcription, dont les mécanismes de contrôle sont loin d'être totalement connus.

L'engagement d'une cellule pluripotente en lignée spécifique est le résultat de l'activité de plusieurs facteurs de transcription (protéines régulatrices), qui confèrent le phénotype spécifique de la cellule. L'activité de certains facteurs de transcription est plutôt associée à la différenciation d'une lignée, comme GATA1 (différenciation terminale des érythrocytes et des mégacaryocytes) et SPI1/PU1 (essentiel pour le développement des granulocytes, des lymphocytes B et T et des macrophages), tandis que l'activité d'autres facteurs est plutôt requise pour la formation ou les fonctions de la CSH, comme par exemple MLL (Mixed-Lineage Leukemia), RUNX1, ETV6, TAL1 et LMO.⁵ Malgré cette possible distinction dans le niveau d'action de ces facteurs, ceci n'exclut pas la possible intervention de ces protéines dans d'autres stades de l'hématopoïèse (voir figure 1).

Les gènes *MLL*, *RUNX1*, *ETV6*, *TAL1* et *LMO2* sont fréquemment impliqués dans des translocations chromosomiques associées à des néoplasies hématologiques, essentiellement des leucémies aiguës.

La caractérisation moléculaire des translocations chromosomiques détectées dans les cellules leucémiques des patients a permis l'identification de plusieurs gènes impliqués dans la régulation de l'hématopoïèse normale et la leucémogénèse. Leur rôle critique a été confirmé par des expériences de Knock-out et d'induction d'expression dans des modèles murins expérimentaux.

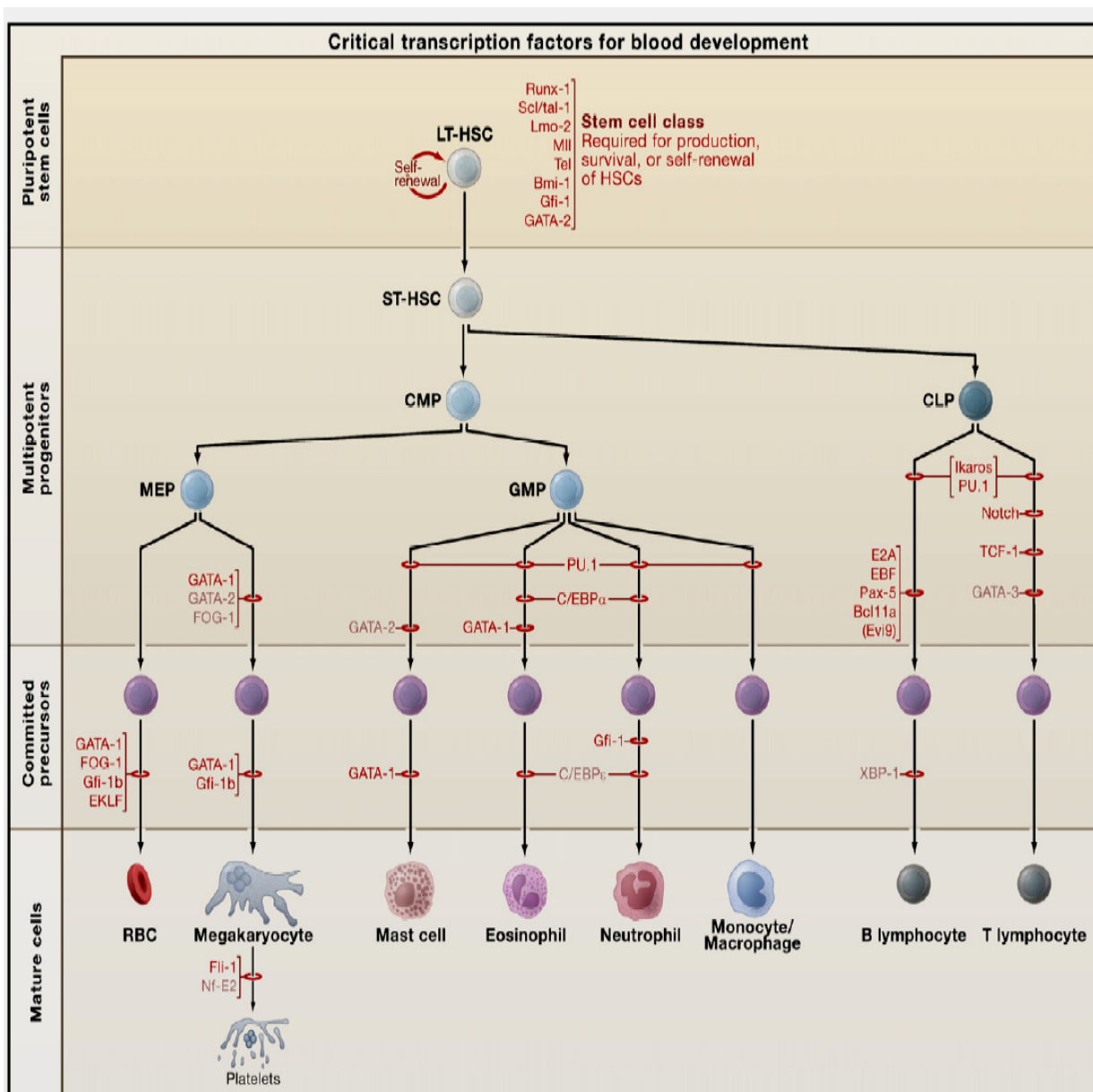


Figure 1: Modèle hiérarchique de l'hématopoïèse et sa régulation par les facteurs de transcription. Tiré de Cell 2008; 132 :631-644. La figure montre le stade de blocage de l'hématopoïèse en absence du facteur de transcription noté. Abréviations : LT-HSC, long-term hematopoietic stem cell; ST-HSC, short term hematopoietic stem cell; CMP, common myeloid progenitor; CLP, common lymphoid progenitor; MEP, megakaryocyte/erythroid progenitor; GMP, granulocyte/macrophage progenitor; RBC, red blood cells.

1.2 Leucémogénèse

La leucémogénèse est le résultat d'une accumulation d'altérations génétiques et/ou épigénétiques dans des cellules hématopoïétiques, responsables de la transformation leucémique. La cellule souche leucémique (CSL) est la cellule qui initie le clone leucémique suite à sa prolifération continue et anarchique. L'autorenouvellement et le blocage de différenciation sont des propriétés de la CSL. Différents gènes impliqués dans l'autorenouvellement ou la différenciation des cellules souches hématopoïétiques sont dérégulés dans les leucémies, comme les gènes *HOX*, la voie WNT/ β CATENINE et l'axe PTEN/AKT/FOXO affectant les propriétés d'autorenouvellement, ou les gènes *SPI1/PUI* et *CEBPA* associés à la différenciation myéloïde.

L'origine de la CSL est encore discutée. La cellule souche hématopoïétique normale (CSH) pourrait être la cellule ciblée par la transformation. Les caractéristiques communes de la CSH et de la CSL, la capacité d'autorenouvellement illimitée, le niveau d'expression de la télomérase, l'immaturité des cellules leucémiques capables de reproduire la leucémie chez des souris SCID (CD34+CD38-) ainsi que la longue durée de vie de la CSH, permettant l'accumulation des mutations génétiques requises pour la transformation, explique la considération de la CSH comme une origine potentielle de la CSL.⁶ Par ailleurs, la transfection de quelques oncogènes, comme les gènes de fusion *MLL-ENL*,⁷ *MLL-GAS7*⁸ et *MLL-AF9*,⁹ dérivant respectivement des translocations t(11;19)(q23;p13.3), t(11;17)(q23;p13) et t(9;11)(p22,q23), a été capable de restaurer les propriétés d'autorenouvellement dans des progéniteurs n'ayant pas ce potentiel. La transplantation de ces cellules transfectées chez des souris a pu induire des leucémies. Il est donc possible que la CSL prenne origine dans des cellules plus matures que les CSH, qui ont acquis un potentiel d'autorenouvellement suite à des transformations oncogéniques.

1.3 Classification des leucémies aiguës

1.3.1 Leucémies aiguës Myéloïdes

La «WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 2008 », classe les LAM en 4 groupes:

Le premier groupe correspond à des LAM qui présentent des anomalies génétiques récurrentes, correspondant à des anomalies chromosomiques (translocation/inversion) ou à des mutations génétiques spécifiques, leur conférant une entité bien caractérisée sur le plan morphologique et pronostique.

Dans ce groupe, on retrouve les LAM présentant les translocations suivantes, associées à différents gènes de fusion (GF) :

- ◆ La t(8;21)(q22;q22)/ GF: *RUNX1-RUNX1T1*.
- ◆ Leucémie myélomonocytaire avec l'inv(16)(p13.1q22) ou la t(16;16)(p13.1;q22)/ GF: *CBFB-MYH11*.
- ◆ La t(15;17)(q24;q21)/ GF: *PML-RARA*.
- ◆ La t(9;11)(p22;q23)/ GF: *MLLT3-MLL*, ainsi que d'autres fusion *MLL* suite à différentes translocations.
- ◆ La t(6;9)(p23;q34)/ GF: *DEK-NUP214*
- ◆ Leucémie aiguë myéloïde avec inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2)/ GF: *RPNI-EVII*
- ◆ La leucémie aiguë myéloïde (mégacaryoblastique) avec t(1;22)(p13;q13)/ GF: *RBM15-MKLI*

Les LAM avec les mutations *NPM1* ou *CEBPA* ont été classées dans le WHO 2008 comme deux entités provisoires. La mutation *FLT3* n'a pas été retenue comme une entité distincte vu son association fréquente avec d'autres lésions génétiques comme les

translocations t(15;17)(q24;q21) et t(6;9)(p23;q34). Ces mutations constituent un facteur pronostique important pour les LAM ne présentant pas d'anomalies cytogénétiques. D'autres mutations sont aussi récurrentes dans les LAM sans constituer des entités distinctes dans le WHO 2008, par exemple: *FLT3*, *KIT*, *MLL*-PTD (duplication partielle en tandem de *MLL*), *WT1*, *NRAS* et *KRAS*.¹⁰

Le deuxième groupe de LAM correspond à des LAM avec changements myélodysplasiques. Dans ce cas les LAM (nombre de blastes supérieur à 20%) présentent un des critères suivants :

- ◆ Présence d'un historique de syndrome myélodysplasique (SMD).
- ◆ Présence d'anomalies cytogénétiques des SMD.
- ◆ Présence d'une myélodysplasie multilignée.

Et absence de traitement cytotoxique antérieur pour une autre atteinte ou d'anomalie cytogénétique récurrente, décrite dans le groupe précédent.

Le troisième groupe des LAM sont des LAM secondaires à des traitements, survenant comme une complication d'une chimiothérapie ou d'une radiothérapie antérieure.

Finalement, le quatrième groupe correspond à des LAM n'appartenant pas aux trois groupes précédents. Leur classification se fait selon des critères morphologiques (correspondant aux critères de la classification FAB) et immunophénotypiques afin de déterminer la lignée hématopoïétique majeure impliquée et le stade de maturation. Ainsi on définit des LAM avec différenciation minimale (LAM0 dans la classification FAB), des LAM sans maturation (LAM1 dans la classification FAB), des LAM avec maturation (LAM2 dans la classification FAB), des LA myélomonocytaires (LAM4 dans la classification FAB), des LA monoblastiques et monocytaires (LAM5 dans la classification FAB), des LA érythroïdes (LAM6 dans la classification FAB), des LA

mégacaryoblastiques (LAM7 dans la classification FAB), des LA basophiliques et des leucémies aiguës avec myélofibrose.

1.3.2 Leucémies aiguës lymphoïdes

○ Leucémie aiguë lymphoblastique B (LALB)

Il s'agit d'une néoplasie de précurseurs lymphoïdes, engagés dans la lignée lymphocytaire B. Au sein des LALB, on distingue deux groupes : un groupe de LALB associé à des anomalies génétiques récurrentes et les LALB n'appartenant pas à la catégorie précédente « B lymphoblastic leukemia/ lymphoma not otherwise specified ».

Les anomalies chromosomiques récurrentes dans les LAL-B sont:

- ◆ t(9;22)(q34;q11.2)/ GF: *BCR-ABL1*
- ◆ t(v;11q23)/ réarrangement de *MLL* : principalement la t(4;11)(q21;q23) et la t(11;19)(q23;p13.3)
- ◆ t(12;21)(p13;q22)/ GF: *ETV6-RUNX1*
- ◆ Hyperploïdie
- ◆ Hypoploïdie
- ◆ t(5;14)(q31;q32)/ GF: *IL3-IGH*
- ◆ t(1;19)(q23;p13.3)/ GF: *TCF3-PBX1*

Pour les LAL-B non spécifiées, l'immunophénotypage permet de confirmer l'appartenance des blastes à la lignée lymphocytaire B et de déterminer le degré de différenciation des cellules B (proB, B communes, pré-B), ayant un impact clinique.

La leucémie de Burkitt, dans le WHO 2008, a été traitée comme une phase leucémique du lymphome de Burkitt (syndromes lymphoprolifératifs B), vu la rareté des patients présentant une leucémie avec envahissement exclusif de la moelle et du sang périphérique.

○ Leucémie aiguë lymphoblastique T (LALT)

Pour les LALT, l'immunophénotypage confirme et classe la LAL-T, selon le degré de différenciation et/ou le niveau de blocage de la lignée T (pro-T, pré-T, corticale et médullaire).

Ces leucémies peuvent présenter les anomalies génétiques récurrentes suivantes :

- ◆ Des translocations provoquant la surexpression de gènes codant pour des facteurs de transcription (exemple : *TLX1*, *TLX3*, *MYC*, *TAL1*, *LMO1*, *LMO2*, *LYL1*) qui seront juxtaposés à la région régulatrice de l'un des loci TCR, localisés au niveau du chromosome 14 et du chromosome 7 (TCR alpha et delta localisés sur la bande chromosomique 14q11.2, TCR beta localisé sur 7q35 et TCR gamma au niveau de la bande 7p14-15)
- ◆ Des translocations qui provoquent la formation de gènes de fusion (exemple : fusions *MLL-ENL* associée à la t(11;19)(q23;p13.3), *CALM-AF10/PICALM-MLLT10* associée à la translocation t(10;11)(p13;q14)).
- ◆ Délétion provoquant la perte de gènes suppresseurs de tumeurs (exemple : del(9p)/ perte de *CDNK2A*)
- ◆ Des mutations activatrices de gènes (exemple : activation de *NOTCH1*)

2. Translocations chromosomiques et gènes de fusion dans les leucémies

Les translocations chromosomiques représentent une des atteintes génétiques fréquemment rapportées dans les leucémies. Des mutations, des amplifications, des délétions et des inversions sont aussi décrites.

La première translocation décrite dans un cancer est la $t(9;22)(q34;q11)$ dans la leucémie myéloïde chronique (LMC)^{11,12} par Rowley en 1973. Ceci a été précédé par la description du chromosome Philadelphie, résultant de cette translocation, par Nowell et Hungerford en 1960. La récurrence de cette anomalie et son association à un type spécifique de leucémie démontre son implication dans la genèse du cancer. A la suite de cette découverte, d'autres anomalies chromosomiques récurrentes ont été rapportées, ainsi que leur caractérisation moléculaire déterminant les gènes de fusion impliqués, non seulement dans les leucémies et les lymphomes, mais aussi dans les sarcomes et dans certains carcinomes. L'implication des translocations chromosomiques dans la leucémogénèse est de plus en plus corroborée : plusieurs translocations s'associent spécifiquement à un type de cancer, elles régressent en cas de traitement efficace et ont le potentiel d'induire des néoplasies chez des souris, avec un phénotype souvent semblable à celui observé chez l'humain.¹¹ Par ailleurs, des mutations additionnelles sont requises pour la leucémogénèse associée à certaines protéines de fusion. Les translocations chromosomiques sont parfois associées à des LAM qui ont des caractéristiques morphologiques et immunophénotypiques distinctes (exemples: LAM avec $inv(16)$, LAM avec réarrangement *MLL*). Elles présentent aussi un moyen d'identifier de nouveaux oncogènes et gènes régulateurs jouant un rôle important dans l'hématopoïèse normale et dans la leucémogénèse.

2.1 Mécanismes responsables des translocations chromosomiques

La translocation chromosomique est un échange de matériel génétique entre deux ou plusieurs chromosomes. Des cassures double brins au niveau de chromosomes non homologues suivi par une réparation aberrante d'ADN est suggéré comme un mécanisme potentiel de formation des translocations chromosomiques. Le déroulement et les différentes étapes de cette recombinaison chromosomique sont encore peu connus. Différentes découvertes suggèrent des hypothèses intéressantes sur les mécanismes moléculaires aboutissant à ces translocations. La proximité spatiale des gènes réarrangés est essentielle pour l'occurrence de l'échange chromosomique. L'induction de la proximité des loci des gènes *TMPRSS2* et *ERG* dans des cellules de cancer de prostate a favorisé la fusion de ces deux gènes.¹³ Une proximité des loci de quelques gènes réarrangés d'une façon récurrente dans les syndromes hématologiques malins a été retrouvée, comme les loci de *BCR* et *ABL1* dans des cellules de moelle osseuse CD34+ et les loci de *MYC*, *BCL6* et *IGH* dans des cellules lymphoïdes B.^{14,15} Un processus actif de mobilité des sites de cassures double brins pourrait aussi permettre cette proximité. Différentes investigations des régions de cassures de gènes réarrangés ont permis de proposer plusieurs mécanismes éventuellement impliqués dans la formation des translocations chromosomiques.

Citons d'abord le mécanisme NHEJ (Non Homologous End Joining), mécanisme principal de réparation des cassures doubles brins de l'ADN chez les mammifères. Ce mécanisme a été suggéré suite à la présence au niveau des régions de cassures de petites délétions et duplications ainsi que des micro-homologies caractéristiques de ce mécanisme de réparation. Ces caractéristiques ont été décrites dans plusieurs réarrangements incluant le réarrangement de *MLL* suite à la translocation t(4;11), *BCR/ABL1*, *ETV6/RUNX1* et *PML/RARA*.^{16,17}

Par ailleurs, une recombinaison entre les éléments répétitifs Alu suite au mécanisme de réparation SSA (single strand annealing) est suggéré principalement comme un

mécanisme de recombinaison intrachromosomique aberrant dans le cas du réarrangement *MLL*-PTD, où une recombinaison entre les éléments Alu a été retrouvée dans une série de 7 cas analysés sur neuf.¹⁸

Ensuite, la présence de sites de clivage de la topo-isomérase II (une enzyme qui modifie et contrôle la topologie de l'ADN en générant et reconstituant des bris transitoires) et des sites sensibles à la DNase au niveau des régions de cassure d'une part, et l'existence de leucémies secondaires à des traitements par des inhibiteurs de topo-isoméraseII présentant des réarrangements récurrents, principalement les réarrangements du gène *MLL*, suggère l'implication de ces enzymes dans la genèse de ces translocations chromosomiques.

Finalement, la translocation chromosomique pourrait résulter d'un défaut de recombinaison V(D)J ou d'une erreur de commutation isotypique. Une recombinaison VDJ erronée est typiquement associée à la formation de translocations chromosomiques impliquant la juxtaposition d'un proto-oncogène aux éléments régulateurs des gènes des immunoglobulines (IG) ou des récepteurs T (TCR), retrouvées dans les syndromes lymphoïdes malins B et T. Deux mécanismes de recombinaison VDJ erronée sont proposés suite à l'analyse des régions de cassure. Le premier consiste en une recombinaison erronée de RSS authentiques au niveau des IG/TCR (Recombinaison Signal Sequences, séquences reconnues par les recombinases VDJ) avec des RSS cryptiques (des séquences du génome qui peuvent être ciblées par erreur par les recombinases) localisées près du proto-oncogène au niveau d'un chromosome distinct. Le deuxième mécanisme implique des cassures au niveau du proto-oncogène qui ne sont pas causées par le mécanisme VDJ. Dans ce cas le mécanisme VDJ n'est responsable que des cassures survenant au niveau des gènes IG/TCR.¹⁹ La t(11;14)(p13;q11) associée à une leucémie aigue lymphoïde T et dont dérive la fusion *LMO2-TRD@* est un exemple pour le premier mécanisme et la t(11;14)(q13;q32) associée au lymphome de manteau et dont dérive la fusion *CCND1-IGH* est un exemple du deuxième mécanisme. La t(8;14)(q24;q32) associée au lymphome de Burkitt semble résulter d'erreurs survenant au niveau de la commutation isotypique et de l'hypermutation somatique.¹⁹

2.2 Translocations chromosomiques récurrentes dans les leucémies

La récurrence des translocations chromosomiques est retrouvée dans différents types de syndromes hématologiques. Au moins 267 translocations sont récurrentes dans les LAM, 155 dans les LAL et 227 dans les lymphomes B.¹¹ A titre d'exemple, nous citons les translocations récurrentes suivantes : la t(15;17)(q22;q21), la t(8;21)(q22;q22) et la t(6;11)(q27;q23), générant respectivement les gènes de fusion *PML-RARA*, *RUNX1-RUNX1T1*, *MLL-MLLT4* dans les LAM, la t(12;21)(p12;q22), la t(1;19)(q23;p13) et la t(4;11)(q21;q23), générant respectivement les gènes de fusion *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1* et *MLL-AFF1* dans les LAL-B.

2.3 Conséquences moléculaires des translocations chromosomiques

Les translocations chromosomiques observées au niveau du caryotype correspondent à des réarrangements géniques au niveau des points de cassures à l'échelle moléculaire. Les conséquences sont soit la dérégulation de l'expression d'un gène (le cadre de lecture d'un gène se juxtapose aux éléments régulateurs de la transcription d'un autre gène), soit la formation de deux gènes de fusion, produisant le plus souvent une protéine chimérique impliquée dans la leucémogénèse par dérégulation transcriptionnelle de l'hématopoïèse.²⁰ (voir figure 2)

2.3.1 Dérégulation d'expression de gènes normaux

Le meilleur exemple correspondant à ce mécanisme, où la translocation provoque un échange d'éléments régulateurs sans affection des séquences codantes du gène ciblé, est le lymphome de Burkitt ou la leucémie associée aux translocations t(8;14)(q24;q32), t(2;8)(p11;q24) et t(8;22)(q24;q11). Dans ces translocations, le gène *MYC*, au niveau de la bande chromosomique 8q24, devient constitutivement exprimé suite à sa juxtaposition

aux éléments régulateurs du gène codant pour la chaîne lourde des immunoglobulines (*IGH*) localisés sur la bande 14q32, ou des chaînes légères kappa (*IGK*, bande 2p12) ou lambda (*IGL*, bande 22q11.2).¹¹

De même dans les lymphomes T et les LAL-T, différentes translocations sont à l'origine d'une surexpression de différents gènes partenaires juxtaposés aux éléments régulateurs du TCR.

Ce mécanisme est souvent associé aux lymphomes, aux leucémies aiguës lymphoïdes d'origine B et T et aux myélomes. Récemment, ce mécanisme de dérégulation d'expression a été aussi retrouvé dans le cancer de la prostate où le réarrangement chromosomique provoque la surexpression du facteur de transcription *ERG* par sa juxtaposition aux séquences régulatrices androgéniques du promoteur du gène *TMPRSS2*.²⁰

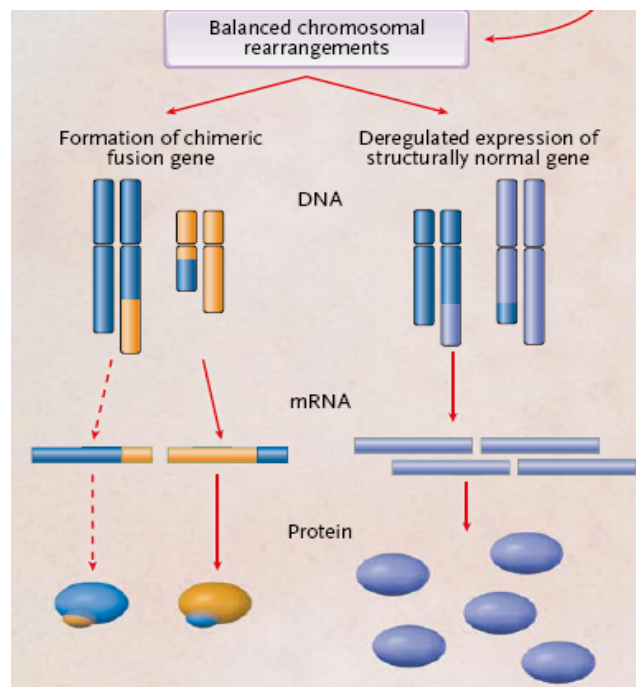


Figure 2: Conséquences d'une translocation chromosomique réciproque. Tiré de N Engl J Med 2008; 359 : 722-734. La figure montre à gauche la formation d'une protéine chimérique et à droite la dérégulation d'expression d'un gène normal. Abréviation : mRNA, ARN messager.

2.3.2 Création d'un gène de fusion chimérique

La majorité des translocations chromosomiques engendrent des gènes chimériques par fusion de deux gènes impliqués au niveau des points de cassure. Deux familles de gènes sont principalement impliquées dans ces fusions : Les tyrosines kinases et les facteurs de transcription.

- Gènes codant pour des récepteurs tyrosines kinases

L'exemple classique impliquant une tyrosine kinase est la t(9;22)(q34;q11), à l'origine de la fusion de la partie 5' du gène *BCR* (Breakpoint Cluster Region), localisé sur la bande 22q11, avec la partie 3' du gène *ABL1* localisé sur la bande 9q34. Le gène de fusion codant pour la protéine de fusion BCR-ABL1, une forme active de la kinase ABL1, induit une activation de multiples voies de signalisation intracellulaire, entraînant une prolifération cellulaire non contrôlée et une résistance à l'apoptose.²¹

Plusieurs autres réarrangements génétiques sont à l'origine d'activation constitutionnelle de tyrosine kinase, comme la t(2;5)(p23;q35), engendrant le gène de fusion *NPM1-ALK*, associé au lymphome anaplasique à grandes cellules, ou la t(5;12)(q33;p13), engendrant le gène de fusion *ETV6-PDGFRB*, associé au syndrome myéloprolifératif/myélodysplasique avec éosinophilie. La détection de l'implication d'une tyrosine kinase (TK) dans la dérégulation des cellules cancéreuses a gagné beaucoup d'intérêt avec la découverte d'une molécule inhibitrice sélective de tyrosine kinase, l'imatinib, premier traitement spécifique utilisé dans la LMC.

- Gènes codant pour des facteurs de transcription :

Les réarrangements chromosomiques engendrant des protéines de fusion impliquant des facteurs de transcription peuvent affecter l'activité du facteur de transcription provoquant sa répression ou au contraire son activation transcriptionnelle. Par exemple, les protéines chimériques PML-RARA et RUNX1-RUNX1T1 entraînent une répression du facteur de transcription, et ainsi une répression de ses gènes cibles,

requis pour une différenciation myéloïde normale. Il est proposé pour RUNX1-RUNX1T1, que la perte du domaine d'activation transcriptionnelle de RUNX1 (TD), et l'interaction de RUNX1T1 avec les co-répresseurs NCOR1, SIN3A et les HDAC (histones desacétylases) est responsable de la répression des gènes cibles de RUNX1. L'oligomérisation de RUNX1-RUNX1T1, à travers le domaine NHR2 de RUNX1T1, peut aussi être responsable de la dérégulation transcriptionnelle induite par RUNX1-RUNX1T1.²² La protéine de fusion PML-RARA est responsable d'une liaison de RAR α aux HDAC, avec une affinité supérieure à celle de RAR α sauvage. Ainsi, l'activation transcriptionnelle des gènes cibles de RAR α n'est pas déclenchée par des doses physiologiques d'acide rétinoïque.²³

D'autre part, une activation transcriptionnelle est un mécanisme décrit dans les protéines de fusion impliquant MLL, qui conservent le domaine de liaison à l'ADN (AT hook de MLL) et acquièrent une capacité d'activation transcriptionnelle par des domaines activateurs de la protéine partenaire de fusion.²⁴

3. Le gène *MLL* (Mixed Lineage Leukemia)

La bande chromosomique 11q23 est fréquemment impliquée dans les translocations chromosomiques associées aux cancers hématologiques. L'analyse cytogénétique de plusieurs translocations impliquant cette bande, comme la t(4;11)(q21;q23) dans les LAL, les t(9;11)(p22;q23) et t(6;11)(q27;q23) dans les LAM, a été suivie par l'identification de l'implication d'un même gène, appelé *MLL* (Mixed-Lineage Leukemia).¹² Le gène *MLL*, antérieurement appelé *HTRX* (human trithorax), est l'homologue humain du gène trithorax de la *Drosophile Melanogaster*.²⁵ Les gènes trithorax, ainsi que la famille des gènes Polycomb, jouent un rôle important dans la régulation de l'expression génétique par modification de la structure de la chromatine. Cette modification de la chromatine est souvent le résultat d'addition ou de soustraction de groupements (acétyl, méthyl), par des enzymes (acétyltransférase, méthyltransférase) sur différentes histones ayant des impacts d'activation ou de répression, dépendamment

de l'activité enzymatique et de l'acide aminé de l'histone ciblé. MLL, par son domaine, SET (Su(var)3-9, Enhancer of-zeste Trithorax), un domaine hautement conservé, possède une activité histone méthyltransférase (HMT), au niveau de la lysine4 de l'histone3, une marque associée à une chromatine active transcriptionnellement, notamment une activation des gènes *Hox*.²⁶

MLL est une cible fréquente de translocations chromosomiques retrouvées dans différents types de cancers hématologiques, incluant LAM, LAL-B et T, leucémies biphénotypiques, syndromes myélodysplasiques (SMD), leucémies reliées à des traitements antérieurs, principalement avec des inhibiteurs de topoisomérase II, mais aussi suite à des agents alkylants et/ou à la radiothérapie.

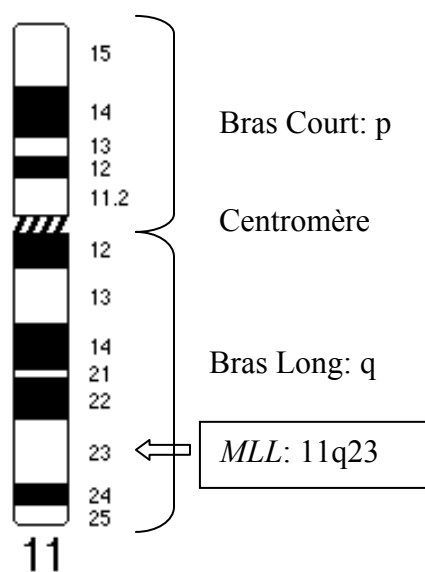


Figure 3: Schématisation du chromosome 11 avec localisation du gène *MLL*.

3.1 Les cancers hématologiques impliquant *MLL*

MLL est l'un des gènes les plus fréquemment réarrangés dans les cancers hématologiques. Les réarrangements du gène *MLL* sont détectés dans approximativement 5 à 10% des LAM et 8 à 10% des LAL-B.²⁷ Le gène *MLL* est principalement réarrangé dans les leucémies des jeunes enfants (LAM et LAL) à un taux supérieur à 70%, et beaucoup moins fréquemment chez les grands enfants et les adultes (environ 10% des LAM). Il est aussi réarrangé dans environ 9% des leucémies secondaires aux traitements, principalement suite à un traitement antérieur avec des inhibiteurs de la topoisomérase II.²⁸ Ces leucémies post-traitement peuvent être des t-LAM, t-LAL ou t-SMD.

Le pronostic des LAM et LAL avec réarrangement *MLL* a été étudié dans des cohortes d'enfants et d'adultes, par différents groupes. Des études récentes ont établi le pronostic selon les différents gènes partenaires de *MLL*.

Les LAM adultes avec réarrangements du gène *MLL* ont un pronostic défavorable selon l'étude du SWOG/ECOG (Southwest Oncology Group/ Eastern Cooperative Oncology Group).²⁹ Ce même résultat est rapporté par l'étude du groupe CALGB (Cancer And Leukemia Group B), qui classe aussi ces LAM dans le groupe de leucémies avec un mauvais pronostic, en dissociant le pronostic de la t(9;11)(p22;q23), associée à un pronostic intermédiaire.³⁰ Krauter et al rapporte aussi l'association de *AF9/MLLT3* à un meilleur pronostic versus un pronostic défavorable du partenaire *AF6/MLLT4*.³¹

Une étude antérieure du MRC (Medical Research Council) avait classifié les réarrangements de *MLL* comme anomalies cytogénétiques ayant un impact pronostique intermédiaire.³²

La divergence de résultats provient possiblement de l'hétérogénéité du groupe de LAM avec anomalies 11q23 (différentes translocations impliquant différentes protéines de fusion).

Pour les LAM pédiatriques, l'anomalie 11q23 est rapportée comme un indicateur de mauvais pronostic, selon le POG (Pediatric Oncology Group).³³ Une étude rétrospective,

collectant l'évolution de 756 enfants atteints de LAM avec réarrangement de *MLL*, a permis d'identifier des sous-groupes de différents pronostics, dépendamment du gène partenaire de fusion de *MLL*. Cette étude a montré le bon pronostic de la t(1;11)(q21;q23) indépendamment des autres facteurs de risque, alors que la t(6;11)(q27;q23), la t(10;11)(p12;q23) et la t(10;11)(p11.2;q23) s'associent à un mauvais pronostic.³⁴

Les LAL-B adultes avec réarrangement *MLL* s'associent à un mauvais pronostic. Le groupe SWOG (Southwest Oncology Group 9400 study) classe les LAL-B avec réarrangement de *MLL* dans le groupe de LAL-B à haut risque, avec un niveau de risque plus élevé pour la t(4;11)(q21;q23) par rapport aux autres translocations impliquant *MLL*.³⁵ Le mauvais pronostic de la t(4;11)(q21;q23) associé à une survie globale inférieure aux autres leucémies avec chromosome Philadelphie négatif, est aussi rapporté dans l'étude du MRC/ECOG.³⁶ De même pour les LAL-B des jeunes enfants, la t(4;11) retrouvée dans 30-50% des cas présentant un réarrangement de *MLL* est associée à un mauvais pronostic et une mauvaise réponse au traitement. Le pronostic des autres translocations pourrait être moins défavorable. L'âge du jeune enfant, même pour la première année, est un important facteur pronostique; plus le patient est jeune, plus le pronostic est mauvais.³⁷

Malgré la rareté des LAL-T présentant un réarrangement de *MLL*, il semble que ces leucémies ont plutôt un bon pronostic.²⁷

Mieux connaître le pronostic spécifique à chaque translocation impliquant *MLL* permettra de mieux stratifier le risque de ces leucémies et ainsi orienter adéquatement le traitement.

3.2 Rôle de *Mll* dans le développement embryonnaire et l'expression des gènes *Hox*

La génération de modèles expérimentaux de souris hétérozygotes (*Mll*^{+/-}) et déficientes pour *Mll* (*Mll*^{-/-}) a permis l'exploration du rôle de *Mll* dans le développement squelettique normal et dans l'expression des gènes *Hox*. Les souris

hétérozygotes (*Mll*^{+/-}) ont montré des anomalies positionnelles squelettiques bidirectionnelles (niveau postérieur et antérieur), caractéristiques d'une mutation des gènes trithorax. Chez les souris « knockout » (*Mll*^{-/-}), l'expression des gènes *Hox* est initiée mais non maintenue, démontrant le rôle de *Mll* dans l'expression appropriée de ces gènes.^{28,38} Les souris hétérozygotes présentent un défaut du nombre des cellules sanguines, comme une anémie, une thrombopénie et une lymphopénie B. *Mll* joue un rôle aussi bien dans l'hématopoïèse embryonnaire, principalement au niveau de la spécification ou l'expansion des CSH, que dans l'hématopoïèse définitive chez les souris adultes, où une diminution de cellules myéloïdes et lymphoïdes a été associée à l'inhibition de *Mll*.³⁹

3.3 Description de MLL

MLL possède 36 exons, codant pour une protéine nucléaire de 430 KDa. La protéine *MLL* possède différents domaines d'interaction permettant la formation d'un complexe protéique jouant un rôle dans la régulation de la transcription. Les domaines de *MLL* s'associent à un potentiel de liaison à l'ADN et de répression transcriptionnelle au niveau N-terminal et à une activation transcriptionnelle au niveau C-terminal. Ainsi, au niveau N-terminal, *MLL* possède le domaine AT hook, qui lie la protéine aux séquences du petit sillon de l'ADN riche en AT, suivi par les sites SNL1,2 (speckled nuclear localization), puis par le domaine TRD (transcriptional repression domain), constitué de deux sous-domaines : RD1 et RD2. RD1 contient des homologies avec le domaine DNMT1 (DNA methyl transferase), incluant des motifs en doigts de zinc CxxC, pouvant recruter des protéines polycomb (répresseurs transcriptionnels), tel que HPC2 et BMI1. RD2 recrute les répresseurs transcriptionnels HDAC (histone desacetylases). A la suite de ces deux domaines, *MLL* possède le domaine PHD (Plant Homology Domain) ayant des motifs en doigts de zinc, impliqué dans des interactions protéine-protéine, comme l'interaction *MLL*-CYP33. Au niveau C-terminal, *MLL* possède un domaine d'activation transcriptionnelle (TA) qui se lie à une acétyltransférase, CBP (CREB-

binding protein), une activatrice transcriptionnelle. Le domaine SET (Su(var)3-9 enhancer-of-Zeste, trithorax), homologue au gène trithorax de la *Drosophila melanogaster*, une histone méthyltransférase au niveau de la lysine 4 de l'histone 3 (H3K4), est aussi associé à une activation transcriptionnelle.^{25,28} (voir figure 4)

Cet équilibre entre activation et répression transcriptionnelle est compromis suite aux anomalies chromosomiques affectant *MLL*.



Figure 4: Représentation schématique de la protéine MLL. Adapté de Nat Rev Cancer 2007; 7: 823-833. Abréviations : ATH1-3, AT hook; SNL1,2, speckled nuclear localization 1,2; TRD, transcriptional repression domain; RD1, repression domain 1: contient des homologies avec le domaine DNMT1 (DNA methyl transferase), incluant des motifs en doigts de zinc CxxC; RD2, repression domain 2; PHD, Plant Homology Domain; TA, transcriptional activation; SET(Su(var)3-9 enhancer-of-Zeste, trithorax); trx, trithorax.

3.4 Les anomalies chromosomiques impliquant *MLL*

3.4.1 Translocations chromosomiques

Les réarrangements de *MLL* dans les leucémies surviennent suite à différentes anomalies génétiques, soit les translocations chromosomiques, la duplication en tandem (exons 5 à 12) et plus rarement l'amplification de *MLL*.

La translocation chromosomique représente le mécanisme le plus fréquent affectant *MLL* dans différents types de leucémies.

Suite à une translocation chromosomique, la partie 5' du gène *MLL* est fusionnée aux séquences du GPF (gène partenaire de fusion). Les différents points de cassures rapportés au niveau du gène *MLL*, se situent dans la région entre les exons 8 et 13, contenant des sites de clivage topoisomérase II et des régions d'attachements à la matrice nucléaire pouvant contribuer à la genèse de la translocation.²⁸

Ainsi, suite à une translocation chromosomique, *MLL* garde les 8 à 13 premiers exons, dépendamment du point de cassure, et fusionne à un nombre variable d'exons du gène partenaire de fusion (voir figure 5). Ceci résulte en une délétion des domaines PHD, TA et SET de la protéine *MLL*. Un point de cassure plus proximal ou distal n'est pas compatible avec un potentiel de transformation. Il a été démontré que la perte du domaine PHD est essentielle pour la leucémogénèse de la protéine de fusion *MLL*. De plus, l'inclusion de ce domaine au niveau des protéines de fusion *MLL-AF9* et *MLL-ENL* abolit leur capacité d'immortaliser les progéniteurs hématopoïétiques.^{40,41}

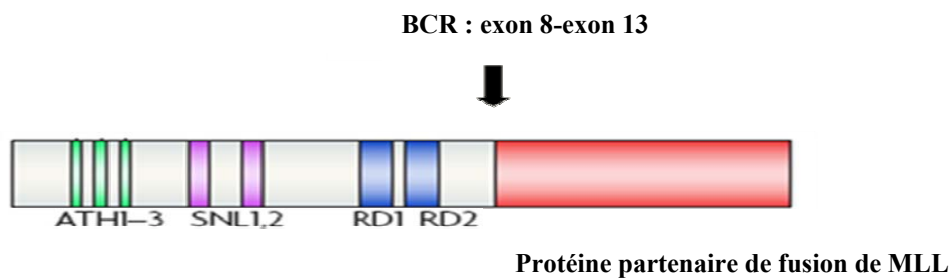


Figure 5 : Protéine de fusion *MLL*. Adapté de Nat Rev Cancer 2007; 7: 823-833. La figure montre la fusion de la partie N-terminale de *MLL* aux séquences de la protéine partenaire de fusion (en rouge). Abbreviations: ATH1-3, AT hook; SNL1,2, speckled nuclear localization 1,2; RD1, repression domain1; RD2, repression domain2; BCR, breakpoint cluster region.

3.4.2 Duplication en tandem de *MLL* (*MLL-PTD*)

Environ 10% des LAM présentant un caryotype normal possèdent une duplication en tandem de *MLL*, avec duplication des exons situés entre l'exon 5 et 12. Ceci entraîne une duplication des domaines AT hook, des sites SNL et des régions d'homologies de DNMT de *MLL*. Cette duplication pourrait donner à *MLL* son potentiel d'immortalisation suite à une augmentation de l'affinité de *MLL* pour ses gènes cibles ou suite à une dérégulation de l'expression de *MLL*.⁴² *MLL-PTD* a été associée à un pronostic défavorable (estimé par la survie globale et la survie sans rechute), comparativement à d'autres mutations récurrentes dans les LAM à caryotype normal,

comme les mutations des gènes *CEBPA* et *NPM1* (avec absence de mutation de *FLT3-ITD*).⁴³ D'autres études (Balducci et al, 2007) rapportent l'impact défavorable de cette mutation sur la durée de rémission complète (et non sur la survie globale), significativement inférieure à la durée de rémission des patients n'ayant pas de mutation de *MLL*.⁴⁴

L'impact pronostique de la mutation *MLL*-PTD a été retrouvé moins défavorable dans l'étude de Whitman et al.⁴⁵ Cette étude inclut 238 patients présentant des leucémies cytogénétiquement normales dont 10% présentent la mutation *MLL*-PTD montrant un taux de rémission complète, une survie globale ainsi qu'une survie sans événements similaires aux patients n'ayant pas la mutation *MLL*-PTD. Cette étude montre une rémission des patients présentant la mutation *MLL*-PTD plus longue que celle rapportée antérieurement dans la littérature.⁴⁵ Un traitement de consolidation intensif pourrait être un facteur contribuant au meilleur pronostic de la mutation *MLL*-PTD retrouvé dans cette étude. L'impact pronostique défavorable de cette mutation pourrait aussi dépendre de son association ou non à d'autres marqueurs pronostiques négatifs.

3.4.3 Amplification de *MLL*

L'amplification de *MLL* est décrite dans les syndromes myélodysplasiques et dans les LAM, dans un cadre de caryotype complexe. Cette amplification se présente sous forme de HSR (homogeneous staining region) ou de chromosomes doubles minutes, ou d'un gain de quelques copies retrouvées au niveau d'un chromosome dérivé 11 ou d'un autre chromosome.^{46,47} Cette anomalie est associée à un mauvais pronostic.⁴⁸

3.5 Les partenaires de fusion de *MLL*

Les translocations impliquant le gène *MLL* sont caractérisées par la multitude des gènes partenaires de fusion. Plus de 50 gènes partenaires de fusion (GPF) ont été rapportés suite à différentes translocations. La fonction de plusieurs de ces gènes est peu étudiée et relativement peu de fusions *MLL* ont été bien caractérisées sur le plan moléculaire.

Les partenaires de fusion peuvent être classés en quatre familles de protéines, principalement les protéines nucléaires (>80%), la famille des protéines cytoplasmiques (>10%) et beaucoup plus rarement la famille des septines (>1%) et la famille des histones acétyltransférases (>1%).²⁸

Les partenaires de fusion les plus récurrents de *MLL* sont des gènes codant pour des protéines nucléaires : *MLLT2/AF4* (4q21), *MLLT3/AF9* (9p22), *MLLT1/ENL* (19p13.3), *MLLT10/AF10* (10p12) et *ELL* (19p13.1), ainsi que pour une protéine cytoplasmique *MLLT4/AF6* (6q27). Ces partenaires représentent environ 85% des réarrangements de *MLL*.

Certaines translocations s'associent plutôt avec des LAL, comme la translocation t(4;11)(q22;q23) associée à l'expression de *MLL-AFF1*. D'autres sont plus fréquentes dans les LAM, comme la t(9;11)(p22;q23), la t(11;19)(q23;p13.1) et la t(6;11)(q27;q23), associées respectivement à l'expression de *MLL-MLLT3*, *MLL-ELL* et *MLL-MLLT4*.

L'expression de différentes protéines de fusion de *Mll* (*Mll-Af9*, *Mll-Enl* et *Mll-CBP*) chez des souris a généré des leucémies avec des temps de latence variables et des phénotypes similaires à celles associées à la même fusion chez les humains.^{28,49}

L'expression de *Mll-AF4* chez des souris provoque une hyperplasie mixte lymphoïde et myéloïde et un lymphome B, plutôt qu'une LAL.⁵⁰

3.6 Mécanismes de leucémogénèse des fusions MLL

Malgré la grande hétérogénéité des partenaires de fusion de *MLL*, certains points les unifient dans l'exploration du mécanisme de leucémogénèse des protéines chimériques. Les partenaires protéiques nucléaires, représentant les partenaires les plus fréquents de *MLL*, font partie d'un réseau de protéines nucléaires impliqué dans la régulation transcriptionnelle, par modulation de la chromatine; ENL(*MLLT1*), ou son homologue AF9 (*MLLT3*), interagissent avec les protéines AF4 (*AFF1*) et AF10 (*MLLT10*) tronquées.⁵¹ Le partenaire de fusion est essentiel au potentiel de transformation de la fusion *MLL*. En effet, la partie N-terminale de *MLL* tronquée est dépourvue de tout potentiel oncogénique.^{49,52} Finalement, un thème commun à toutes les protéines de fusion de *MLL* est l'activation transcriptionnelle des gènes *HOX*, incluant *HOXA7*, *HOXA9* et *MEIS1*, un cofacteur des gènes *HOX*, qui semble être l'activation la plus cruciale pour la leucémogénèse des fusions *MLL*.

La dérégulation des gènes *HOX* représente un mécanisme potentiellement responsable de la leucémogénèse des protéines chimériques *MLL*. L'analyse de l'expression génétique dans les LAL-B et T présentant différentes protéines de fusion *MLL* a démontré une surexpression des gènes *HOX* : *HOXA9*, *HOXA10*, *HOXC6* et de *MEIS1* (un cofacteur des gènes *HOX*).⁵³ Les modèles de souris ont démontré l'implication de *Mll* dans la régulation de l'expression de ces gènes. Les gènes *Hox*, notamment *Hoxa7*, *Hoxa9* et le gène *Meis1* sont préférentiellement exprimés dans la CSH Kit+Sca+Lin-, et leur expression diminue durant la différenciation hématopoïétique. Cette régulation d'expression est perturbée lors des réarrangements de *MLL*. L'expression aberrante de *Hoxa9*, en collaboration avec *Meis1* induit une leucémie dans des précurseurs hématopoïétiques murins.⁵⁴ L'inhibition d'expression de *HOXA9*, dans des lignées humaines de LAM et LAL est associée avec un arrêt de prolifération spécifiquement dans les leucémies avec réarrangement de *MLL*.⁵⁵ Finalement, il a été

démontré que certaines protéines de fusion MLL (MLL-MLLT1, MLL-FKBP ; FKBP forme un dimère de MLL, simulant l'effet d'un partenaire de fusion cytoplasmique) se lie à *Hoxa9*, apportant différentes modifications d'histones et activant sa transcription.^{42,56,57}

Dans les protéines de fusion MLL, il y a toujours une perte du domaine SET activateur transcriptionnel et du domaine PHD associé à une répression transcriptionnelle. L'activation transcriptionnelle associée à la protéine de fusion est attribuée à la portion C-terminale du partenaire de fusion. Les partenaires de fusion de type protéines nucléaires possèdent des domaines activateurs transcriptionnels, apportés à la protéine chimérique. Les partenaires de fusion de type protéines cytoplasmiques possèdent des domaines de dimérisation par hélices hydrophobes « coiled coil » induisant une dimérisation/oligomérisation de MLL.

a. Partenaires de fusion MLL nucléaires :

Les partenaires nucléaires les plus communément impliqués dans les fusions MLL possèdent un domaine d'activation transcriptionnelle ou ils s'associent à des enzymes modifiant les histones, résultant en une activation transcriptionnelle.

Les protéines MLLT1/ENL et MLLT3/AF9 sont homologues et, tel que discuté ci-haut, font partie d'un même réseau protéique avec d'autres partenaires de fusion (AFF1 et MLLT10). Par ailleurs MLLT1 se lie à DOT1L, une histone méthyltransférase au niveau de la lysine 79 de l'histone 3 (H3K79), associée à l'élongation transcriptionnelle.^{51,58} L'interaction de MLLT1 avec DOT1L est essentielle pour le potentiel oncogénique de MLL-MLLT1⁵⁹. De même, DOT1L et la méthylation de H3K79 au niveau du promoteur de *HOXA9* jouent un rôle clé dans la leucémogénèse de MLL-AFF1 dans les LAL-B.⁶⁰ ELL, un des partenaires de fusion de MLL suite à la t(11;19) est un facteur d'élongation permettant l'activation de l'ARN polymérase II le long de l'ADN.⁶¹

b. Partenaires de fusion de MLL cytoplasmiques :

Les partenaires cytoplasmiques sont des partenaires moins communs que les partenaires nucléaires, mais ils sont récurrents et représentés par plusieurs protéines cytoplasmiques, tel que GAS7, MLLT4/AF6, SH3GL1/EEN, MLLT6/AF17 et la famille des septines (SEPT2, SEPT5, SEPT6, SEPT9). Le potentiel activateur de ces protéines, dépourvues de tout domaine activateur transcriptionnel, est attribué à leurs domaines de dimérisation par hélices hydrophobes « coiled coil » induisant une dimérisation/oligomérisation de MLL. Il a été démontré que les domaines de dimérisation sont requis pour le potentiel oncogénique de la protéine chimérique.⁶² Par ailleurs, la dimérisation de la partie N-terminale de MLL est capable d'induire des propriétés d'autorenouvellement dans des progéniteurs hématopoïétiques.⁶³

L'activation des gènes *HOX* demeure un mécanisme potentiel de transformation par ces protéines oncogéniques. L'expression induite de différentes protéines de fusion (MLL-GAS7, MLL-EPS15 ainsi que MLL-FKBP) dans des lignées cellulaires de souris a été associée à l'activation de plusieurs gènes *Hox*, notamment *Hoxa7*, *Hoxa9* et de *Meis1*.^{62,63} Une étude *in vitro* (Milne et al) a démontré, par technique d'immunoprécipitation chromatinienne, la liaison de MLL-FKBP à *Hoxa9*, induisant son activation en apportant des modifications d'histones, d'une façon similaire à une protéine de fusion impliquant des partenaires nucléaires (MLL-MLLT1).⁵⁷

3.7 Mécanisme de leucémogénèse de *MLL-PTD*

L'activation des gènes *HOX* est aussi un mécanisme proposé pour cette anomalie de *MLL*. Une étude *in vivo* a rapporté la surexpression de certains gènes *Hoxa* (*Hoxa7*, *Hoxa9*, *Hoxa10*), suite à la génération de souris exprimant *Mll-PTD*.⁶⁴ Ce mécanisme demeure controversé. En effet, une étude de profil d'expression génétique d'échantillons de LAM pédiatriques démontre un profil d'expression des leucémies avec mutation

MLL-PTD différent de celui des leucémies avec protéines chimériques *MLL*, suggérant des mécanismes de leucémogénèse sous-jacents différents.⁶⁵

4. Objectifs spécifiques du Projet de maîtrise:

Objectif 1) Déterminer les gènes partenaires de fusion de *MLL* dans 39 échantillons de leucémies humaines, collectés par la BCLQ (Banque de cellules leucémiques du Québec (<http://www.bclq.gouv.qc.ca/>) avec un consentement éclairé des patients.

Les cas où plusieurs gènes partenaires de *MLL* peuvent être impliqués dans la même translocation seront étudiés prioritairement. Par exemple, suite à la t(11;19)(q23;p13), au moins cinq gènes localisés à la bande chromosomique 19p13 peuvent être réarrangés.

Ceci sera étudié par technique FISH (hybridation in situ en fluorescence) en utilisant des Bacterial Artificial Chromosomes (BACs), par RT-PCR et séquençage. La technique de caryotypage spectral ou SKY, donnant à chaque chromosome une couleur différente, sera utilisée pour identifier les chromosomes impliqués dans les translocations complexes.

Objectif 2) Séquençer les fusions *MLL* plus rarement décrites dans la littérature, afin de déterminer les domaines protéiques potentiellement impliqués dans ces réarrangements.

Objectif 3) Établir une corrélation entre les différents types de fusion *MLL* et les caractéristiques biologiques et cliniques de la leucémie associée.

Chapitre II

-Matériel et méthodes-

1. Approche expérimentale :

L'approche expérimentale est résumée sous forme de schéma dans la figure 6.

Après décongélation des spécimens cryopréservés à la Banque de cellules leucémiques du Québec (BCLQ) et l'obtention des chromosomes, nous avons identifié le partenaire de fusion de *MLL* par la technique FISH sur métaphases en utilisant des BACs dont le choix est orienté en analysant les bandes chromosomiques impliquées dans la translocation.

En cas de translocation complexe, une technique de peinture chromosomique (caryotypage spectral ou SKY) permet l'identification des chromosomes impliqués afin d'identifier le partenaire de fusion de *MLL*.

Pour une fusion *MLL* rarement décrite, la confirmation du partenaire de fusion et la détermination du point de cassure ont été accomplis par amplification des transcrits (RT-PCR) et séquençage.

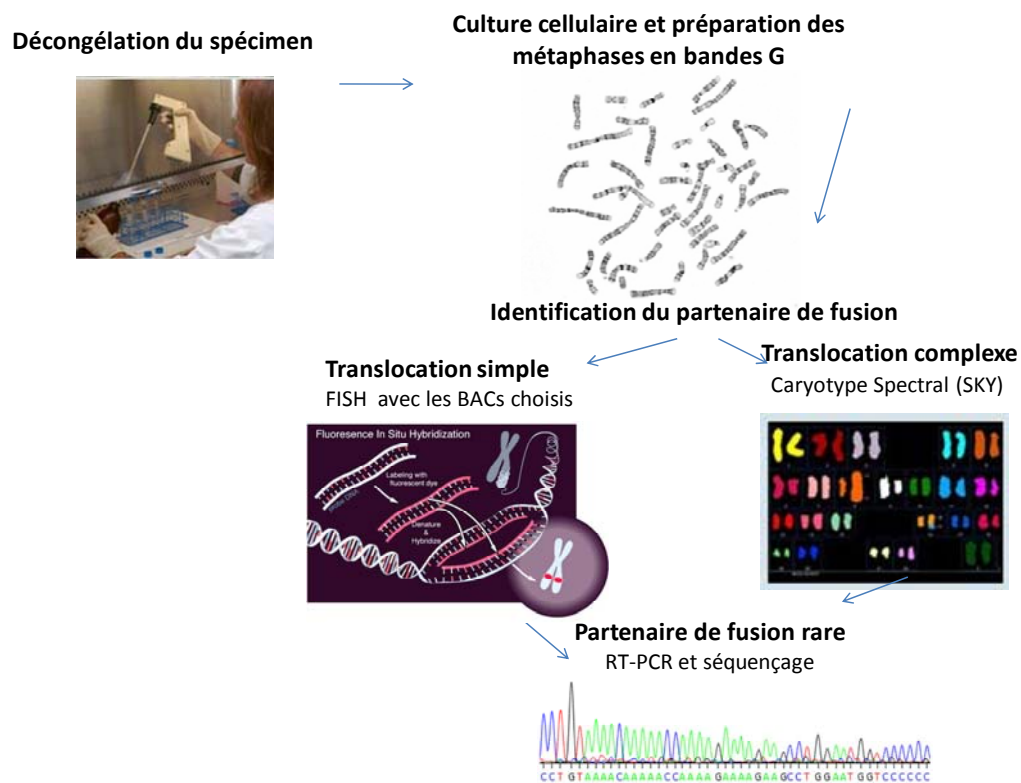


Figure 6: Approche expérimentale du projet de maîtrise.

2. Lignées cellulaires et Spécimens étudiés

Avant de procéder à l'identification des partenaires de fusion dans les spécimens humains de moelle osseuse et/ou sang, la mise au point des techniques de cytogénétique conventionnelle et moléculaire a été effectuée sur les lignées cellulaires MONO-MAC-1 et KOPN8.

-La lignée MONO-MAC-1 est une lignée de leucémie aiguë monoblastique (LAM-M5 dans la classification FAB) avec la formule chromosomique suivante (selon le fournisseur de la lignée: DSMZ, www.dsmz.de) :

49(43~52)<2n>XY, invdup(3)(q21q27),+8,+der(8)add(8)(q24), t(9;11)(p22;q23), t(10;12;17)(q24;q13;q11),+12,r(12)(?),+13,del(13)(q1?2q21),t(16;21)(q13;q22.2),+18,-20 présentant un réarrangement de *MLL* suite à la t(9;11)(p22;q23).

-La lignée KOPN-8 est une lignée de leucémie aiguë lymphoblastique B ayant la formule chromosomique suivante (selon le fournisseur de la lignée: DSMZ, www.dsmz.de) :

45(42~45)<2n>XX, t(8;13)(q24;q21.2),t(11;19)(q23;p13),der(13)t(13;14)(p11;q11),-14. Elle présente un réarrangement de *MLL* suite à la t(11;19)(q23;p13).

Les caractéristiques des spécimens humains sélectionnés suite à l'identification d'un réarrangement de *MLL* sont résumées dans le tableau I. Le réarrangement de *MLL* a été confirmé par FISH avec analyse de 200 cellules interphasiques par deux observateurs, en utilisant la sonde LSI *MLL* dual color, Break Apart Rearrangement (Abbott Molecular, sonde n°32-199983). L'âge du patient, le type de leucémie associé, ainsi que la formule chromosomique correspondante sont notés. Nous rapportons le type morphologique selon la classification FAB pour les LAM de novo, et selon le type immunophénotypique pour les LAL. Selon la classification WHO, ces leucémies font partie des leucémies avec anomalies génétiques récurrentes (réarrangement de *MLL*).

Tableau I : Les spécimens de leucémies avec un réarrangement de *MLL*(Série BCLQ).

Patient	Age	Type de leucémie	Caryotype
02-H017	50 ans	LAM0	46,XX,t(11;19)(q23;p13.3)[14]/46,XX,t(11;19)(q23;p13.3),add(11)(p15)[7]
05-H170	64 ans	L. bilignée	Métaphase Hyperploïde de qualité sous optimale avec t(11;19)(q23;p13)
07-H003	24 ans	t-LAM (LAM4)	46,XX,t(11;19)(q23;p13.3)[20]
04-H121	33 ans	t-LAM (LAM5a)	46,XX,t(11;19)(q23;p13.1)[20]
07-H045	32 ans	LAM5a	48,XX,+8,t(11;19)(q23;p13),+der(19)t(11;19)(q23;p13)[23]
07-H073	36 ans	t-LAM (LAM4)	46,XY,t(11;19)(q23;p13)[21]
09H018	56ans	LAM0	46,XY,add(1)(q32),del(1)(p13),add(11)(q25),t(11;19)(q23;p13.3),add(12)(p13),add(15)(q24),add(17)(q25)[19]/46,XY[1]
06H057	20 ans	LMMC-2	46,XX,t(11;14;19)(q23;q32;p13.1)[22]
08H085	49ans	t-LAM (L.biphén)	46,XX,t(11;19)(q23;p13)[6]
08H139	70ans	LAM5a	45,XY,-7,t(11;19)(q23;p13.3)[20]
06-H152	71 ans	LAM post SMP	46,XY,t(11;17)(q23;p13)[21]
04-H041	66 ans	LAM5b	46,XY,t(11;17)(q23;q25)[18]/46,XY[2]
03H067	47 ans	LAM5a	46,XY,t(11;17)(q23;q25)[19]/46,XY[1]
02H032	75ans	LAM5a	46,XX,t(11;17)(q23;q21)[22]
01-H001	55ans	t.LAM (LAM5a)	46,XX,t(6;11)(q27;q23)[20]
05-H066	27ans	LAM4	46,XX,t(6;11)(q27;q23)[20]
06H088	29 ans	LAM1	46,XY,t(6;11)(q27;q23)[20]
08H129	22ans	LAM1	46,XX,t(6;11)(q27;q23)[20]
06H117	58ans	LAM4	46,XY,t(6;11)(q27;q23)[25]
04H080	25ans	LAM5a	46,XY,t(9;11)(p22;q23)[14]/46,XY[8]
07H041	62ans	LAM5a	46,XY,t(9;11)(p22;q23)[20]
09H010	20ans	LAM5a	46,XY,t(9;11)(p22;q23)[23]
08H021	61ans	LAM5a	46,XY,t(9;11)(p22;q23)[20]
05H025	24ans	LAM5a	44,XX,der(8)t(8;12)(p23;q12),t(9;11)(p22;q23),-12,der(13;17)(q10;q10),i(15)(q10)[20]
08H075	50ans	t-LAM	46,XX,t(9;11)(p22;q23)[21]
08H074	26ans	LAM5a	46,XX,t(9;11)(p22;q23)[18]/46,XX[2]
09H032	54ans	LAM5a	46,XY,t(9;11)(p22;q23)[20]/46,XY[1]
09H098	30ans	LAM5a	46,XX,t(9;11)(p22;q23)[18]/46,XX[2]
07H037	57 ans	LAL pro B	46,XY,t(4;11)(q21;q23)[12]/45,XY,t(4;11)(q21;q23),-21[6]/46,XY[2]
08H110	50ans	t-LAL (L.bilignée)	46,XX,t(4;11)(q21;q23)[20]
07H075	43ans	LAL-pré B	46,XX,t(4;11)(q21;q23)[2]
08H090	37ans	LAL-préB	t(4;11)(q21;q23) sur un nombre limité de métaphases
07H058	38ans	LAM5a	46,XY,t(4;10;11)(q23;p13;q23)[18]/46,XY[1]
05H128	29ans	LAM5a	t(?10;11)(?p12;q23), caractérisation en cours
07H114	71ans	LAM4	47,Y,der(X)t(X;11)(p11;q13),inv(11)(q13q23),+8[18]/47,XY,+8[2]

06H066	55ans	LAM post-SMD	43~49,XX,del(3)(q12)[20],+?6[2],del(8)(p11.2)[9],t(11;15)(q23;q14)[20],-16[3],-20[3],+21[15],+22[2][cp20]
UPN-08-1385		t-LAM	47,XX,+?8,t(11;15)(q23;q15),del(20),(q11.2)[cp23]
08H091	21ans	LAL-préB	Caractérisation en cours
08H122	66ans	LAL-préB	Caractérisation en cours

Tableau I : Les spécimens de leucémies avec un réarrangement de *MLL* (Série BCLQ). La nomenclature des caryotypes est établie selon l'ISCN2009⁵⁹. Abréviations : LAM, leucémie aiguë myéloïde; LAL, leucémie aiguë lymphoïde; t-LAM, leucémie aiguë myéloïde post traitement; t-LAL, leucémie aiguë lymphoïde post traitement.

3. Obtention des chromosomes :

L'obtention des chromosomes a été accomplie selon les étapes suivantes :

3.1 Décongélation des cellules

Les spécimens ont été cryopréservés en azote liquide et conservés en utilisant le DMSO (diméthyl sulfoxyde), un agent cryo-protecteur, réduisant la quantité de glace formée lors de la cryopréservation.

- décongélation dans le milieu constitué de IMDM (Iscove's modified Dulbecco's Medium) 1X (80%) et SVF (20%).
- centrifugation, et décantation permettant la récupération du culot cellulaire.
- test de viabilité au bleu de trypan permettant de déterminer le nombre de cellules viables, et ainsi de déterminer le volume du milieu de culture optimal à utiliser pour la culture de l'échantillon (correspondant à une concentration cellulaire de 1million par millilitre).

3.2 Culture Cellulaire

La culture cellulaire se fait en respectant des conditions précises de température, Ph, CO₂, humidité, stérilité, ainsi qu'un milieu de culture adéquat.

Le milieu de culture généralement utilisé est le RPMI, complété par des nutriments et des additifs nécessaires pour la croissance cellulaire, comme :

- L-glutamine
- SVF : sérum de veau fœtal
- Antibiotiques
- Facteurs de croissance additionnés en fonction du diagnostic, et donc du type cellulaire à cultiver, pour optimiser la croissance. (Exemple: SCF, Flt3 et GM-CSF, pour une moelle de LAM; GM-CSF pour une moelle de LMC; SCF, Flt3 et IL7 pour une moelle de LAL-B; PHA pour une moelle de LAL-T)

On utilise aussi un milieu de culture spécifique pour la moelle osseuse, qui est le MarrowMax Bone Marrow Medium (Invitrogen, cat n°12260014). Ce milieu est constitué d'un milieu de base enrichi en sérum fœtal bovin, gentamicine, L-glutamine et d'un milieu conditionné exclusif fabriqué à l'aide d'une lignée cellulaire stromale de moelle osseuse humaine.

Généralement pour chaque spécimen, on diversifie les milieux de culture, ainsi que les temps de culture : 24h, 48 et 72h afin d'augmenter l'index mitotique. La culture s'effectue à 37 degrés et 5% de CO₂.

3.3 Préparation des métaphases:

La préparation des métaphases passe par une procédure à plusieurs étapes :

3.3.1 Récolte cellulaire :

La récolte cellulaire est la collection des cellules en division après leur blocage au stade de métaphases, leur traitement par une solution hypotonique, leur fixation et étalement sur des lames.

Traitement par Dactinomycine et Colcémide :

-Traitement par la dactinomycine (antibiotique, intercalant au niveau du sillon mineur de l'ADN, donc au niveau des séquences riches en A et T), pendant 15 min à 37°C; à une concentration finale de 0.5µg/ml. Ce traitement permet un allongement des chromosomes.

-Traitement par la colcémide (un inhibiteur du fuseau mitotique, bloquant les cellules en métaphases), à une concentration finale de 0.05µg/ml, également 15 min à 37°C.

Choc hypotonique :

Traitement des cellules récupérées par centrifugation par une solution hypotonique de KCL à 0,075M, préchauffée à 37°C. Le passage d'eau à l'intérieur de la cellule par osmose permet de gonfler les cellules, laissant ainsi plus de place aux chromosomes pour bien s'étaler.

Fixation :

Fixation des cellules par la solution Carnoy (1 volume d'acide acétique glacial pour 3 volumes de méthanol).

Cette fixation est répétée 3 fois : addition de solution Carnoy/ incubation 15min (la première fois seulement)/ centrifugation et décantation.

Les cellules sont ainsi prêtes à l'étalement ou à une conservation à -20°C.

Étalement :

-On laisse tomber des gouttes de la suspension obtenue sur des lames.

-Séchage des lames avec examen parallèle, utilisant un microscope en contraste de phase, afin de vérifier la concentration et l'étalement des métaphases.

✓ L'étalement est très affecté par plusieurs variables : température, humidité, technique de séchage et qualité du choc hypotonique.

-Vieillessement des lames conçues pour une analyse de métaphases en bandes G, à 60°C pendant une nuit, ou vieillissement à température pièce pendant 4 à 10 jours.

-Séchage à l'air libre pour le FISH.

3.3.2 Marquage des chromosomes :

On utilise la technique de marquage GTG (bandes G obtenues par Trypsine et Giemsa);

-Traitement des lames vieilleses avec l'enzyme trypsine à la température pièce.

Le temps du traitement est variable d'un échantillon à un autre. Le temps est défini pour chaque culot cellulaire en appliquant des temps variables sur les premières lames et en examinant la qualité des bandes obtenues, après coloration Giemsa, au microscope.

-Rinçage dans un bain d'éthanol 70%.

-Coloration dans le Giemsa 4% durant 3 à 5min.

-Rinçage dans deux bains d'eau de robinet.

Le marquage est suivi par l'analyse de 20 métaphases, et l'interprétation du caryotype se fait selon l'ISCN 2009.⁶⁶

4. Hybridation in Situ en Fluorescence (FISH) utilisant des BACs

La technique consiste en l'hybridation d'une sonde moléculaire (séquence d'ADN) dont la position dans le génome est connue, et qui est chimiquement marquée de façon à pouvoir être détectée par la suite. La sonde d'ADN hybridera, dans les bonnes conditions, spécifiquement au niveau de sa séquence complémentaire.

Les sondes utilisées dans notre projet sont les BACs. Ces sondes sont locus spécifiques de 150 à 300 Kb, permettant d'identifier une région spécifique du génome. L'ADN est cloné dans des bactéries, auxquelles ils doivent leurs noms : Bacterial Artificial Chromosomes. Après les différentes étapes de l'hybridation, décrites ci-dessous,

l'analyse de métaphases nous permettra d'identifier l'existence d'un réarrangement ou non, du gène ciblé par le BAC appliqué.

Les différents BACs utilisés dans le projet, en précisant le gène ciblé, et la position du gène ciblé (chromosome, bras chromosomique, bande chromosomique) sont résumés dans le tableau II. Le site <http://genome.ucsc.edu/>, version 2009, a été utilisé pour le choix des BACs.⁶⁷

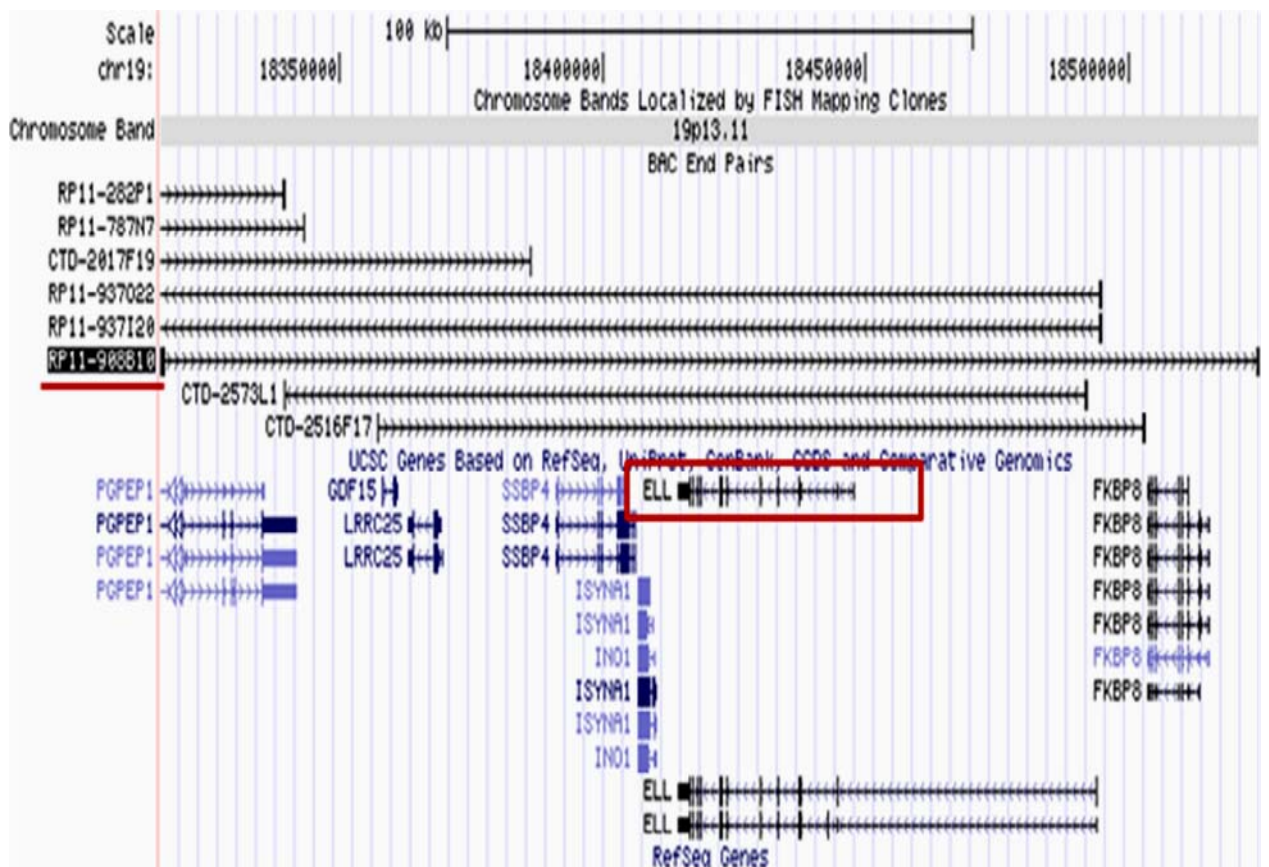


Figure 7: Exemple de la sélection d'un BAC pour étudier un locus ou un gène.

BAC RP11-908B10, au niveau de la bande 19p13.1, couvrant le gène *ELL*.⁶⁷

Extraction de l'ADN :

L'extraction a été faite selon les instructions du Kit Gerard Biotech (Oxford, OH, cat n° S121-L).

En résumé la technique passe par les étapes suivantes :

- Une séparation des bactéries de leur milieu de culture par centrifugation. (Sélection des bactéries transformées, résistantes au chloramphénicol, par addition de cet antibiotique au milieu de culture).
- Traitement chimique permettant une lyse membranaire et une dissociation des différents constituants de la bactérie : membrane, ARN, protéines, sels et ADN extra-chromosomique (BACs)
- Centrifugation et récupération de l'ADN/ARN par filtration du surnageant avec un filtre adéquat.
- Précipitation de l'ADN/ARN par l'isopropanol et récupération par centrifugation.
- Dégradation de l'ARN par une RNase.
- Deuxième précipitation par l'isopropanol suivie par une deuxième digestion de l'ARN par la RNase.
- Lavages par l'éthanol et resuspension du culot obtenu dans le tampon Tris 10mM.

Marquage par un fluorochrome :

Le marquage de notre séquence d'ADN est fait par la technique Nick translation, permettant d'incorporer des acides nucléiques marqués par le fluorochrome. Pour cette réaction, on ajoute à 1 µg d'ADN (calcul du volume nécessaire), les acides nucléiques, le fluorochrome, le tampon et l'enzyme Nick translation (Abott Molecular Inc, cat n°32-801300) et on procède à une incubation de 8-16h à 37°C, suivie par l'arrêt de la réaction, à 70°C pendant 10 minutes.

Précipitation de la sonde :

La précipitation de la sonde se fait après ajout de 30µg/ml COT-1A DNA (Invitrogen, cat n°15279-011), et du sperme de saumon (Sigma, cat n°D9156-1ML), à une concentration de 926 µg/ml, qui sont constitués de séquences hautement répétées, ce qui diminue l'hybridation non spécifique et le bruit de fond. La précipitation se fait par l'éthanol 100%.

Après conservation à -20°C et centrifugation, on sèche le culot et on ajoute 14µl de solution d'hybridation et 6µl d'eau stérile sans nucléase.

La solution d'hybridation est constituée de :

Formamide 100% : déstabilise les liaisons hydrogènes et diminue la température nécessaire à la dissociation des brins d'ADN.....	500 µl
Sulfate de Dextran 50% : favorise l'association des molécules hybridées.....	200 µl
Solution citrate de sodium (20XSSC) : augmente la stabilité des hybrides et la vitesse de réaction.....	100 µl
H2O DIUF (Deionized Ultra Filtered Water).....	200 µl

Hybridation de la sonde :

L'hybridation de la sonde commence par la dénaturation de la sonde et de la lame cible, par un traitement à la formamide (70%) et à la chaleur à 75°C pendant 5 minutes.

Les lames sont traitées avec la RNase et la pepsine, afin d'éliminer l'ARN endogène et les protéines résiduelles.

L'hybridation de la sonde avec les séquences complémentaires d'ADN sur la lame se fait à 37°C, dans une chambre humide pendant environ 16 heures.

L'hybridation est suivie de lavages qui éliminent les hybrides non spécifiques et instables. Le nombre de lavages, la température, la durée et les solutions utilisées varient selon la nature de la sonde et la stringence désirée. La première solution est une solution

à 0.4XSSC/0.3% NP-40 et la deuxième est une solution à 2XSSC/0.1% NP-40. La durée de lavage est de 1 à 2 minutes.

Contre coloration par le DAPI

Afin de permettre une meilleure analyse, les chromosomes doivent être colorés. On utilise l'agent intercalant: DAPI (4'-6-diamidino-2-phénylindole).

BACs	Gène ciblé	Position du gène
RP11-908B10	<i>ELL</i>	19p13.1
RP11-819E16	<i>MLLT1</i>	19p13.3
RP11-90B16/RP11-615O9	<i>SH3GL1</i>	19p13.3
RP11-90B16	<i>CCDC94</i>	19p13.3
RP11-978J4/RP11-468O16	<i>MYO1F</i>	19p13.2-19p13.3
RP11-952P13	<i>GAS7</i>	17p13
RP11-451F21	<i>CASC5</i>	15q14

Tableau II: Les BACs utilisés pour l'identification des gènes partenaires de fusion de *MLL*. Les BACs ont été choisis sur le site <http://genome.ucsc.edu/>, version 2009.⁶⁰

5. Séquençage des gènes de fusion de *MLL* :

La détermination des points de cassures a été accomplie par RT-PCR et séquençage.

Extraction de l'ARN :

Les cellules de moelle osseuse ou du sang des patients consentants, sont aussi conservées dans du TRIzol (Invitrogen, cat n°15596018) à -80°C, quand la quantité de l'échantillon obtenu le permet, pour une extraction d'ARN ultérieure.

L'isolation de l'ARN par le TRIzol est suivie par une séparation de phase par le chloroforme, et l'ARN retrouvé dans la phase aqueuse est précipité par l'isopropanol. Après des lavages par l'éthanol, l'ARN est dissous dans l'eau DEPC (diethyl pyrocarbonate).

RT-PCR et Séquençage :

La RT-PCR est accomplie en utilisant le kit RT-PCR One Step, de Qiagen (cat n°210212), avec des amorces, résumées dans le tableau 3, à une concentration finale de 0.6 μ M, pour 2 μ g d'ARN.

Les amorces ont été choisies et commandées sur le site www.idtdna.com (tableau III).

La RT-PCR est accomplie dans un thermocycleur, par différents cycles, avec différentes durées et de températures. Les phases de la RT-PCR incluent la transcription reverse (50°C durant 30 minutes), suivie par une période d'activation de l'ADN polymérase (15min, à 95°C), suivie par une amplification comportant 25 à 40 cycles, dépendamment de l'échantillon, comprenant les trois étapes : dénaturation, amorçage de la réplication et extension. La migration du c-DNA obtenu est faite sur gel d'agarose à 1.5%.

L'extraction de c-DNA du gel d'agarose est faite avec le Kit QIAXII (Qiagen), selon les instructions du manufacturier.

Le séquençage a été effectué par le séquenceur automatique ABI 3730.

Amorces utilisées pour le cas 04H121	Position	Numéro
5' AAGCAGGAGAATGCAGGCACTTTG 3'	<i>MLL</i> exon 9	111
3' TTCAAGGAAGCCAAGGGCACATC 5'	<i>ELL</i> exon 2	145
5' AGCCAGTGTGTGAAGAACGTGGTG 3'	<i>MLL</i> exon 7	109
3' CTTCGACTGCATCCAGCAGTATGT 5'	<i>ELL</i> exon 3	146
Amorces utilisées pour le cas 06H057		
5' ACCACT CCT AGTGAGCCCAAGAAA 3'	<i>MLL</i> exon 7	110
3' TTCAAGGAAGCCAAGGGCACATC 5'	<i>ELL</i> exon 2	145
Amorces utilisées pour le cas 06H152		
5' ACCACT CCT AGTGAGCCCAAGAAA 3'	<i>MLL</i> exon 7	110
3' TGG TCTCATTGGTGGTCGTGTTGA 5'	<i>GAS7</i> exon 3	120

Tableau III: Amorces utilisées pour le séquençage des cas cités.

6. Établissement du caryotype Spectral (SKY)

La technique SKY permet l'identification des anomalies chromosomiques complexes, impliquant plusieurs chromosomes, en une seule expérience d'hybridation.

Cette technique, consiste en une co-hybridation de sondes chromosomiques marquées par des fluorochromes (5 fluorochromes sont utilisés), chaque chromosome étant marqué par une combinaison unique de fluorochromes. L'acquisition et l'analyse ultérieure de l'image par le système SKY (cube spectral, permettant une excitation simultanée de tous les fluorochromes) permet l'établissement du caryotype spectral, où chaque chromosome sera doté d'une couleur spécifique.

Brièvement les étapes de la technique sont:

- Préparation des métaphases : Après avoir choisi les lames contenant des métaphases de bonne qualité, les lames sont traitées à la pepsine, afin d'éliminer le cytoplasme.
- Dénaturation des lames et des sondes SKY (Applied Spectral Imaging, n°SKI000028).
- Hybridation à 37°C pendant 36 heures.
- Détection : lavages des lames, pour éliminer l'hybridation non spécifique, et application du DAPI.
- Examen des lames au microscope à fluorescence et capture des images à l'aide du logiciel SkyVision de la compagnie Applied Spectral Imaging.

Chapitre III
-RÉSULTATS

1. Caractéristiques cliniques des patients présentant l'anomalie 11q23 et incidence des différentes translocations impliquant cette anomalie dans notre échantillonnage

Trente neuf échantillons de cancers hématologiques de patients adultes, présentant un réarrangement de *MLL* ont été collectés par la BCLQ, entre 2001 et 2009 (Tableau 1). Les patients avaient une médiane d'âge de 48 ans, avec un intervalle allant de 20 à 75 ans. Dix-sept de ces patients étaient de sexe masculin (~43%) et 22 de sexe féminin (~57%). Les cancers hématologiques incluent 30 LAM, 6 LAL, 1 leucémie bilignée, 1 leucémie biphénotypique et un syndrome myéloprolifératif (LMMC). Les leucémies collectées sont des leucémies de novo (28 cas, ~72%), ou secondaires à un SMP/SMD (2 cas, ~5.1%), ou survenant suite à un traitement antérieur (9 cas, ~23%). Les leucémies survenant suite à un traitement antérieur ont présenté des phénotypes différents : myéloïde, lymphoïde et biphénotypique. Les cancers antérieurs sont variables incluant cancer du sein, cancer des glandes salivaires, cancer thyroïdien et leucémie aiguë myéloïde. Le traitement antérieur est une chimiothérapie présentant différentes associations : un inhibiteur de topoisoméraseII (Doxorubicine, Épirubicine) avec un agent alkylant (Cyclophosphamide), un agent alkylant avec radiothérapie ou une radiothérapie seule.

L'incidence des leucémies selon les partenaires de fusion est de : 10 cas (~25.6%) pour la $t(11;19)(q23;p13)$, 9 cas (~23%) pour la $t(9;11)(p22;q23)$, 5 cas (~12.8%) pour la $t(6;11)(q27;q23)$, 4 cas (~10%) pour la $t(4;11)(q21;q23)$, 2 cas (~5%) pour la $t(11;17)(q23;q25)$, 2 cas (~5%) pour la $t(11;15)(q23;q14)$, 2 cas (~5%) pour la $t(10;11)(p12;q23)$, 1 cas (~2.5%) pour la $t(11;17)(q23;q21)$, 1 cas (~2.5%) pour la $t(11;17)(q23;p13)$. (Voir tableau IV).

Les translocations retrouvées dans les leucémies post-traitement sont les translocations $t(6;11)(q27;q23)$, $t(9;11)(p22;q23)$, $t(4;11)(q21;q23)$, $t(11;15)(q23;q14)$ et $t(11;19)(q23;p13)$. Cette dernière translocation est la plus fréquente.

L'âge adulte des patients explique probablement l'incidence supérieure des LAM par rapport aux LAL. Environ 74% des LAM de novo ont présenté une composante monocytaire, soit une LAM4 (leucémie aiguë myélomonocytaire) ou une LAM5 (leucémie aiguë monoblastique, sans différenciation; M5a ou peu différenciée; M5b). La translocation $t(9;11)(p22;q23)$ s'associe dans les 8 cas de leucémie de novo à une leucémie à composante monoblastique non différenciée, LAM5A. Le reste des cas sont des LAM de type peu différenciée, ou sans maturation (M0 ou M1, selon la classification FAB). Les LAL sont de type B (proB, préB).

Vu la prépondérance des LAM avec composante monocytaire dans notre cohorte, les caractéristiques cytochimiques de la majorité des LAM correspondent aux critères habituellement retrouvés dans les LAM type M4 ou M5, soit des estérases non spécifiques positives, une réaction au myéloperoxydase et au noir de Soudan positives pour les M4 et négatives pour les M5. Pour l'immunophénotype, on note une positivité des antigènes myéloïdes (CD13, CD33), et des marqueurs de différenciation monocytaire (CD14, CD36, CD64 et CD15). Le marqueur myéloblastique CD34 était positif ou négatif selon les cas, et le marqueur HLADR, positif. Les LAL avec $t(4;11)(q21;q23)$ présentent le phénotype typique associé à cette translocation, soit CD19+, CD10- et CD15+.

Des anomalies cytogénétiques additionnelles variables ont été observées dans 9 cas de leucémies (~23%): des LAM de novo (6 cas), une t-LAM, une LAM post SMD, et une LAL. Ces anomalies incluent une duplication du der(19) dans un cas présentant une $t(11;19)(q23;p13)$ (07H0145), une monosomie 7 (08H139), une trisomie 8 (07H045, 07H114 et UPN-1385) et un caryotype complexe dans les deux cas présentant la $t(11;15)$, un cas avec $t(9;11)(p22;q23)$ et un cas avec $t(11;19)(q23;p13)$. L'impact pronostique des anomalies additionnelles en association avec l'anomalie 11q23 est peu étudié. Une étude récente rapporte un impact négatif sur la rémission complète du patient.³¹

L'impact pronostique du réarrangement de *MLL* dans notre cohorte ne peut être établi présentement par une évaluation statistique de la survie globale et la survie sans événement. Une durée de suivi de notre cohorte plus prolongée est requise pour une telle étude, de même qu'un nombre plus important de cas. Néanmoins, une observation de l'évolution des patients nous permet d'estimer le pronostic plutôt défavorable de l'anomalie 11q23 dans notre cohorte. Pour les 35 patients dont le suivi a été possible jusqu'en 2009, 21 patients (~60%) sont décédés, dans un intervalle allant de quelques mois à 2 ans, à partir de la date du diagnostic; 1 patient est décédé après 6 ans, et 13 patients (~37%) sont vivants.

Translocation	LAM	LAL	L.biphénotypique/ L.bilignée	SMP
t(9;11)(p22;q23)	9 (8 LAM de novo, 1 t-LAM)			
t(6;11)(q27;q23)	5 (4 LAM de novo, 1 t-LAM)			
t(11;19)(q23;p13)	7 (3 LAM de novo, 4 t-LAM)		1/1	1
t(4;11)(q21;q23)		4(1 t-LAL)		
t(11;17)(q23;q25)	2			
t(11;17)(q23;q21)	1			
t(11;17)(q23;p13)	1			
t(11;15)(q23;q14)	2 (1 post SMD, 1 t-LAM)			
t(10;11)(?p11;q23)	2			
Identification du GP en cours	1	2		

Tableau IV: Incidence des translocations impliquant le gène *MLL* dans notre cohorte. Abréviations: LAM, leucémie aiguë myéloïde; LAL, leucémie aiguë lymphoïde; t-LAM, leucémie aiguë myéloïde post traitement; t-LAL, leucémie aiguë lymphoïde post traitement; SMP, syndrome myéloprolifératif; SMD, syndrome myélodysplasique; GP, gène partenaire.

2. Identification des partenaires de fusion communs de *MLL*

2.1 Translocations t(9;11)(p22;q23), t(6;11)(q27;q23) et t(4;11)(q21;q23)

Les t(9;11)(p22;q23), t(6;11)(q27;q23) sont les translocations les plus récurrentes, impliquant un réarrangement de *MLL*, avec la t(11;19)(q23;p13) dans les LAM. La t(4;11)(q21;q23) est la plus fréquemment détectée dans les LAL.

Pour ces cas de translocations identifiées par cytogénétique conventionnelle et dont le réarrangement de *MLL* a été confirmé par FISH, le caryotype standard est adéquat pour déterminer le réarrangement moléculaire sous-jacent, vu la récurrence de ces translocations et l'implication d'un seul gène décrit dans la bande chromosomique réarrangée comme partenaire de *MLL*. Les partenaires de fusion de *MLL* suite à la t(9;11)(p22;q23), la t(6;11)(q27;q23) et la t(4;11)(q21;q23) sont respectivement, *MLLT3/AF9*, *MLLT4/AF6* et *AFF1/AF4* (Figures 8, 9, 10).

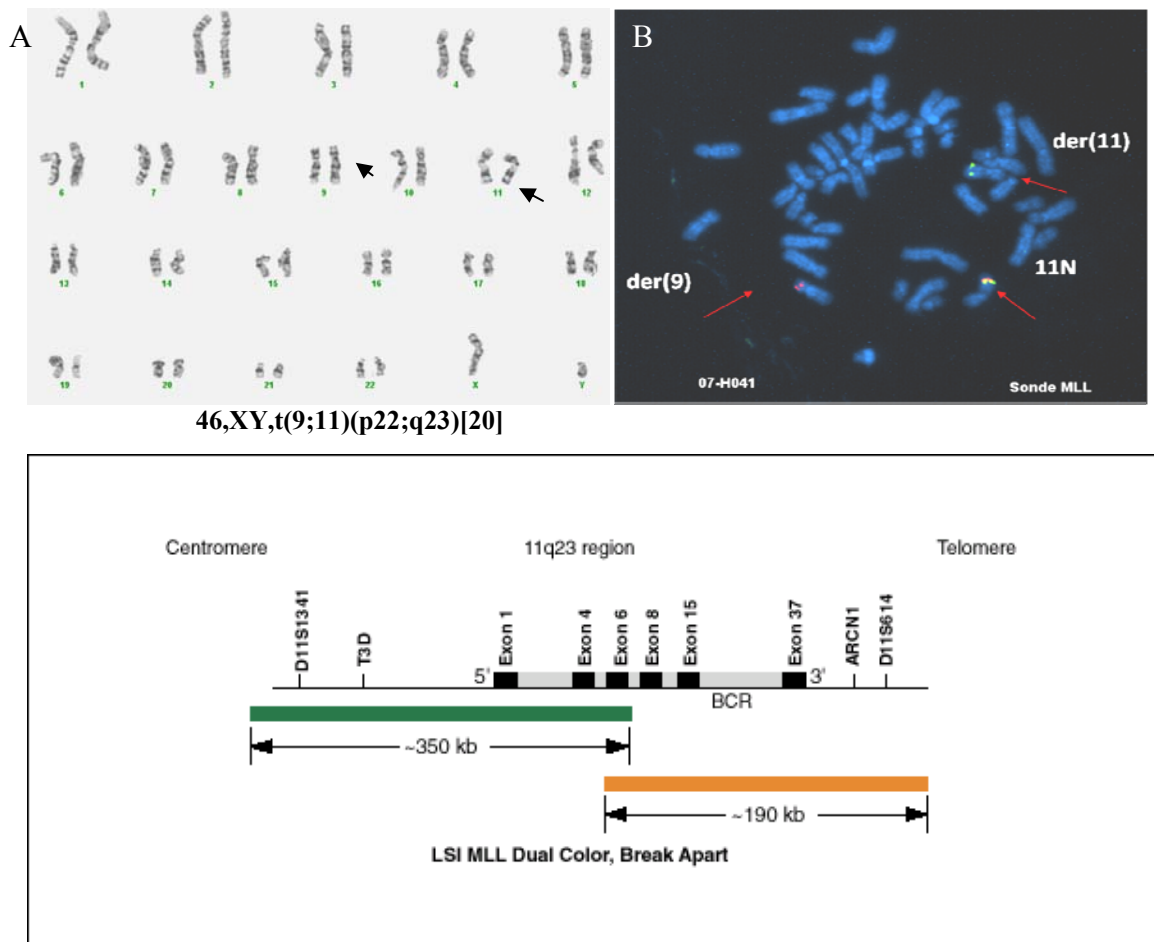


Figure 8: Caryotype et FISH du patient 07H041 présentant la $t(9;11)(p22;q23)$.

A. Caryotype en bandes G des cellules leucémiques. Les flèches indiquent les chromosomes dérivés.

B. FISH avec la sonde LSI *MLL* dual color, Break Apart Rearrangement, montrant un réarrangement de *MLL*. Le signal de fusion est sur le chromosome 11 normal, le signal vert (centromérique) est localisé sur le der(11), et le signal rouge (télomérique) est localisé sur le der(9).

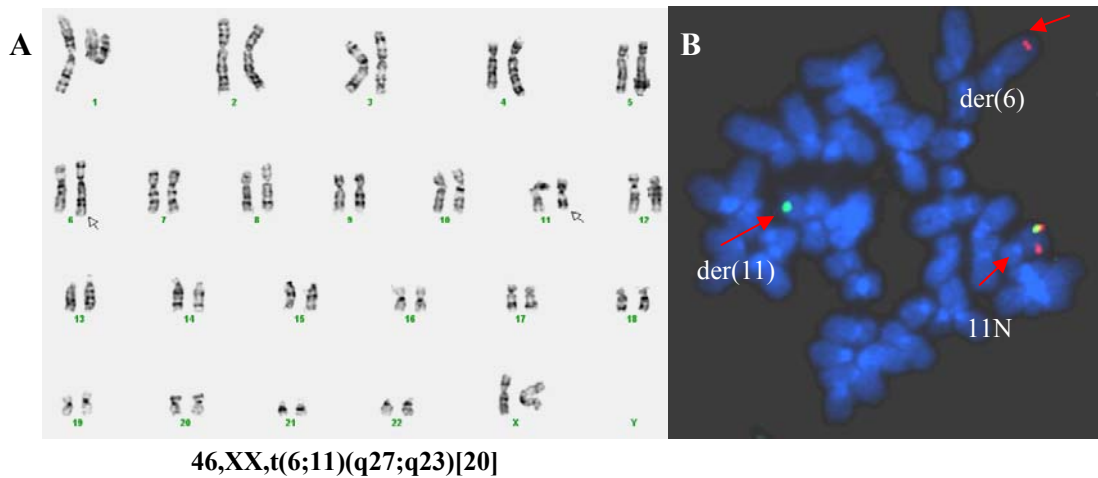


Figure 9: Caryotype et FISH du patient 01H001 présentant la t(6;11)(q27;q23).

A. Caryotype en bandes G des cellules leucémiques. Les flèches indiquent les chromosomes dérivés.

B. FISH avec la sonde LSI *MLL* dual color, Break Apart Rearrangement, montrant un réarrangement de *MLL*. Le signal de fusion est sur le chromosome 11 normal, le signal vert est sur le der(11), et le signal rouge est sur le der(6).

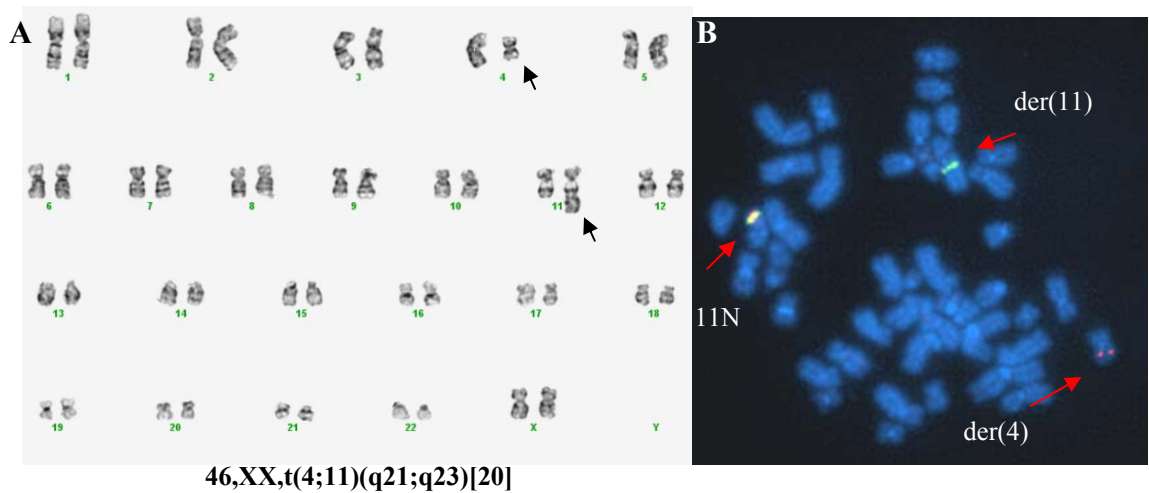


Figure 10: Caryotype et FISH du patient 08H110 présentant la t(4;11)(q21;q23).

A. Caryotype en bandes G des cellules leucémiques. Les flèches indiquent les chromosomes dérivés.

B. FISH avec la sonde LSI *MLL* dual color, Break Apart Rearrangement, montrant un réarrangement de *MLL*. Le signal de fusion est sur le chromosome 11 normal, le signal vert est sur le der(11), et le signal rouge est sur le der(4).

2.2 Translocation t(11;19)(q23;p13)

La t(11;19)(q23;p13) identifiée par caryotype conventionnel (exemple, patient 04H121, figure 12), est un cas de translocation où la résolution du caryotype ne permet pas de déterminer le réarrangement moléculaire associé, car plusieurs gènes (au moins 5) peuvent être impliqués comme partenaire de *MLL* sur les bandes 19p13.1 et 19p13.3.

Dans ce cas, les techniques de cytogénétique moléculaire et de biologie moléculaire nous ont permis d'identifier la fusion génétique dans 8 cas de leucémies avec cette translocation. Ainsi, nous avons déterminé :

- *ELL*, comme partenaire de fusion de *MLL* dans les cas 07H003, 07H073, 09H018 (Figure 11), 04H121 (Figures 12, 13, 14 et 15), 06H057 (Figures 16, 17 et 18)
- *MLLTI(ENL)*, comme gène partenaire de fusion de *MLL* dans les cas 02H017, 08H085 et 07H045 (Figures 19, 20 et 21).

Pour le patient 05H170, le partenaire de fusion n'a pas pu être déterminé par cytogénétique moléculaire étant donné la qualité sous-optimale des métaphases et l'hyperploïdie chez ce patient.

Cas 07H003, 07H073 et 09H018:

Pour ces deux cas, le partenaire de fusion a été identifié par la technique FISH. L'étude avec le BAC RP11-908B10, couvrant le partenaire de fusion *ELL*, montre une séparation du signal, signifiant le réarrangement de ce gène *ELL* (Figure 11).

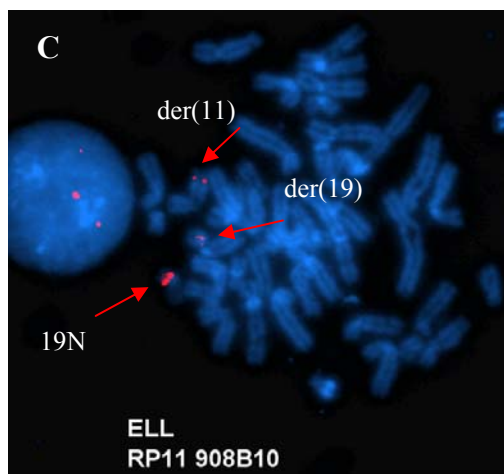
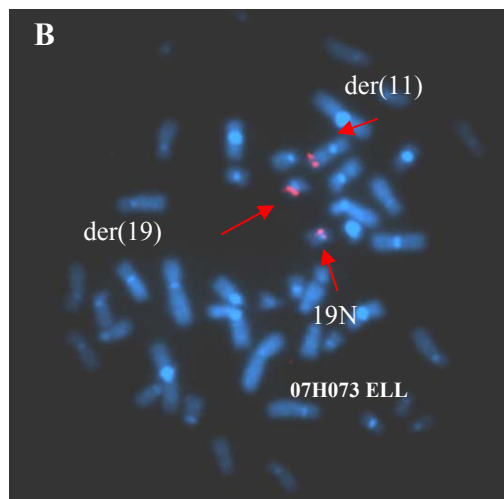
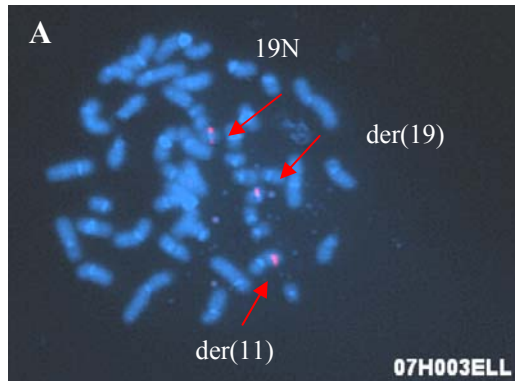


Figure 11: Analyse FISH des patients 07H003 et 07H073 avec le BAC RP11-908B10.

A. Patient 07H003. B. Patient 07H073. C. Patient 09H018. On note un signal sur le chromosome 19 normal et deux signaux séparés sur le der(11) et le der(19), confirmant un réarrangement avec cette sonde couvrant le gène *ELL*.

Patient 04H121:

Pour ce patient, l'application du BAC RP11-908B10, couvrant *ELL* montre un signal très faible sur le der (19) (Figure 13). L'utilisation des BACs couvrant *MLLT1* et *MYOIF* confirment qu'il n'y pas de réarrangement de ces gènes et que le point de cassure est centromérique par rapport à ces gènes (figure 14 A, B). Nous avons complété cette étude avec une technique de biologie moléculaire (RT-PCR), qui nous a permis de confirmer le partenaire de fusion de *MLL*, soit *ELL*, et de déterminer les points de cassure des deux transcrits amplifiés. Le premier transcrit est une fusion de l'exon 9 de *MLL* à l'exon 2 de *ELL*, et le deuxième transcrit, est une fusion de l'exon 10 de *MLL* à l'exon 2 de *ELL* (Figure 15 A, B).

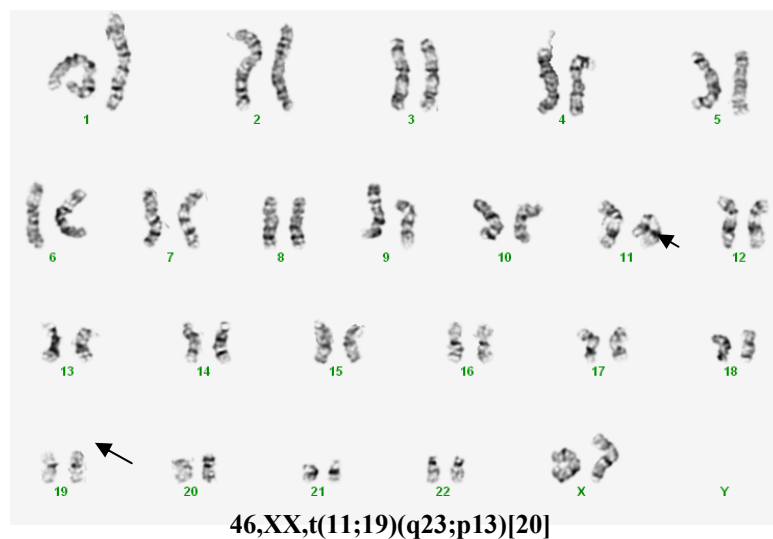


Figure 12: Caryotype en bande G du patient 04H121 présentant la t(11;19)(q23;p13). Les flèches indiquent les chromosomes dérivés.

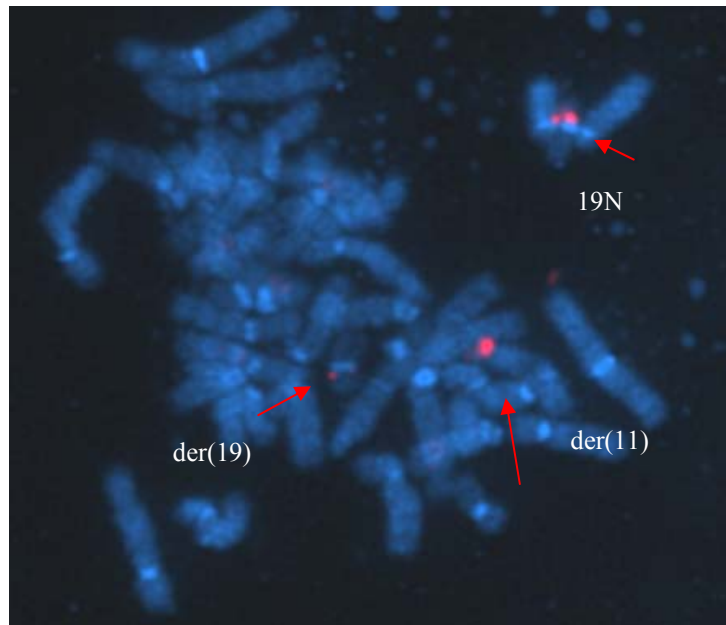


Figure 13: Analyse FISH du patient 04H121 avec le BAC RP11-908B10. Présence d'un signal sur le chromosome 19 et de signaux séparés sur le der(11) et sur le der(19) (faible signal).

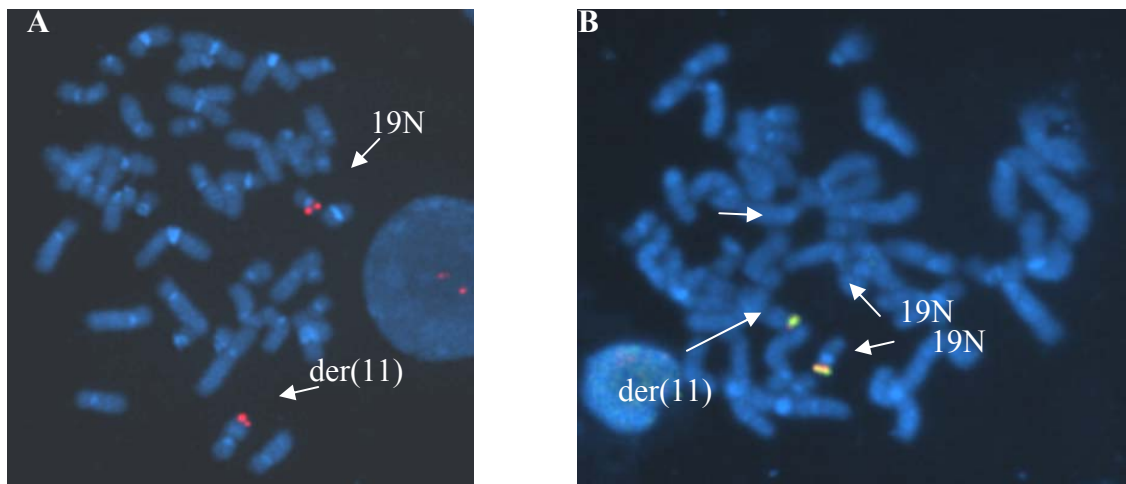


Figure 14: Analyse FISH du patient 04H121 avec autres BACs. A. Métaphase hybridée avec le BAC RP11-819E16 (couvrant le gène *MLLTI*). Présence d'un signal sur le chromosome 19 normal et un signal sur le der(11). B. Métaphase hybridée avec les BACs RP11-978J4 et RP11-468O16 respectivement télomérique et centromérique au gène *MYOIF*. Présence d'un signal sur le chromosome 19 normal et un signal sur le dérivé(11).

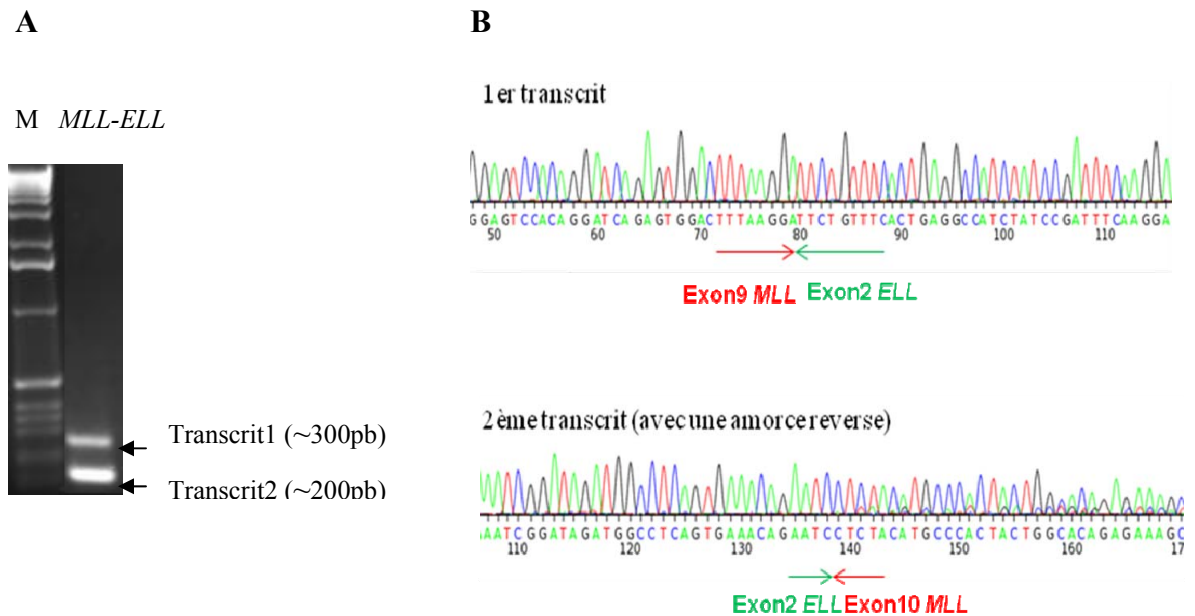


Figure 15: Transcrits chimériques *MLL-ELL* du patient 04H121. A. RT-PCR de l'ARN extrait de la moelle osseuse du patient 04H121. M: 1Kb DNA ladder. Transcrits *MLL-ELL* amplifiés par les amorces MLL-111 et ELL-145. (Tableau III) B. Chromatogramme présentant les séquences nucléotidiques partielles des deux transcrits *MLL-ELL*.

Patient 06H057:

Le caryotype conventionnel démontre une translocation t(11;14)(q23;q32) (Figure 16). Le caryotype spectral nous a permis d'identifier une translocation complexe t(11;19;14)(q23;p13;q32) (figure 17), dans les cellules de la moelle osseuse de cette patiente atteinte d'un syndrome myéloprolifératif, de type leucémie myélo-monocytaire chronique.

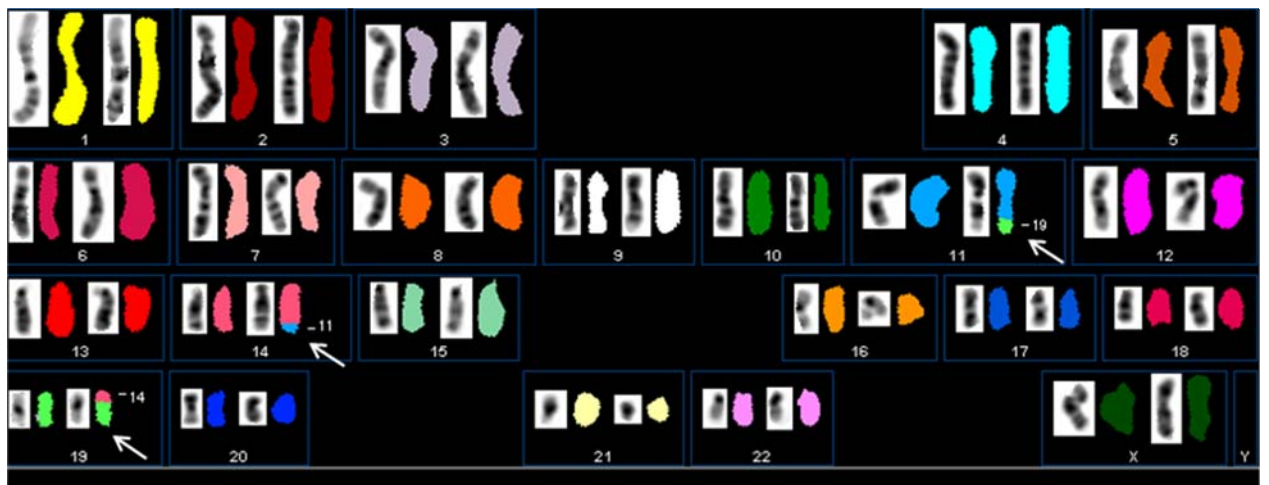
L'identification du partenaire de *MLL* par hybridation in situ en fluorescence, RT-PCR et séquençage a confirmé la fusion *MLL-ELL* (figure 18 A, B). L'association de cette fusion à un syndrome myéloprolifératif est très rare dans la littérature. Par séquençage du premier transcrit (amplifié par les amorces MLL-110 et ELL-145, tableau III), on note la fusion de l'exon 9 de *MLL* à l'exon 2 de *ELL* (figure 18 B).



$t(11;14)(q23;q32)[22]$

Figure 16: Caryotype en bandes G des cellules leucémiques du patient 06H057.

Les flèches indiquent les chromosomes dérivés.



$t(11;19;14)(q23;p13;q32)[22]$

Figure 17: Caryotype spectral du patient 06H057. L'Analyse du caryotype spectral montre un échange chromosomique entre trois chromosomes: 11, 14 et 19; les flèches montrent les chromosomes dérivés.

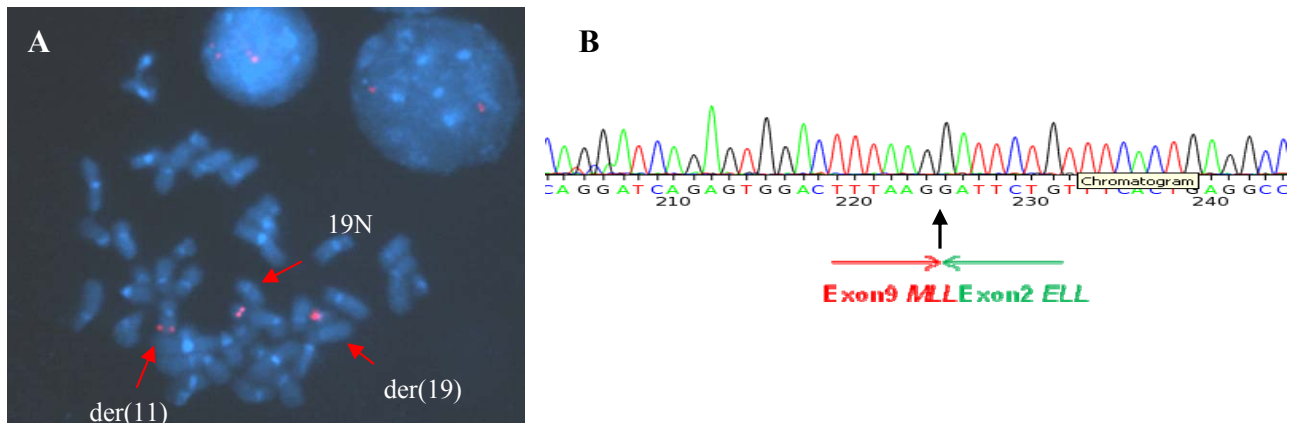


Figure 18 : Analyse FISH du patient 06H057 et séquençage de la fusion *MLL-ELL*.

A. L'hybridation avec le BAC RP11-908B10 montre la présence d'un signal sur le chromosome 19 et deux signaux séparés sur le der(11) et sur le der(19). **B.** Chromatogramme de la séquence nucléotidique partielle du transcrit *MLL-ELL*.

Patients 02H017 et 08H085:

Pour ces deux cas, le partenaire de fusion a été identifié par la technique FISH. L'application du BAC couvrant le partenaire de fusion *MLLT1/ENL* (RP11-819E16) montre une séparation du signal signifiant un réarrangement de ce gène (exemple du patient 02H017, figure 19).

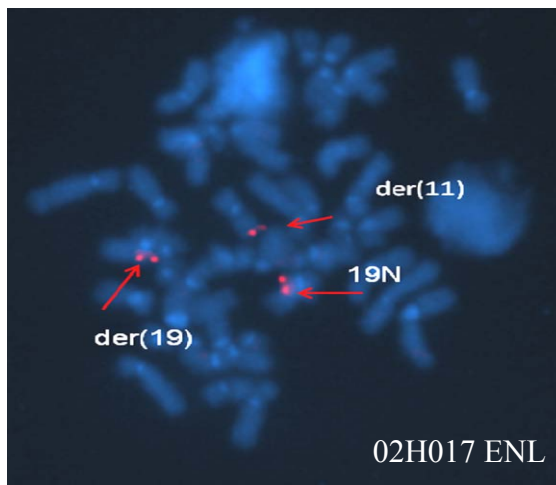


Figure 19: Analyse FISH du patient

02H017. FISH avec le BAC RP11-819E16, marqué avec la rhodamine, démontrant un réarrangement de *MLLT1/ENL*. Un signal sur le chromosome 19 normal et deux signaux séparés sur le der(11) et le der(19) sont indiqués par les flèches.

Patient 07H045:

L'analyse des cellules leucémiques montre la présence d'une $t(11;19)(q23;p13)$ dans le cadre d'un caryotype complexe (figure 20). Le partenaire *MLLT1(ENL)* de *MLL* a été identifié par FISH (figure 21A). Nous avons confirmé la présence du deuxième der(19) par hybridation in situ, avec l'utilisation simultanée des deux sondes couvrant respectivement les gènes *ENL* (RP11-819E16) et *MLL* (RP11-91A14) (figure 21B).

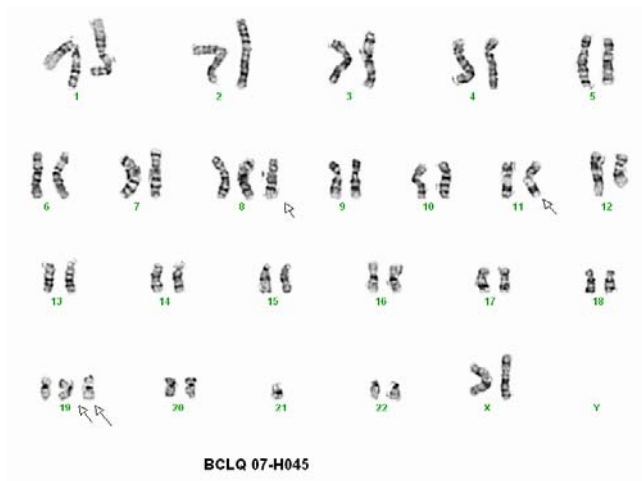


Figure 20: Caryotype en bandes G du patient 07H045. Les flèches indiquent les chromosomes dérivés et le chromosome 8 additionnel. La perte du chromosome 21 n'est pas clonale.

48,XX,+8,t(11;19)(q23;p13),+der(19)t(11;19)(q23;p13)[23]

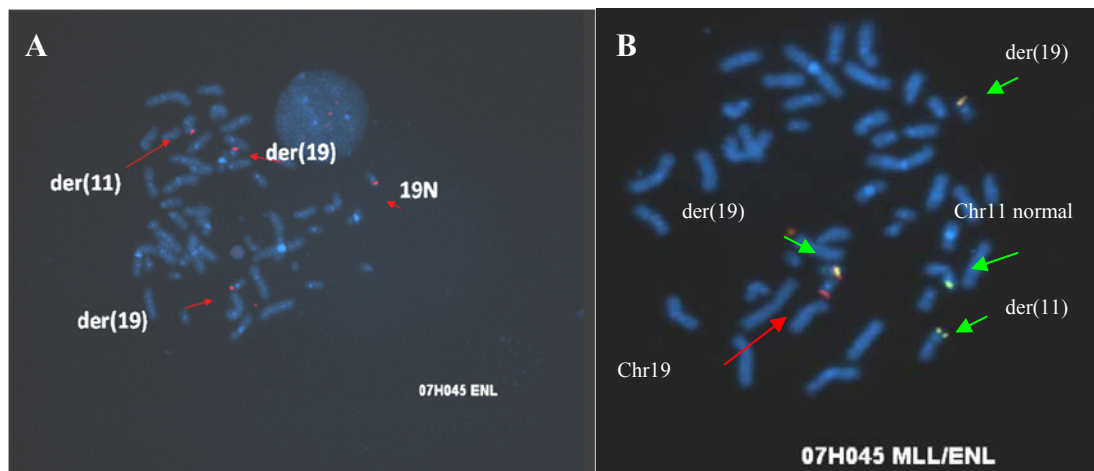


Figure 21: Analyse FISH du patient 07H045. **A.** FISH avec le BAC RP11-819E16, marqué avec la rhodamine, montrant un réarrangement de *MLLT1/ENL*. On note un signal sur le chromosome 19 normal et trois signaux séparés, un sur le der(11) et deux sur deux der(19). **B.** FISH du patient 07H045 avec les BACs RP11-819E16 (marqué par la Rhodamine: signal rouge) et RP11-91A14 (marqué par le FITC: signal vert). Présence de trois signaux de fusion, un sur le der(11) et deux signaux sur les deux der(19), un signal rouge sur le chromosome 19 normal et un signal vert sur le chromosome 11 normal.

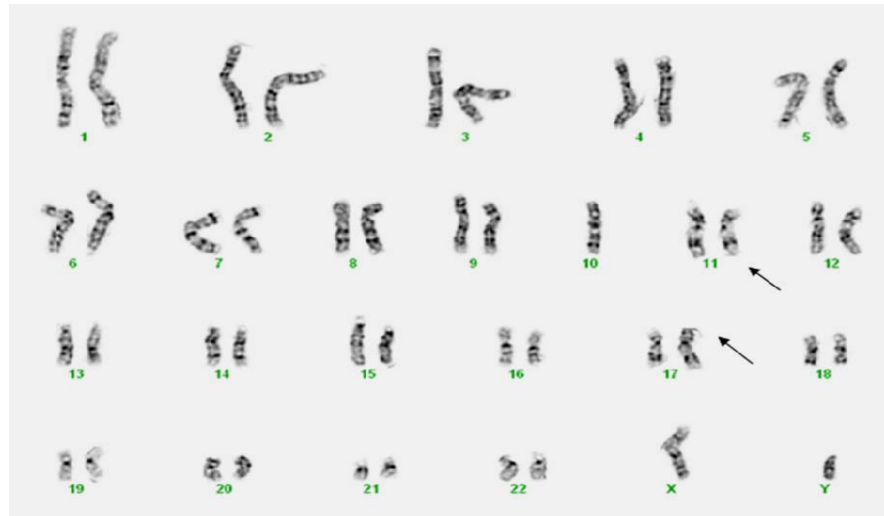
3 Identification des partenaires de fusion rares de *MLL* :

3.1 Translocation t(11;17)(q23;p13), cas 06-H152

La rareté de cette translocation impliquant un réarrangement de *MLL*, rapporté seulement deux fois dans la littérature^{85,86} explique notre intérêt à investiguer le mécanisme moléculaire sous-jacent dans le contexte clinique de ce patient présentant une LAM secondaire de mauvais pronostic.

Le caryotype de la totalité des cellules analysées présentait une seule anomalie, soit la t(11;17)(q23;p13) (Figure 22). L'hybridation in situ de la sonde *MLL* break apart a confirmé un réarrangement de *MLL*. L'hybridation du BAC RP11-952P13, couvrant le gène *GAS7*, a confirmé le réarrangement de ce dernier (Figure 23 A,B).

La fusion chimérique dans ces cellules leucémiques a été confirmée par RT-PCR et séquençage. Deux transcrits de fusion ont été amplifiés par les amorces *MLL*-110 et *GAS7*-120 (Tableau III). Les transcrits résultent de la fusion de l'exon 8 de *MLL* (transcrit principal) ou de l'exon 7 de *MLL* (2^{ème} transcrit) à l'exon 2 de *GAS7* (Figure 24 A,B).



46,XY,t(11;17)(q23;p13)[21]

Figure 22: Caryotype en bandes G des cellules leucémiques du patient 06H152. Les flèches indiquent les chromosomes dérivés.

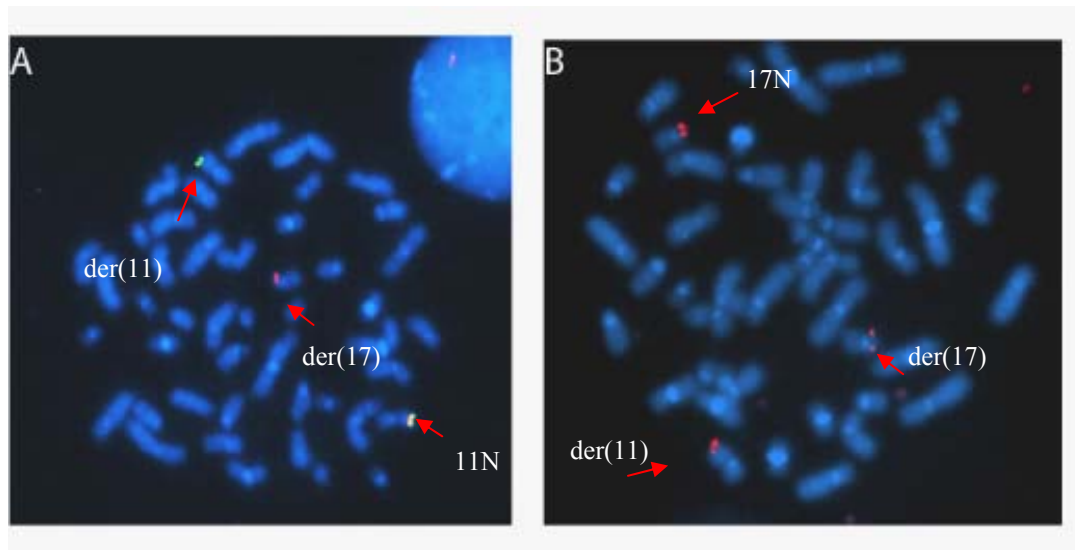


Figure 23: Analyse FISH des cellules leucémiques du patient 06H152. **A.** FISH avec la sonde LSI *MLL* dual color, Break Apart Rearrangement, qui montre un réarrangement de *MLL*. Le signal de fusion est sur le chromosome 11 normal, le signal vert est sur le der(11), et le signal rouge sur le der(17) **B.** FISH avec le BAC RP11-952P13 qui montre le réarrangement de *GAS7*. Un signal est localisé sur le chromosome 17 normal et deux signaux séparés sont sur le der(11) et le der(17).

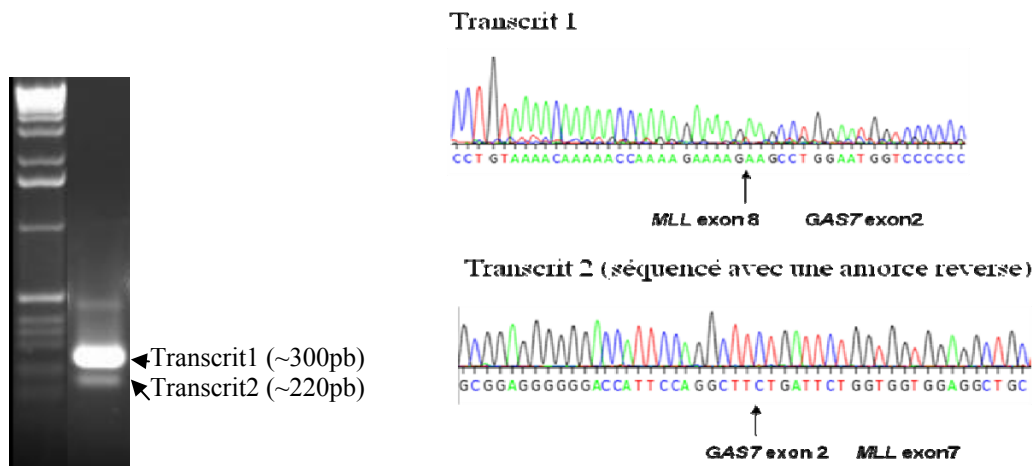
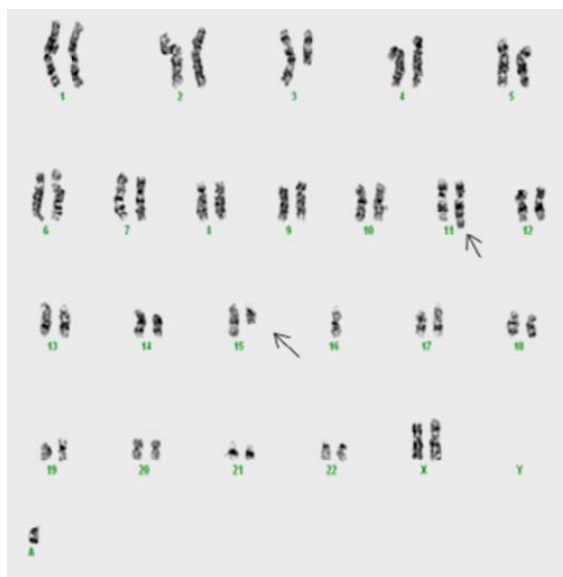


Figure 24: Les transcrits chimériques *MLL-GAS7* du patient 06H152. A. RT-PCR de l'ARN extrait de la moelle osseuse du patient 06H152. M: 1Kb DNA ladder. B. Chromatogramme présentant les séquences nucléotidiques partielles des transcrits *MLL-GAS7*.

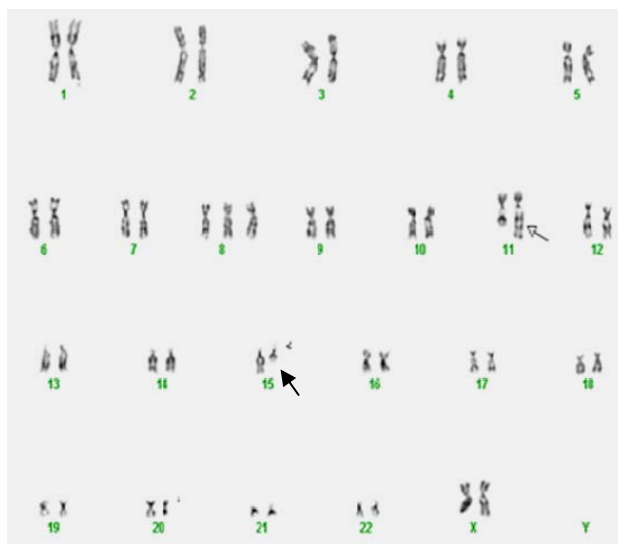
3.2 Translocation t(11;15)(q23;q14)

La t(11;15)(q23;q14) est une translocation rare bien visible au niveau du caryotype conventionnel (Figure 25). Le gène *CASC5* a été rapporté comme le partenaire de fusion de *MLL* suite à cette translocation. Nous avons confirmé l'implication de ce même gène chez deux cas de patients (06H066 et 08-1385) présentant une LAM (figure 25).



43~49,XX,del(3)(q12)[20],+?6[2],del(8)(p11.2)[9],t(11;15)(q23;q14)[20],-16[3],20[3],+21[15],+22[2][cp20]

08-1385



47,XX,+8,t(11;15)(q23;q14),del(20)(q11.2)[cp23]

Figure 25: Caryotypes en bandes G des patients 06H066 et 08-1385. Une métaphase représentative est démontrée. Les flèches indiquent les chromosomes dérivés. Le caryotype est écrit sous forme de « composite karyotype » selon l'ISCN 2009.⁵⁹

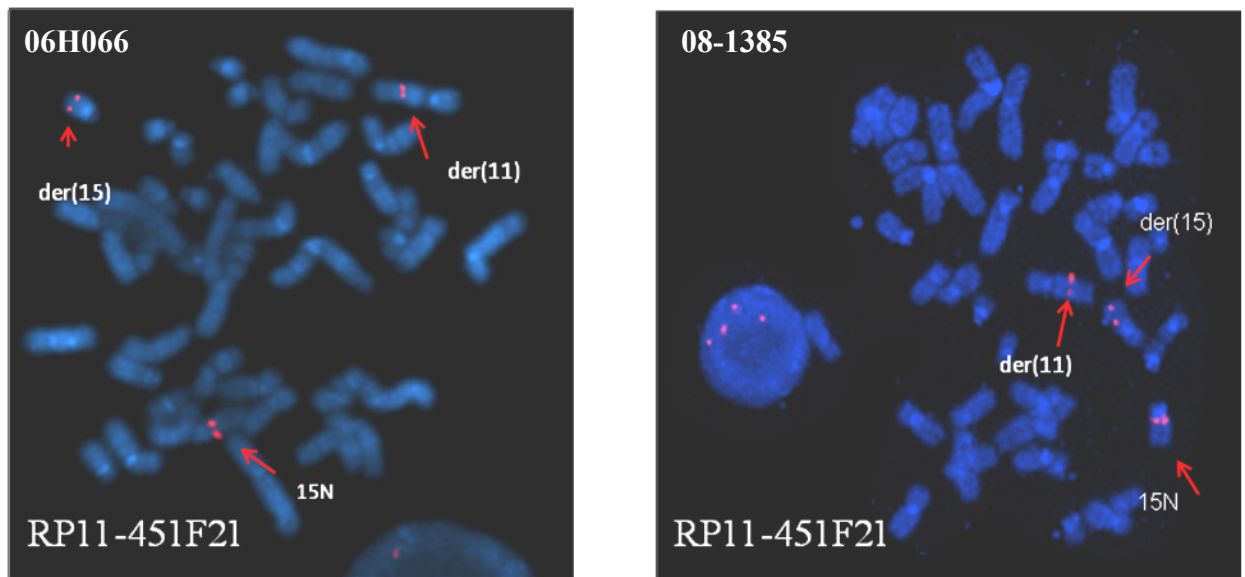


Figure 26: Analyse FISH des cellules leucémiques des patients 06H066 et 08-1385.

FISH avec le BAC RP11-451F21 montrant un réarrangement de *CASC5* chez les deux patients. On note un signal sur le chromosome 15 et deux signaux séparés sur le der(11) et le der(15).

3.3 Patient 08H139

Pour le patient 08H139, nous avons testé les BACs couvrant les gènes récurrents les plus fréquemment retrouvés comme partenaires de fusion de *MLL* suite à la translocation $t(11;19)(q23;p13)$. Aucun de ces BACs n'est réarrangé. Le BAC RP11-819E16 couvrant le gène *ENL/MLLT1* a été appliqué sur des métaphases et il nous a permis de conclure que le point de cassure au niveau du chromosome 19 est centromérique au gène *ENL/MLLT1*. L'application du BAC couvrant le gène *ELL* (RP11-908B10) a démontré que le point de cassure sur le chromosome 19 est télomérique au gène *ELL*. Le BAC RP11-978J4, préparé pour tester un réarrangement possible de *MYOIF*, n'est pas réarrangé (les deux signaux sont sur le chromosome 19). Ces résultats permettent de délimiter la région où la cassure est survenue (figure 27).

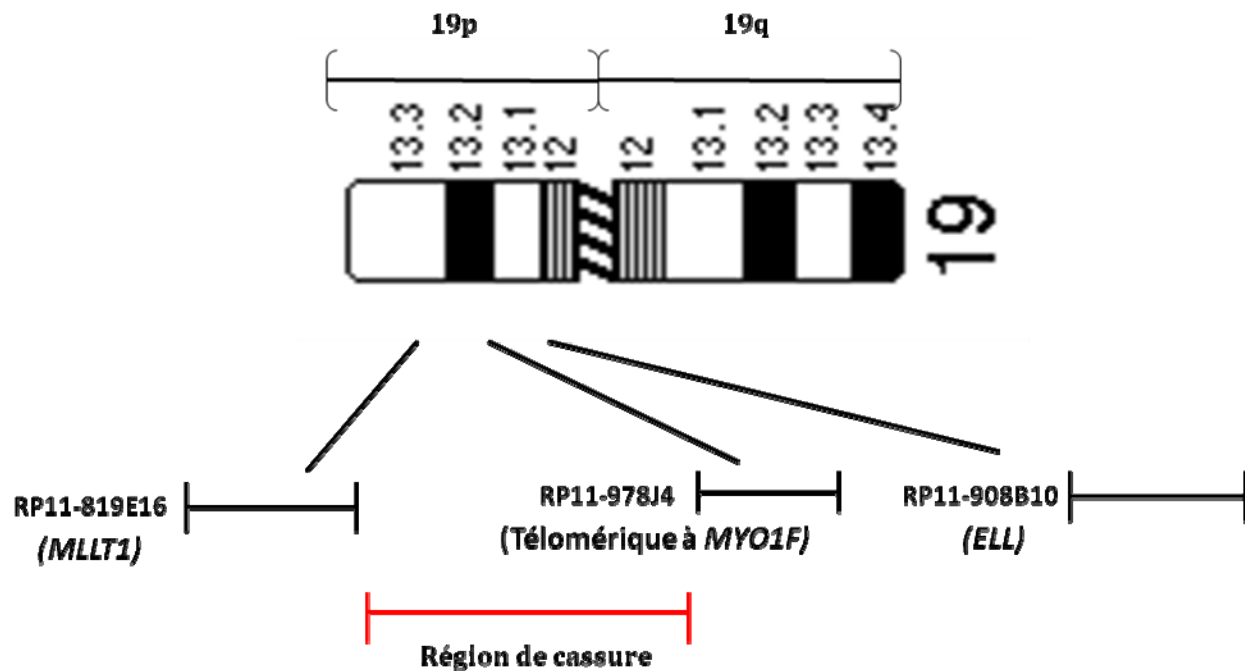


Figure 27: Schéma représentatif illustrant les BACs utilisés pour délimiter la région de cassure au niveau du chromosome 19 pour le patient 08H139.

Les différents partenaires identifiés et les techniques utilisées pour la cohorte de patients dont les spécimens ont été collectés par la BCLQ sont résumés dans le tableau V.

Tableau V : Les partenaires de fusion de *MLL* identifiés et les techniques utilisées

Patient	Type de leucémie	Caryotype	GPF
02-H017	LAM0	46,XX,t(11;19)(q23;p13.3)[14]/46,XX,t(11;19)(q23;p13.3),add(11)(p15)[7]	<i>ENL</i> **
05-H170	L. bilignée	Métaphase Hyperploïde de qualité sous optimale avec t(11;19)(q23;p ?13)	ND
07-H003	t-LAM (LAM4)	46,XX,t(11;19)(q23;p1?3.3)[20]	<i>ELL</i> **
04-H121	t-LAM (LAM5a)	46,XX,t(11;19)(q23;p13.1)[20]	<i>ELL</i> ***
07-H045	LAM5a	48,XX,+8,t(11;19)(q23;p13),+der(19)t(11;19)(q23;p13)[23]	<i>ENL</i> **
07-H073	t-LAM (LAM4)	46,XY,t(11;?19)(q23;?p13)[21]	<i>ELL</i> **
09H018	LAM0	46,XY,add(1)(q32),del(1)(p13),add(11)(q25),t(11;19)(q23;p13.3),add(12)(p13),add(15)(q?4),add(17)(q25)[19]/46,XY[1]	<i>ELL</i> **
06H057	LMMC-2	46,XX,t(11;14;19)(q23;q32;p13.1)[22]	<i>ELL</i> ***
08H085	t-LAM (L.biphén)	46,XX,t(11;19)(q23;p13)[6]	<i>ENL</i> **
08H139	LAM5a	45,XY,-7,t(11;19)(q23;p13.3)[20]	ND
06-H152	LAM post SMP	46,XY,t(11;17)(q23;p13)[21]	<i>GAS7</i> ***
04-H041	LAM5b	46,XY,t(11;17)(q23;q25)[18]/46,XY[2]	ND

03H067	LAM5a	46,XY,t(11;17)(q23;q25)[19]/46,XY[1]	ND
02H032	LAM5a	46,XX,t(11;17)(q23;q21)[22]	AF17/MLLT6°
01-H001	t.LAM (LAM5a)	46,XX,t(6;11)(q27;q23)[20]	AF6/MLLT4*
05-H066	LAM4	46,XX,t(6;11)(q27;q23)[20]	AF6/MLLT4*
06H088	LAM1	46,XY,t(6;11)(q27;q23)[20]	AF6/MLLT4*
08H129	LAM1	46,XX,t(6;11)(q27;q23)[20]	AF6/MLLT4*
06H117	LAM4	46,XY,t(6;11)(q27;q23)[25]	AF6/MLLT4*
04H080	LAM5a	46,XY,t(9;11)(p22;q23)[14]/46,XY[8]	AF9/MLLT3*
07H041	LAM5a	46,XY,t(9;11)(p22;q23)[20]	AF9/MLLT3*
09H010	LAM5a	46,XY,t(9;11)(p22;q23)[23]	AF9/MLLT3*
08H021	LAM5a	46,XY,t(9;11)(p22;q23)[20]	AF9/MLLT3*
05H025	LAM5a	44,XX,der(8)t(8;12)(p23;q12),t(9;11)(p22;q23),-12, der(13;17)(q10;q10),i(15)(q10)[20]	AF9/MLLT3*
08H075	t-LAM	46,XX,t(9;11)(p22;q23)[21]	AF9/MLLT3*
08H074	LAM5a	46,XX,t(9;11)(p22;q23)[18]/46,XX[2]	AF9/MLLT3*
09H032	LAM5a	46,XY,t(9;11)(p22;q23)[20]/46,XY[1]	AF9/MLLT3*
09H098	LAM5a	46,XX,t(9;11)(p22;q23)[18]/46,XX[2]	AF9/MLLT3*
07H037	LAL pro B	46,XY,t(4;11)(q21;q23)[12]/45,XY,t(4;11)(q21;q23),-21[6]/46,XY[2]	AF4/AFF1*
08H110	t-LAL (L.bilignée)	46,XX,t(4;11)(q21;q23)[20]	AF4/AFF1*
07H075	LAL-pré B	46,XX,t(4;11)(q21;q23)[2]	AF4/AFF1*
08H090	LAL-préB	t(4;11)(q21;q23) sur un nombre limité de métaphases	AF4/AFF1*
07H058	LAM5a	46,XY,t(4;10;11)(q23;p1?;q23)[18]/46,XY[1]	ND
05H128	LAM5a	t(?10;11)(?p12 ;q23), caractérisation en cours	ND
07H114	LAM4	47,Y,der(X)t(X;11)(p11?4;q13),inv(11)(q13q23),+8[18]/47,XY,+8[2]	ND
06H066	LAM post-SMD	43~49,XX,del(3)(q12)[20],+?6[2],del(8)(p11.2)[9],t(11;15)(q23;q14)[20],-16[3],-20[3],+21[15],+22[2][cp20]	CASC5**
UPN-08-1385	t-LAM	47,XX,+8?,t(11;15)(q23;q15),del(20),(q11.2)[cp23]	CASC5**
08H091	LAL-préB	Caractérisation en cours	ND
08H122	LAL-préB	Caractérisation en cours	ND

Tableau V : Les partenaires de fusion de *MLL* identifiés et les techniques utilisées.

Abréviation : LAM, leucémie aiguë myéloïde; LAL, leucémie aiguë lymphoïde; t-LAM, leucémie aiguë myéloïde post traitement; t-LAL, leucémie aiguë lymphoïde post traitement. *, partenaire identifié par caryotype; **, partenaire identifié par caryotype et FISH; ***partenaire identifié par caryotype, FISH et RT-PCR; °partenaire identifié par une autre étudiante; ND, non déterminé.

Chapitre IV

-DISCUSSION et CONCLUSION-

Discussion

Les réarrangements de *MLL*, survenant souvent suite à des translocations chromosomiques, sont associés à des leucémies adultes et pédiatriques de divers phénotypes. Le gène *MLL* est caractérisé par le grand nombre et la variabilité des partenaires auxquels il s'associe suite à ces translocations, générant ainsi des fusions codant pour des protéines chimériques impliquées dans la leucémogénèse. Ces fusions peuvent être spécifiques à un phénotype particulier de leucémie (par exemple, fusions *MLL-AFF1* dans les LAL et *MLL-ELL* dans les LAM) ou associées à des leucémies de phénotypes différents (par exemple, *MLL-MLLT1* dans les LAM, les LAL et les leucémies biphénotypiques).

Dans notre série de leucémies adultes, les réarrangements de *MLL* sont aussi associés à différents types de leucémies: leucémies aiguës lymphoïdes, myéloïdes (appartenant à différentes classes de la classification FAB), biphénotypiques, syndrome myéloprolifératif (LMMC), ainsi que des leucémies secondaires à un traitement ou survenant suite à un syndrome myélodysplasique. Dans notre série, onze bandes chromosomiques sont impliquées dans les réarrangements avec la bande 11q23 (pour les 36 cas de leucémies dont le caryotype a été établi). Nous avons identifié l'implication de huit gènes partenaires différents. Ainsi, notre échantillon est représentatif de la multitude et la diversité des gènes partenaires, caractéristiques des réarrangements *MLL*. Les partenaires identifiés sont des protéines nucléaires (*MLLT3/AF9*, *AFF1/AF4*, *MLLT1/ENL*, *ELL*, *MLLT6/AF17* et *CASC5*) et cytoplasmiques (*MLLT4/AF6* et *GAS7*). Les protéines nucléaires s'associent à différents rôles: élongation transcriptionnelle (*MLLT3/AF9*, *AFF1/AF4*, *MLLT1/ENL*, *ELL*), régulation de la transcription/peut-être facteur de transcription (*MLLT6/AF17*), et un rôle potentiel de *CASC5* dans la régulation de la prolifération cellulaire.^{68,69}

Tel que rapporté dans la littérature, *MLLT3/AF9*, *AFF1/AF4*, *MLLT1/ENL*, *ELL* sont les partenaires les plus récurrents dans notre série, présentant à eux seuls 80% des

partenaires de *MLL*.^{70,71,72} La sous-représentativité du partenaire *MLLT10/AF10* dans notre cohorte (réarrangé au plus chez deux patients où la translocation implique le bras court du chromosome 10, possiblement la bande p12) s'explique possiblement par le groupe d'âge étudié; ce partenaire étant particulièrement impliqué dans les leucémies pédiatriques. Des partenaires rares ont été retrouvés comme *GAS7* et *CASC5*.

La fréquence d'association entre les réarrangements *MLL* et une composante monocyttaire en morphologie, est confirmée dans notre échantillonnage. Par exemple, on note une corrélation étroite entre la t(9;11)(p22;q23) et le phénotype LAM5a, retrouvé dans tous les cas de LAM de novo.

Les leucémies post-traitement sont survenues suite à un traitement associant des inhibiteurs de topoisoméraseII (anthracyclines : Doxorubicine ou Épirubicine) et un agent alkylant (Cyclophosphamide) (5 cas), ou un agent alkylant et la radiothérapie (1 cas), ou radiothérapie seule (2cas). Les réarrangements de *MLL* sont souvent impliqués dans les leucémies secondaires à des inhibiteurs de topoisoméraseII, et se retrouvent aussi dans des leucémies survenant suite à un traitement par des agents alkylants et/ou une radiothérapie. Tel que déjà rapporté dans la littérature, dans des plus grandes cohortes,^{73,74} ceci est confirmé dans notre série.

La présence d'anomalies additionnelles est fréquente dans les réarrangements *MLL*.^{31,72,75} Nous retrouvons une récurrence d'anomalies additionnelles et de caryotypes complexes dans notre cohorte, associés aux translocations: t(9;11)(p22;q23), t(11;19)(q23;p13.3) et t(11;15)(q23;q14). La trisomie 8 et la monosomie 7 sont déjà décrites comme anomalies additionnelles récurrentes associées aux réarrangements de *MLL*.⁷⁵ Les anomalies additionnelles sont associées à des leucémies post-traitement et à des leucémies de novo, tel que déjà décrit.

Les données cliniques disponibles sur les patients de notre cohorte révèlent un pronostic plutôt défavorable de l'anomalie 11q23. Une étude statistique d'un plus grand nombre

de cas permettra une évaluation appropriée de l'impact du réarrangement de *MLL*, ainsi que l'impact de la présence d'une anomalie additionnelle, sur le pronostic dans notre série. La coopération de différents centres, permettant de rassembler un nombre considérable de cas pour une translocation donnée est souhaitable. Vu l'hétérogénéité de l'ensemble des leucémies avec réarrangement de *MLL*, ceci pourra contribuer à une meilleure prise en charge du patient.

L'analyse des caryotypes en bandes G présentant la translocation t(11;19)(q23;p13) confirme que le caryotype conventionnel doit être appuyé par des techniques moléculaires pour déterminer le partenaire de fusion de *MLL* suite à cette translocation, différents partenaires étant localisés à proximité sur la bande 19p13. De plus, la t(11;19)(q23;p13.1) est moins bien détectée (translocation « cryptique ») en bandes G, que la t(11;19)(q23;p13.3). La prédominance des partenaires *ELL* et *MLLTI(ENL)* suite à la t(11;19)(q23;p13) est confirmée dans notre série de LAM adultes. La présence de nouveaux partenaires de *MLL* suite à la translocation t(11;19)(q23;p13) est très probable vue la découverte récente de l'implication de partenaires rares suite à cette même translocation, tel que *MYOIF*⁷⁶ et *VAVI*.⁶⁹ Ceci motive la caractérisation moléculaire de la translocation t(11;19)(q23;p13) du cas 08H139, où la technique FISH ne montre pas de réarrangement des partenaires récurrents localisés au niveau de la bande 19p13.

Le gène *ELL* est l'un des partenaires de *MLL* les plus fréquents dans les LAM de l'adulte. Quelques cas de la fusion *MLL-ELL* ont été caractérisés dans la littérature dans des leucémies adultes et pédiatriques.^{77,78} Nous avons séquencé le point de cassure de deux cas de fusion *MLL-ELL*, le premier associé à une t-LAM (cas 04H121) et le second à une LMMC, leucémie myélo-monocytaire chronique (cas 06H057). Malgré l'association de l'anomalie 11q23 à des LAM avec une différenciation monocytaire, cette anomalie est rarement associée à une LMMC. Le même point de cassure a été retrouvé dans nos deux cas (fusion de *MLL* exon 9/exon 10 à l'exon 2 de *ELL*). Ceci correspond à celui rapporté dans les cas de LAM décrits dans la littérature. Un variant *MLL-ELL* associé à une LMMC a été décrit dans la littérature, où l'exon 10 de *MLL* est

fusionné à l'exon 3 de *ELL*.⁷⁹ Un lien entre la perte de l'exon 2 de *ELL* et une atteinte par un syndrome myéloprolifératif a été suggéré par les auteurs. Nous n'appuyons pas cette hypothèse, puisque nous retrouvons le même point de cassure que celui décrit dans les LAM.

La protéine ELL est un facteur d'élongation transcriptionnelle, supprimant les pauses transitoires de L'ARN polyméraseII. Ce gène joue un rôle important dans le développement embryonnaire. Le « knock out » de ce gène chez des souris est associé à une létalité intra-utérine. Le mécanisme de leucémogénèse de la fusion MLL-ELL n'est pas encore bien élucidé. La fusion MLL-ELL module l'expression de TP53, avec un potentiel inhibiteur supérieur à celui de la protéine ELL.⁸⁰ Par ailleurs, les leucémies humaines et de souris exprimant MLL-ELL sont associées à une surexpression des gènes homéotiques cibles de *MLL*, soit *HOXA5*, *HOXA9*, *HOXA10* et leur cofacteur *MEIS1*.⁸¹ Les fusions *MLL-ELL* codent pour une protéine putative formée par la fusion de la partie N-terminale de MLL à la majorité de la protéine ELL, incluant un domaine d'élongation transcriptionnelle, un domaine riche en lysine et un troisième domaine ayant possiblement un rôle dans l'activation transcriptionnelle. Le rôle critique de la partie extrême C-terminale (domaine R4) dans le potentiel oncogénique de la fusion MLL-ELL est rapporté.⁵²

En plus des fusions *MLL* impliquant des partenaires fréquents comme *MLLT3/AF9*, *AFF1/AF4*, *MLLT1/ENL*, *ELL* et *MLLT10/AF10*, dont les caractéristiques cliniques et moléculaires de la fusion sont relativement bien établies, une proportion considérable de fusions de *MLL* impliquant des partenaires rares est moins bien étudiée.

La translocation t(11;15)(q23;q14) est récurrente dans notre échantillonnage. C'est une translocation récurrente, mais peu fréquente, associée à 7-10% des LAL et 5-6% des LAM.⁸² Nos deux cas, ainsi que deux cas rapportés dans la littérature, démontrent une association de cette translocation avec un caryotype complexe.^{83,84} Un seul gène est présentement rapporté comme partenaire de fusion de *MLL* suite à cette translocation, le

gène *CASC5/AF15q14*. Nous retrouvons le même gène réarrangé dans les deux cas de patients ayant cette translocation. *CASC5* a été identifiée comme une composante du complexe des kinétochores.⁶⁸ Ainsi, l'instabilité chromosomique observée dans le cas des leucémies avec la translocation t(11;15)(q23;q14) pourrait possiblement s'expliquer par la dérégulation de l'expression de la protéine *CASC5*.

Nous avons caractérisé la t(11;17)(q23;p13), une translocation rare impliquant *MLL*. L'incidence réelle de cette translocation pourrait être sous-estimée, vu la difficulté de la détecter dans des métaphases de qualité sous-optimale.

A notre connaissance, la caractérisation moléculaire de cette translocation a été rapportée deux fois. Le premier cas a été décrit chez un garçon âgé de 13 ans, atteint d'une LAM secondaire à un traitement par des inhibiteurs de topoisomérase II, et le second a été associé à une LAL de novo chez une fille de 15 mois. Le gène *GAS7*, localisé au niveau de la bande 17p13 a été identifié comme le partenaire de *MLL* dans ces cas.^{85,86} *GAS7* (Growth arrest specific gene) code pour une protéine cytoplasmique exprimée dans les cellules quiescentes/différenciées, ayant un rôle dans la différenciation des neurones cérébrales. Son implication dans l'arrêt du cycle cellulaire n'est pas encore bien définie.^{87,88}

Nous retrouvons la même fusion *MLL-GAS7* dans un nouveau contexte clinique, soit un patient âgé de 69 ans atteint d'une LAM survenant suite à un syndrome myéloprolifératif (métaplasie myéloïde agnogénique) traité par hydroxyurée. Ce patient est décédé dans un intervalle d'un an après le diagnostic de LAM. L'analyse du séquençage de notre fusion révèle un point de cassure similaire à celui rapporté dans les cas antérieurs. La protéine putative codée par la fusion conserve la partie N-terminale de *MLL*, incluant les motifs AT-hook et les domaines de répression transcriptionnelle, et les domaines WW (assure la liaison à des séquences riches en proline) et FCH (Fer-CIP4 homology domain, jouant un rôle dans l'organisation du cytosquelette et l'endocytose) de *GAS7*. Ce dernier domaine est toujours suivi par une région de dimérisation par hélices

hydrophobes « coiled coil »⁸⁹(Figure 28). Ce domaine de dimérisation joue un rôle déterminant dans le potentiel de transformation de la protéine de fusion MLL-GAS7. En effet la dimérisation de la partie N-terminale de MLL par ce domaine est proposé comme le mécanisme activateur de la protéine chimérique.⁹⁰

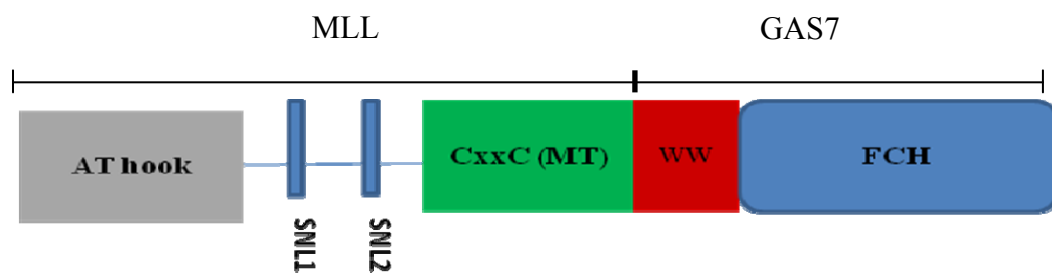


Figure 28: Protéine putative codée par la fusion *MLL-GAS7*. Abréviations: SNL1, 2, speckled nuclear localization 1,2; CxxC, motifs en doigts de zinc; WW, domaine WW; FCH, Fer-CIP4 homology domain; domaines décrits à partir de <http://pfam.sanger.ac.uk/>⁸⁹ et de la réf.⁹⁰

La protéine MLL-GAS7 a un potentiel particulier dans l'induction de leucémies multilignées (myéloïdes et lymphoïdes) à partir de progéniteurs hématopoïétiques multipotents.⁸ Malgré le nombre limité de fusions MLL-GAS7 rapportées, nous pouvons présumer que cette fusion est associée aux deux phénotypes de leucémies myéloïdes et lymphoïdes. Elle peut aussi être détectée dans des leucémies pédiatriques et adultes. La caractérisation moléculaire de la présente fusion confirme les domaines de GAS7 qui sont conservés dans la protéine putative, notamment le domaine de dimérisation.

Pour les patients de notre cohorte dont le partenaire de fusion reste indéterminé nous appliquerons des BACs couvrant les partenaires de fusion de *MLL* décrits dans la littérature au niveau de la bande chromosomique impliquée dans la translocation responsable du réarrangement de *MLL*. Par exemple pour les patients 05H128 et 07H058 présentant un réarrangement de *MLL* suite à une translocation impliquant le bras court

du chromosome 10, possiblement la bande p12, nous testerons en premier, des BACs couvrant les gènes *MLLT10/AF10* (10p12),⁹¹ *NEBL* (10p12)⁶⁹ et *ABII* (10p11.2)⁹² sur les métaphases respectives de ces deux patients. Pour les patients 04H041 et 03H067 présentant la translocation t(11;17)(q23;q25), nous testerons un BAC couvrant *SEPT9*, seul gène rapporté comme partenaire de fusion de *MLL* localisé au niveau de la bande 17q25.⁹³ Pour le patient 08H139 présentant une t(11;19)(q23;p13), les partenaires de fusion récurrents localisés au niveau de la bande 19p13 ne sont pas impliqués dans ce cas. Nous testerons des BACs qui couvrent les gènes *ACERI* et *VAVI* (centromériques à *MLLT1* et télomériques à *MYOIF*) et rapportés une fois chacun comme un GPF de *MLL* respectivement dans une LAL et une LAM.^{94,69}

Pour le patient 07H114, selon le caryotype conventionnel, il y a une fusion de la bande q23 du chromosome 11 possiblement à la bande p11.4 du chromosome X. Cette translocation n'est pas rapportée dans la littérature comme translocation impliquant un réarrangement *MLL*. Nous débuterons par une étude en FISH en utilisant des sondes peintures spécifiques des chromosomes 11 et X afin de valider le réarrangement chromosomique identifié par le caryotype. Des gènes intéressants possiblement impliqués dans le cancer sont présents au niveau de la bande Xp11.4, tels que *BCOR* (BCL6 co-repressor) et *USP9X* (ubiquitin specific peptidase 9, X linked).⁹⁵

Un nouveau partenaire de *MLL* est potentiellement impliqué dans ce cas et possiblement dans les cas cités ci-dessus. Des techniques utilisant l'ARN ou l'ADN génomique de ces patients nous permettront d'identifier le PF de *MLL*. Les techniques RACE (rapid amplification of cDNA ends) ou la technique LDI-PCR (long distance inverse PCR) sont déjà utilisées dans l'identification de partenaires inconnus de *MLL*.^{96,97} Brièvement, la technique RACE se base sur une transcription inverse par une amorce poly-T contenant une séquence supplémentaire connue et hybridant à la queue poly-A en 3' de l'ARNm. Cette transcription reverse est suivie par une amplification du cDNA obtenu, par des amorces spécifiques (s'hybridant à la séquence supplémentaire et à une séquence au

niveau de 5' *MLL*). Le produit PCR obtenu sera séquencé pour déterminer le partenaire de fusion.

La technique LDI-PCR cible des fragments d'ADN polymorphes résultant des translocations chromosomiques et obtenus par hydrolyse par des enzymes de restriction. Une ligation des fragments obtenus et une utilisation de combinaison d'amorces spécifiques de la région de cassure de *MLL* permettent l'amplification de la fusion *MLL*. Après migration sur gel d'agarose des réactions LDI-PCR obtenues, l'ADN correspondant à un der(11) sera séquencé afin de déterminer le partenaire de fusion.

Conclusion et perspectives

La BCLQ a collecté 39 échantillons de leucémies présentant un réarrangement de *MLL*. Ce gène est fréquemment altéré par des réarrangements chromosomiques, résultant généralement en des gènes de fusion, impliquant une variété de gènes partenaires. Nous avons débuté une investigation moléculaire de ces échantillons de leucémies humaines, par identification des partenaires de fusion de *MLL* pour chaque cas de leucémie et nous avons étudié des fusions rares, tel que la fusion *MLL-GAS7*, et la fusion *MLL-ELL* dans une LMMC, une association rare.

Notre identification des partenaires de fusion a révélé l'implication des partenaires récurrents de *MLL*, de quelques partenaires rares, ainsi qu'un nouveau partenaire potentiel de *MLL* dans deux cas (cas 07H114 et 08H139). La caractérisation de la fusion *MLL-GAS7* nous a permis de prédire les domaines protéiques potentiellement présents dans la protéine chimérique codée par cette fusion. Le clonage de *MLL-ELL* dans un syndrome myéloprolifératif a révélé un point de cassure identique à celui rapporté dans les leucémies aiguës.

Nous avons collecté les données cliniques correspondant à ces leucémies, permettant de faire des corrélations entre les caractéristiques cliniques et une fusion *MLL* spécifique.

Ainsi, notre cohorte de leucémie avec différentes fusions, se prête à une étude clinique évaluant le pronostic de ces fusions, dans un cadre de coopération avec d'autres banques de cellules leucémiques ou groupes de recherche.

Plusieurs autres projets de recherche fondamentaux et translationnels pourront aussi éventuellement bénéficier de ce travail:

- 1- Par exemple, une étude d'expression des gènes potentiellement dérégulés suite au réarrangement de *MLL* pourra être faite. Cette étude pourrait inclure les histones lysines méthyltransférases spécifiques (KMT), comme DOT1L, jouant un rôle dans la

leucémogénèse de différentes protéines de fusion (*MLL-MLLT1*, *MLL-MLLT3* et *MLL-AFF1*) suite à leur potentiel de recruter cette enzyme⁵⁹ et les histones déméthylases (KDM) spécifiques, impliquées dans la régulation des gènes *Hox*,^{98,99} comme Kdm5a/Jarid1a. En effet, dans une étude récente, il a été démontré que Jarid1a est recrutée au niveau des promoteurs des gènes *Hoxa1*, *Hoxa5* et *Hoxa7* dans les cellules souches embryonnaires indifférenciées de souris et que cette liaison est perdue lors de la différenciation¹⁰⁰. Certaines déméthylases, comme par exemple Kdm3a/Jmjd1a, Kdm4c/jmd2c¹⁰¹ et plus récemment Jarid2, une sous-unité du complexe répresseur polycomb PRC2, ont aussi été impliquées dans la régulation de l'autorenouvellement et de la différenciation des cellules souches embryonnaires chez la souris.¹⁰²

2- Des études fonctionnelles en utilisant des modèles expérimentaux chez la souris, permettront aussi une investigation des voies moléculaires potentiellement impliquées dans ces différentes leucémies *MLL*.

3- Des études de purification protéique ont déjà démontré l'interaction de l'enzyme DOT1L avec les protéines de fusion *MLL-MLLT1*, *MLL-MLLT3* et *MLL-AFF1*, de PRMT1 avec MLL-EEN et de la protéine ménine avec la partie N-terminale de MLL.⁸⁹ D'autres études de purification pourraient permettre d'identifier de nouvelles interactions, révélant des cibles intéressantes impliquées dans la leucémogénèse des protéines de fusion MLL.

En conclusion, l'élucidation des mécanismes moléculaires impliqués dans la transformation leucémique par les protéines de fusion MLL, pourrait permettre de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour améliorer le traitement de ces leucémies à pronostic défavorable.¹⁰³

Bibliographie

1. Fey, M. F. (2007). Normal and malignant hematopoiesis. *Ann Oncol 18 Suppl 1*, i9-i13.
2. Murre, C. (2007). Defining the pathways of early adult hematopoiesis. *Cell Stem Cell 1*, 357-358.
3. Sébahoun, G. (1998). *Hématologie Clinique et biologique*. Arnette.
4. Creer, J.P., Foerster, J. (2009). *Wintrobe's clinical hematology*. Wolters Kluwer.
5. Orkin, S. H., and Zon, L. I. (2008). Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell 132*, 631-644.
6. Chan, W. I., and Huntly, B. J. (2008). Leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. *Semin Oncol 35*, 326-335.
7. Cozzio, A., Passegue, E., Ayton, P. M., Karsunky, H., Cleary, M. L., and Weissman, I. L. (2003). Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes Dev 17*, 3029-3035.
8. So, C. W., Karsunky, H., Passegue, E., Cozzio, A., Weissman, I. L., and Cleary, M. L. (2003). MLL-GAS7 transforms multipotent hematopoietic progenitors and induces mixed lineage leukemias in mice. *Cancer Cell 3*, 161-171.
9. Somervaille, T. C., and Cleary, M. L. (2006). Identification and characterization of leukemia stem cells in murine MLL-AF9 acute myeloid leukemia. *Cancer Cell 10*, 257-268.

10. Vardiman, J. W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J., Porwit, A., Harris, N. L., Lebeau, M. M., Hellström-lindberg, E., Tefferi, A., Bloomfield. C. D. (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 114, 937-951.
11. Mitelman, F., Johansson, B., and Mertens, F. (2007). The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer* 7, 233-245.
12. Rowley, J. D. (2008). Chromosomal translocations: revisited yet again. *Blood* 112, 2183-2189.
13. Mani, R. S., Tomlins, S.A., Callahan, K., Ghosh, A., Nyati, M.K., Varambally, S., Palanisamy, N., Chinnaiyan, A.M. (2009). Induced chromosomal proximity and gene fusions in prostate cancer. *Science* 326, 1230.
14. Neves, H., Ramos, C., da Silva, M. G., Parreira, A., Parreira, L. (1999). The nuclear topography of ABL, BCR, PML, and RARalpha genes: evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation. *Blood* 93, 1197-1207.
15. Roix, J. J., McQueen, P. G., Munson, P.J., Parada, L.A., Misteli, T. (2003). Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas. *Nature genetics* 34, 287-291.
16. Zhang, Y., and Rowley, J. D. (2006). Chromatin structural elements and chromosomal translocations in leukemia. *DNA Repair (Amst)* 5, 1282-1297.
17. Gollin, S. M. (2007). Mechanisms Leading to Nonrandom, Nonhomologous Chromosomal Translocations in Leukemia. *Semin Cancer Biol* 17, 74-79.

18. Strout, M. P., Marcucci, G., Bloomfield, C. D., Caligiuri, M.A. (1998). The partial tandem duplication of ALL1 (MLL) is consistently generated by Alu-mediated homologous recombination in acute myeloid leukemia. *PNAS* 95, 2390-2395.
19. Marculescu, R., Vanura, K., Montpellier, B., Roulland, S., Le, T., Navarro, J.M., Jäger, U., McBlane, F., Nadel, B. (2006). Recombinase, chromosomal translocations and lymphoid neoplasia: targeting mistakes and repair failures. *DNA Repair* 5, 1246-1258.
20. Frohling, S., and Dohner, H. (2008). Chromosomal abnormalities in cancer. *N Engl J Med* 359, 722-734.
21. Kantarjian, H., Talpaz, M. Giles, F., O'Brien, S., Cortes, J. (2006). New Insights into the Pathophysiology of Chronic Myeloid Leukemia and Imatinib Resistance. *Annals of Internal Medicine* 145, 913-923.
22. Mikhail, F. M., Sinha, K. K., Sauntharajah, Y., and Nucifora, G. (2006). Normal and transforming functions of RUNX1: a perspective. *J Cell Physiol* 207, 582-593.
23. Lo-Coco, F., and Ammatuna, E. (2006). The biology of acute promyelocytic leukemia and its impact on diagnosis and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 156-161, 514.
24. Li, Z., Luo, R. T., Mi, S., Sun, M., Chen, P., Bao, J., Neilly, M. B., Jayathilaka, N., Johnson, D. S., Wang, L., *et al.* (2009). Consistent deregulation of gene expression between human and murine MLL rearrangement leukemias. *Cancer Res* 69, 1109-1116.
25. Rodriguez-Perales, S., Cano, F., Lobato, M. N., and Rabbitts, T. H. (2008). MLL gene fusions in human leukaemias: in vivo modelling to recapitulate these primary tumourigenic events. *Int J Hematol* 87, 3-9.

26. Milne, T. A., Briggs, S. D., Brock, H. W., Martin, M. E., Gibbs, D., Allis, C. D., and Hess, J. L. (2002). MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol Cell* 10, 1107-1117.
27. Aplan, P. D. (2006). Chromosomal translocations involving the MLL gene: molecular mechanisms. *DNA Repair (Amst)* 5, 1265-1272.
28. Krivtsov, A. V., and Armstrong, S. A. (2007). MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer* 7, 823-833.
29. Slovak, M. L., Kopecky, K. J., Cassileth, P. A., Harrington, D. H., Theil, K. S., Mohamed, A., Paietta, E., Willman, C. L., Head, D. R., Rowe, J. M., *et al.* (2000). Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 96, 4075-4083.
30. Byrd, J. C., Mrozek, K., Dodge, R. K., Carroll, A. J., Edwards, C. G., Arthur, D. C., Pettenati, M. J., Patil, S. R., Rao, K. W., Watson, M. S., *et al.* (2002). Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* 100, 4325-4336.
31. Krauter, J., Wagner, K., Schafer, I., Marschalek, R., Meyer, C., Heil, G., Schaich, M., Ehninger, G., Niederwieser, D., Krahl, R., *et al.* (2009). Prognostic factors in adult patients up to 60 years old with acute myeloid leukemia and translocations of chromosome band 11q23: individual patient data-based meta-analysis of the German Acute Myeloid Leukemia Intergroup. *J Clin Oncol* 27, 3000-3006.
32. Grimwade, D., Walker, H., Oliver, F., Wheatley, K., Harrison, C., Harrison, G., Rees, J., Hann, I., Stevens, R., Burnett, A., and Goldstone, A. (1998). The importance of diagnostic

- cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 92, 2322-2333.
33. Raimondi, S. C., Chang, M. N., Ravindranath, Y., Behm, F. G., Gresik, M. V., Steuber, C. P., Weinstein, H. J., and Carroll, A. J. (1999). Chromosomal abnormalities in 478 children with acute myeloid leukemia: clinical characteristics and treatment outcome in a cooperative pediatric oncology group study-POG 8821. *Blood* 94, 3707-3716.
34. Balgobind, B. V., Raimondi, S. C., Harbott, J., Zimmermann, M., Alonzo, T. A., Auvrignon, A., Beverloo, H. B., Chang, M., Creutzig, U., Dworzak, M. N., et al. (2009). Novel prognostic subgroups in childhood 11q23/MLL-rearranged acute myeloid leukemia: results of an international retrospective study. *Blood* 114, 2489-2496.
35. Pullarkat, V., Slovak, M. L., Kopecky, K. J., Forman, S. J., and Appelbaum, F. R. (2008). Impact of cytogenetics on the outcome of adult acute lymphoblastic leukemia: results of Southwest Oncology Group 9400 study. *Blood* 111, 2563-2572.
36. Moorman, A. V., Harrison, C. J., Buck, G. A., Richards, S. M., Secker-Walker, L. M., Martineau, M., Vance, G. H., Cherry, A. M., Higgins, R. R., Fielding, A. K., et al. (2007). Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of cytogenetic data from patients treated on the Medical Research Council (MRC) UKALLXII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 trial. *Blood* 109, 3189-3197.
37. Felix, C. A., Lange, B. J., and Chessells, J. M. (2000). Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: Challenges and Controversies in 2000. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 285-302.
38. Yu, B. D., Hess, J. L., Horning, S. E., Brown, G. A., and Korsmeyer, S. J. (1995). Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. *Nature* 378, 505-508.

39. Ernst, P., Fisher, J. K., Avery, W., Wade, S., Foy, D., and Korsmeyer, S. J. (2004). Definitive hematopoiesis requires the mixed-lineage leukemia gene. *Dev Cell* 6, 437-443.
40. Muntean, A. G., Giannola, D., Udager, A. M., and Hess, J. L. (2008). The PHD fingers of MLL block MLL fusion protein-mediated transformation. *Blood* 112, 4690-4693.
41. Chen, J., Santillan, D. A., Koonce, M., Wei, W., Luo, R., Thirman, M. J., Zeleznik-Le, N. J., and Diaz, M. O. (2008). Loss of MLL PHD finger 3 is necessary for MLL-ENL-induced hematopoietic stem cell immortalization. *Cancer Res* 68, 6199-6207.
42. Hess, J. L. (2004). MLL: a histone methyltransferase disrupted in leukemia. *Trends Mol Med* 10, 500-507.
43. Schlenk, R. F., Dohner, K., Krauter, J., Frohling, S., Corbacioglu, A., Bullinger, L., Habdank, M., Spath, D., Morgan, M., Benner, A., *et al.* (2008). Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 358, 1909-1918.
44. Baldus, C. D., Mrozek, K., Marcucci, G., and Bloomfield, C. D. (2007). Clinical outcome of de novo acute myeloid leukaemia patients with normal cytogenetics is affected by molecular genetic alterations: a concise review. *Br J Haematol* 137, 387-400.
45. Whitman, S. P., Ruppert, A. S., Marcucci, G., Mrozek, K., Paschka, P., Langer, C., Baldus, C. D., Wen, J., Vukosavljevic, T., Powell, B. L., Carroll, A.J., Kolitz, J.E., Larson, R. A., Caligiuri, M. A., Bloomfield, C. D. (2007). Long-term disease-free survivors with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and *MLL* partial tandem duplication: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood* 109, 5164-5167.
46. Alvarez, S., and Cigudosa, J. C. (2005). Gains, losses and complex karyotypes in myeloid disorders: a light at the end of the tunnel. *Hematol Oncol* 23, 18-25.

47. Zatkova, A., Merk, S., Wendehack, M., Bilban, M., Muzik, E.M., Muradyan, A., Haferlach, C., Haferlach, T., Wimmer, K., Fonatsh, C., Ullmann, R. (2009). AML/MDS with 11q/*MLL* amplification show characteristic gene expression signature and interplay of DNA copy number changes. *Genes Chromosomes Cancer* 48, 510-520.
48. Maitta, R.W., Cannizzaro, L. A., Ramesh, K. H. (2009). Association of *MLL* amplification with poor outcome in acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 192, 40-43.
49. Corral, J., Lavenir, I., Impey, H., Warren, A. J., Forster, A., Larson, T. A., Bell, S., McKenzie, A. N., King, G., and Rabbitts, T. H. (1996). An *Mll-AF9* fusion gene made by homologous recombination causes acute leukemia in chimeric mice: a method to create fusion oncogenes. *Cell* 85, 853-861.
50. Chen, W., Li, Q., Hudson, W. A., Kumar, A., Kirchhof, N., and Kersey, J. H. (2006). A murine *Mll-AF4* knock-in model results in lymphoid and myeloid deregulation and hematologic malignancy. *Blood* 108, 669-677.
51. Zeisig, D. T., Bittner, C. B., Zeisig, B. B., Garcia-Cuellar, M. P., Hess, J. L., and Slany, R. K. (2005). The eleven-nineteen-leukemia protein ENL connects nuclear *MLL* fusion partners with chromatin. *Oncogene* 24, 5525-5532.
52. Dimartino, J. F., Miller, T., Ayton, P. M., Landewe, T., Hess, J. L., Cleary, M. L., Shilatifard, A. (2000). A carboxy-terminal domain of *ELL* is required and sufficient for immortalization of myeloid progenitors by *MLL-ELL*. *Blood* 96, 3887-3893.
53. Ferrando, A. A., Armstrong, S. A., Neuberg, D. S., Sallan, S. E., Silverman, L. B., Korsmeyer, S. J., and Look, A. T. (2003). Gene expression signatures in *MLL*-rearranged T-lineage and B-precursor acute leukemias: dominance of *HOX* dysregulation. *Blood* 102, 262-268.

54. Kroon, E., Kros, J., Thorsteinsdottir, U., Baban, S., Buchberg, A. M., and Sauvageau, G. (1998). *Hoxa9* transforms primary bone marrow cells through specific collaboration with *Meis1a* but not *Pbx1b*. *Embo J* *17*, 3714-3725.
55. Faber, J., Krivtsov, A. V., Stubbs, M. C., Wright, R., Davis, T. N., van den Heuvel-Eibrink, M., Zwaan, C. M., Kung, A. L., and Armstrong, S. A. (2009). *HOXA9* is required for survival in human *MLL*-rearranged acute leukemias. *Blood* *113*, 2375-2385.
56. Dou, Y., and Hess, J. L. (2008). Mechanisms of transcriptional regulation by *MLL* and its disruption in acute leukemia. *Int J Hematol* *87*, 10-18.
57. Milne, T. A., Martin, M. E., Brock, H. W., Slany, R. K., and Hess, J. L. (2005). Leukemogenic *MLL* fusion proteins bind across a broad region of the *Hox a9* locus, promoting transcription and multiple histone modifications. *Cancer Res* *65*, 11367-11374
58. Okada, Y., Feng, Q., Lin, Y., Jiang, Q., Li, Y., Coffield, V. M., Su, L., Xu, G., and Zhang, Y. (2005). *hDOT1L* links histone methylation to leukemogenesis. *Cell* *121*, 167-178.
59. Mueller, D., Bach, C., Zeisig, D., Garcia-Cuellar, M. P., Monroe, S., Sreekumar, A., Zhou, R., Nesvizhskii, A., Chinnaiyan, A., Hess, J. L., and Slany, R. K. (2007). A role for the *MLL* fusion partner *ENL* in transcriptional elongation and chromatin modification. *Blood* *110*, 4445-4454.
60. Krivtsov, A. V., Feng, Z., Lemieux, M. E., Faber, J., Vempati, S., Sinha, A. U., Xia, X., Jesneck, J., Bracken, A. P., Silverman, L. B., et al. (2008). H3K79 methylation profiles define murine and human *MLL*-*AF4* leukemias. *Cancer Cell* *14*, 355-368.
61. Lavau, C., Luo, R. T., Du, C., and Thirman, M. J. (2000). Retrovirus-mediated gene transfer of *MLL*-*ELL* transforms primary myeloid progenitors and causes acute myeloid leukemias in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 10984-10989.

62. So, C. W., Lin, M., Ayton, P. M., Chen, E. H., and Cleary, M. L. (2003). Dimerization contributes to oncogenic activation of MLL chimeras in acute leukemias. *Cancer Cell* 4, 99-110.
63. Martin, M. E., Milne, T. A., Bloyer, S., Galoian, K., Shen, W., Gibbs, D., Brock, H. W., Slany, R., and Hess, J. L. (2003). Dimerization of MLL fusion proteins immortalizes hematopoietic cells. *Cancer Cell* 4, 197-207.
64. Dorrance, A. M., Liu, S., Yuan, W., Becknell, B., Arnoczky, K. J., Guimond, M., Strout, M. P., Feng, L., Nakamura, T., Yu, L., *et al.* (2006). Mll partial tandem duplication induces aberrant Hox expression in vivo via specific epigenetic alterations. *J Clin Invest* 116, 2707-2716.
65. Ross, M. E., Mahfouz, R., Onciu, M., Liu, H. C., Zhou, X., Song, G., Shurtleff, S. A., Pounds, S., Cheng, C., Ma, J., *et al.* (2004). Gene expression profiling of pediatric acute myelogenous leukemia. *Blood* 104, 3679-3687.
66. Shaffer, L. G., Slovak, M. L., Campbell, L. J. (2009). An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. S.Karger, Basel, Switzerland.
67. <http://genome.ucsc.edu/>
68. Bogdanov, K. V., and Takimoto, M. (2008). [The involvement of c-Abl and D40 (AF15q14/CASC5) proteins in the regulation of cell proliferation and cancer]. *Tsitologiya* 50, 590-596.
69. Meyer, C., Kowarz, E., Hofmann, J., Renneville, A., Zuna, J., Trka, J., Ben Abdelali, R., Macintyre, E., De Braekeleer, E., De Braekeleer, M., *et al.* (2009). New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* 23, 1490-1499.

70. Meyer, C., Schneider, B., Jakob, S., Strehl, S., Attarbaschi, A., Schnittger, S., Schoch, C., Jansen, M. W., van Dongen, J. J., den Boer, M. L., *et al.* (2006). The MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* 20, 777-784.
71. Tamai, H., Yamaguchi, H., Hamaguchi, H., Yagasaki, F., Bessho, M., Kobayashi, T., Akiyama, H., Sakamaki, H., Takahashi, S., Tojo, A., *et al.* (2008). Clinical features of adult acute leukemia with 11q23 abnormalities in Japan: a co-operative multicenter study. *Int J Hematol* 87, 195-202.
72. Shih, L. Y., Liang, D. C., Fu, J. F., Wu, J. H., Wang, P. N., Lin, T. L., Dunn, P., Kuo, M. C., Tang, T. C., Lin, T. H., and Lai, C. L. (2006). Characterization of fusion partner genes in 114 patients with de novo acute myeloid leukemia and MLL rearrangement. *Leukemia* 20, 218-223.
73. Secker-Walker, L. M., Moorman, A. V., Bain, B. J., and Mehta, A. B. (1998). Secondary acute leukemia and myelodysplastic syndrome with 11q23 abnormalities. EU Concerted Action 11q23 Workshop. *Leukemia* 12, 840-844.
74. Bloomfield, C. D., Archer, K. J., Mrozek, K., Lillington, D. M., Kaneko, Y., Head, D. R., Dal Cin, P., and Raimondi, S. C. (2002). 11q23 balanced chromosome aberrations in treatment-related myelodysplastic syndromes and acute leukemia: report from an international workshop. *Genes Chromosomes Cancer* 33, 362-378.
75. Schoch, C., Schnittger, S., Klaus, M., Kern, W., Hiddemann, W., and Haferlach, T. (2003). AML with 11q23/MLL abnormalities as defined by the WHO classification: incidence, partner chromosomes, FAB subtype, age distribution, and prognostic impact in an unselected series of 1897 cytogenetically analyzed AML cases. *Blood* 102, 2395-2402.

76. Taki, T., Akiyama, M., Saito, S., Ono, R., Taniwaki, M., Kato, Y., Yuza, Y., Eto, Y., and Hayashi, Y. (2005). The MYO1F, unconventional myosin type 1F, gene is fused to MLL in infant acute monocytic leukemia with a complex translocation involving chromosomes 7, 11, 19 and 22. *Oncogene* 24, 5191-5197.
77. Rubnitz, J. E., Behm, F. G., Curcio-Brint, A. M., Pinheiro, R. P., Carroll, A. J., Raimondi, S. C., Shurtleff, S. A., and Downing, J. R. (1996). Molecular analysis of t(11;19) breakpoints in childhood acute leukemias. *Blood* 87, 4804-4808.
78. Mitani, K., Kanda, Y., Ogawa, S., Tanaka, T., Inazawa, J., Yazaki, Y., and Hirai, H. (1995). Cloning of several species of MLL/MEN chimeric cDNAs in myeloid leukemia with t(11;19)(q23;p13.1) translocation. *Blood* 85, 2017-2024.
79. Kakihana, K., Kubo, F., Wakabayashi, S., Kurosu, T., Miki, T., Murakami, N., and Miura, O. (2008). A novel variant form of MLL-ELL fusion transcript with t(11;19)(q23;p13.1) in chronic myelomonocytic leukemia transforming to acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 184, 109-112.
80. Zhou, J., Feng, X., Ban, B., Liu, J., Wang, Z., and Xiao, W. (2009). Elongation factor ELL (Eleven-Nineteen Lysine-rich Leukemia) acts as a transcription factor for direct thrombospondin-1 regulation. *J Biol Chem* 284, 19142-19152.
81. Li, Z., Luo, R. T., Mi, S., Sun, M., Chen, P., Bao, J., Neilly, M. B., Jayathilaka, N., Johnson, D. S., Wang, L., *et al.* (2009). Consistent deregulation of gene expression between human and murine MLL rearrangement leukemias. *Cancer Res* 69, 1109-1116.
82. Kuefer, M. U., Chinwalla, V., Zeleznik-Le, N. J., Behm, F. G., Naeve, C. W., Rakestraw, K. M., Mukatira, S. T., Raimondi, S. C., and Morris, S. W. (2003). Characterization of the MLL partner gene AF15q14 involved in t(11;15)(q23;q14). *Oncogene* 22, 1418-1424.
83. Hayette, S., Tigaud, I., Vanier, A., Martel, S., Corbo, L., Charrin, C., Beillard, E., Deleage, G., Magaud, J. P., and Rimokh, R. (2000). AF15q14, a novel partner gene fused to the

- MLL gene in an acute myeloid leukaemia with a t(11;15)(q23;q14). *Oncogene* 19, 4446-4450.
84. Chinwalla, V., Chien, A., Odero, M., Neilly, M. B., Zeleznik-Le, N. J., and Rowley, J. D. (2003). A t(11;15) fuses MLL to two different genes, AF15q14 and a novel gene MPFYVE on chromosome 15. *Oncogene* 22, 1400-1410.
85. Megonigal, M. D., Cheung, N. K., Rappaport, E. F., Nowell, P. C., Wilson, R. B., Jones, D. H., Addya, K., Leonard, D. G., Kushner, B. H., Williams, T. M., *et al.* (2000). Detection of leukemia-associated MLL-GAS7 translocation early during chemotherapy with DNA topoisomerase II inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2814-2819.
86. Panagopoulos, I., Lilljebjorn, H., Strombeck, B., Hjorth, L., Olofsson, T., and Johansson, B. (2006). MLL/GAS7 fusion in a pediatric case of t(11;17)(q23;p13)-positive precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 91, 1287-1288.
87. Ebinger, M., Senf, L., Wachowski, O., and Scheurlen, W. (2006). Expression of GAS7 in childhood CNS tumors. *Pediatr Blood Cancer* 46, 325-328.
88. <http://genatlas.medecine.univ-paris5.fr>
89. <http://pfam.sanger.ac.uk/>
90. So, C. W., Lin, M., Ayton, P. M., Chen, E. H., and Cleary, M. L. (2003). Dimerization contributes to oncogenic activation of MLL chimeras in acute leukemias. *Cancer Cell* 4, 99-110.
91. Chaplin, T., Bernard, O., Beverloo, H. B., Saha, V., Hagemeijer, A., Berger, R., Young, B. D. (1995). The t(10;11) translocation in acute myeloid leukemia (M5) consistently fuses the leucine zipper motif of AF10 onto the HRX gene. *Blood* 86, 2073-2076.

92. Taki, T., Shibuya, N., Taniwaki, M., Hanada, R., Morishita, K., Bessho, F., Yanagisawa, M., Hayashi, Y. (1998). ABI-1, a human homolog to mouse Abl-interactor 1, fuses the MLL gene in acute myeloid leukemia with t(10;11)(p11.2;q23). *Blood* 92, 1125-1130
93. Taki, T., Ohnishi, H., Shinohara, K., Sako, M., Bessho, F., Yanagisawa, M., Hayashi, Y. (1999). AF17q25, a putative septin family gene, fuses the MLL gene in acute myeloid leukemia with t(11;17)(q23;q25). *Cancer research* 59,4261-4265.
94. Huret JL . t(11;19)(q23;p13.3) MLL/ACER1. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. April 2009 .URL : <http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/t1119q23p13ID1540.html>
95. Dessen P, Knuutila S, Huret JL . Chromosome . Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. Jul 2004 .URL : http://AtlasGeneticsOncology.org/Indexbychrom/idxa_X.html
96. Meyer , C., Schneider, B., Reichel, M., Angermueller,S., Strehl, S., Schnittger, S., Schoch, C., Jansen, M. W., van Dongen, J. J., Pieters, R., Haas, O.A., Dingermann, T., Klingebiel, T., Marschalek, R. (2005). Diagnostic tool for the identification of MLL rearrangements including unknown partner genes. *PNAS* 102, 449-454
97. Strehl, S., Borkhardt, A., Slany, R., Fuchs, U. E., König, M., Haas, O. A. (2003). The human LASP1 gene is fused to MLL in an acute myeloid leukemia with t(11;17)(q23;q21). *Oncogene* 22, 157-160.
98. Agger, K., Christensen, J., Cloos, P. A., and Helin, K. (2008). The emerging functions of histone demethylases. *Curr Opin Genet Dev* 18, 159-168.
99. Cloos, A. C., Christensen, J., Agger, K., Helin, K. (2008). Erasing the methyl mark: histone demethylases at the center of cellular differentiation and disease. *Genes & Dev.* 22, 1115-1140.

100. Christensen, J., Agger, K., Cloos, P. A., Pasini, D., Rose, S., Sennels L., Rappsilber, J., Hansen, K. H., Salcini, A. E., Helin, K. (2007). RBP2 belongs to a family of demethylases , specific for tri-and demethylated lysine 4 on histone 3. *Cell* *128*, 1063-1076.
101. Loh, Y. H., Zhang, W., Chen, X., George, J., Ng, H. H. (2007). Jmjd1a and jmjd2c histone H3 Lys9 demethylases regulate self-renewal in embryonic stem cells. *Genes & Dev* *21*, 2545-2557.
102. Peng, J. C., Valouev, A., Tomek, S., Zhang, J., Zhao, Y., Sidow, A., Wysocka, J. (2009). Jarid2/ Jumonji coordinates control of PRC2 enzymatic activity and target gene occupancy in pluripotent cells. *Cell* *139*, 1290-1302.
103. Liedtke, M., Cleary, M. L. (2009). Therapeutic Targeting of MLL. *Blood* *113*, 6061-6068.

